

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 825**

51 Int. Cl.:

C12N 9/42 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2011 E 11290113 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 2371950**

54 Título: **Procedimiento de producción de celulasas basado en la regulación de la oscilación de la presión de oxígeno disuelto en el medio de cultivo**

30 Prioridad:

26.03.2010 FR 1001211

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.11.2013

73 Titular/es:

**IFP ENERGIES NOUVELLES (100.0%)
1 & 4, Avenue de Bois-Préau
92852 Rueil-Malmaison Cedex, FR**

72 Inventor/es:

**BEN CHAABANE, FADHEL y
COHEN, CÉLINE**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 428 825 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 celulasas basado en la regulación de la oscilación de la presión de oxígeno disuelto en el medio de cultivo

5

Campo de la invención

La invención se refiere a un procedimiento de producción de enzimas para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica.

10 **Antecedentes de la invención**

La biomasa lignocelulósica se caracteriza por una estructura compleja constituida por tres polímeros principales: la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. La celulosa y eventualmente las hemicelulosas son los blancos de la hidrólisis enzimática pero no son directamente accesibles para las enzimas.

15

Es la razón por la cual estos sustratos deben experimentar un pretratamiento anterior a la etapa de hidrólisis enzimática. El pretratamiento pretende modificar las propiedades físicas y fisicoquímicas del material lignocelulósico, con el fin de mejorar la accesibilidad de la celulosa atrapada en la matriz de lignina y de hemicelulosa. Estos pretratamientos pueden ser de diferentes tipos: se pueden citar las cocciones ácidas, las cocciones alcalinas, la explosión de vapor, o incluso los procesos Organosolv.

20

La etapa de hidrólisis enzimática permite la transformación de la celulosa y de las hemicelulosas en azúcares mediante el uso de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas. Algunos 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 hemicelulasas, adaptadas a la hidrólisis total de la celulosa y de las hemicelulosas.

25

Los azúcares que se obtienen mediante la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica son pentosas (xilosa y arabinosa principalmente), disacáridos (celobiosa) y glucosa que se pueden fermentar mediante los microorganismos. La glucosa se puede, por ejemplo, transformar fácilmente en etanol mediante la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la etapa de fermentación alcohólica.

30

Por último, una etapa de destilación permite separar y recuperar el producto resultante de la fermentación obtenido de este modo, por lo tanto el etanol en el caso anterior, del mosto de fermentación.

35

Los diferentes estudios técnicos y económicos demuestran la necesidad de reducir los costes ligados a la etapa de hidrólisis enzimática para llevar el coste del etanol producido a unos valores próximos al etanol obtenido a partir de almidón.

40

Uno de los medios de reducción de los costes consiste en optimizar las condiciones operativas del procedimiento de producción de celulasas de tal modo que se aumente la productividad o que se obtenga un cóctel enzimático con una actividad específica mejorada.

45

El microorganismo más utilizado para la producción de celulasas es el hongo filamentoso *Trichoderma reesei*. Las cepas salvajes tienen la facultad de secretar, en presencia de un sustrato inductor como, por ejemplo, la celulosa o la lactosa, un complejo enzimático bien adaptado a la hidrólisis de la celulosa. Las enzimas del complejo enzimático contienen tres grandes tipos de actividad: las endoglucanasas, las exoglucanasas y las celobiasas.

50

Los mecanismos complejos de regulación de la síntesis de las celulasas precisan unas implementaciones específicas para su producción en un reactor. El empleo de cepas no sensibles a la represión catabólica y de sustratos inductores solubles y utilizables a gran escala, como la lactosa, ha permitido obtener grandes producciones del orden de 40 g/l de proteínas extracelulares mediante *T. reesei* CL 847 de acuerdo con un procedimiento descrito en Bioresource Technol. (1992) 39, pág. 125-130. En este procedimiento, la fermentación se desarrolla en dos fases, una primera fase en lotes de producción de células de *T. reesei*, y una segunda fase de alimentación en modo de alimentación por lotes del inductor a una velocidad que evita su acumulación en el medio.

55

Al no mantenerse siempre el estado fisiológico del microorganismo en su estado óptimo para la producción de enzimas, se observan en determinados casos fenómenos de crecimiento de células no productivas, de lisis celular o de esporulación no deseada, que implican la disminución de la productividad de enzimas. El equilibrio entre los estados de producción óptima y los estados fisiológicos indeseables es bastante sensible. Bailey y otros (Appl. Microbiol. Biotechnol., 2003, 62: págs. 156-162) ha demostrado que la productividad de las celulasas era óptima cuando las células estaban en un estado cercano al límite de sustrato carbonado en el medio. Este propuso un procedimiento de adición de sustrato carbonado que aplica el seguimiento de la tasa de consumo de base utilizada para el control del pH.

60

65

Por otra parte, el procedimiento que se describe en la patente EP-B1-0448430 precisa un aporte optimizado del flujo de azúcar de entre 35 y 45 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. En efecto, un flujo demasiado alto lleva a una acumulación de sustrato carbonado en el medio, lo que conduce a un cambio metabólico hacia la producción de biomasa en lugar de la producción de enzimas. Un flujo demasiado bajo conduce, por su parte, a una lisis de la biomasa y a una pérdida de producción. Además, el *Trichoderma reesei* excreta entonces más proteasas que vuelven a consumir una parte de las celulasas producidas.

La presente invención propone un procedimiento que permite mantener el microorganismo en el estado correspondiente a su estado óptimo para la producción de enzimas.

Resumen de la invención

La invención propone un procedimiento de producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas en el cual el aporte de sustrato inductor carbonado necesario para la fase de producción se regula mediante una oscilación de la presión de oxígeno disuelto en el medio.

Descripción de los dibujos

La figura 1 representa el registro de la presión de oxígeno disuelto en el medio en función del tiempo así como el caudal de aporte de sustrato carbonado.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas mediante un microorganismo celulolítico en un biorreactor agitado y ventilado que comprende una fase de crecimiento en presencia de una fuente de carbono y una fase de producción en presencia de un sustrato inductor carbonado en el cual el aporte de sustrato inductor carbonado durante la fase de producción se regula en función de la presión parcial de oxígeno disuelto en el medio de crecimiento, oscilando dicha presión entre dos valores $\text{PO}_{2\text{min}}$ y $\text{PO}_{2\text{max}}$, siendo el valor de $\text{PO}_{2\text{min}}$ superior a la presión crítica $\text{PO}_{2\text{critica}}$ por debajo de la cual la actividad del microorganismo se ve afectada e inferior al 95 % de la presión parcial de oxígeno con saturación $\text{PO}_{2\text{sat}}$ fijada en el arranque del biorreactor, y siendo el valor de $\text{PO}_{2\text{max}}$ superior al menos en un 5 % a $\text{PO}_{2\text{min}}$, realizándose la adición de sustrato inductor carbonado en cuanto la presión parcial de oxígeno disuelto en el medio es superior al valor de $\text{PO}_{2\text{max}}$ y se detiene en cuanto la presión de oxígeno disuelto en el medio es inferior al valor $\text{PO}_{2\text{min}}$.

Este procedimiento permite optimizar la producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas manteniendo las células en una fase de productividad óptima.

Por medio del procedimiento de acuerdo con la invención, se puede producir un cóctel enzimático que presenta una actividad específica hasta un 50 % más elevada que la de las enzimas obtenidas con un procedimiento clásico de producción en el que el límite de carbono se impone con un caudal constante.

Además, este procedimiento presenta la ventaja de ser robusto y fácil de implementar. También permite evitar la acumulación de azúcares en el medio, lo que conduce a la formación de biomasa en detrimento de la producción de enzimas.

Las cepas de microorganismos utilizadas se cultivan en biorreactores agitados y ventilados en unas condiciones compatibles con su crecimiento y la producción de enzimas.

Al inicio de la fermentación, el biorreactor está saturado en oxígeno y la presión parcial de oxígeno disuelto en el medio que corresponde a la saturación se designa $\text{PO}_{2\text{sat}}$.

La fuente de carbono utilizada para la fase de crecimiento se introduce en el biorreactor de tal modo que tenga una concentración inicial en azúcar para el comienzo de la fase de producción comprendida entre 15 y 60 g/l.

Durante la fase de crecimiento, la ventilación se fija en un valor que selecciona el operario y la presión parcial de oxígeno PO_2 se regula en un porcentaje, definido por el operario, de la presión en saturación gracias a la agitación. La presión parcial de oxígeno en el medio debe ser superior a la presión crítica de oxígeno $\text{PO}_{2\text{critica}}$ por debajo de la cual la actividad del microorganismo se ve afectada.

Este valor de $\text{PO}_{2\text{critica}}$ lo conoce el experto en la materia y es dependiente del microorganismo utilizado. Se puede definir como la presión por debajo de la cual el metabolismo del microorganismo se ve afectado por una reducción de la viabilidad celular o de la producción de metabolitos de interés.

Durante la fase de producción, la agitación y la ventilación dentro del biorreactor se fijan en un valor predefinido que permite tener una capacidad de oxigenación de dicho biorreactor, que corresponde a una K_{La} comprendida entre 50 y 150 h^{-1} según la biomasa considerada inicialmente.

En el procedimiento de acuerdo con la invención, el sustrato inductor carbonado se introduce tras el agotamiento del sustrato inicial: se trata del comienzo de la fase de producción.

5 La velocidad de consumo de oxígeno en el medio es proporcional a la velocidad de consumo de sustrato inductor carbonado por el microorganismo.

De este modo, una baja acumulación de azúcar en el fermentador conduce a una caída de la presión parcial de oxígeno. Cuando la presión parcial de oxígeno medida alcanza un valor mínimo PO_{2min} , la regulación del sistema detiene la adición de sustrato inductor carbonado. Este paro provoca una reducción de la velocidad de consumo del sustrato inductor carbonado en el momento en que la concentración de este se acerca a la constante de afinidad K_s del microorganismo para el sustrato carbonado. El paro también provoca una disminución de la velocidad de consumo de oxígeno, lo que se traduce en un aumento de la presión parcial de oxígeno hasta un valor PO_{2max} . Cuando se alcanza la presión PO_{2max} , la regulación del sistema hace que se vuelva a poner en marcha la bomba de adición del sustrato inductor carbonado.

15 Los valores PO_{2min} y PO_{2max} entre los cuales oscila la presión parcial de oxígeno disuelto en el medio de fermentación las determina el operario a partir de la presión de saturación de oxígeno PO_{2sat} , en función de las cepas de microorganismos utilizadas y/o del medio de fermentación.

20 La amplitud de las oscilaciones entre los valores PO_{2min} y PO_{2max} regula el intervalo de tiempo entre los instantes en que se inyecta el sustrato carbonado inductor y los instantes en que se detiene la inyección.

De este modo, las celulasas se mantienen en consecuencia en un estado cercano al límite de carbono (con una concentración cercana a K_s), por lo tanto favorable para una producción óptima de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas.

De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, la adición de sustrato inductor carbonado se lleva a cabo en cuanto la presión parcial de oxígeno disuelto en el medio es superior al valor PO_{2max} y se detiene en cuanto la presión de oxígeno disuelto en el medio es inferior al valor PO_{2min} . Los valores PO_{2max} y PO_{2min} se determinan en función de la presión crítica de oxígeno y de la presión de saturación del medio en oxígeno PO_{2sat} cuando se pone en marcha el biorreactor.

30 El valor PO_{2min} debe ser superior a la presión crítica $PO_{2critica}$ por debajo de la cual el metabolismo del microorganismo se ve afectado y es inferior al 95 % de la presión parcial de oxígeno con saturación PO_{2sat} fijada cuando se pone en marcha el biorreactor.

De manera preferente, PO_{2min} está comprendida entre un 10 y un 60 % de PO_{2sat} .

40 El valor PO_{2max} debe ser superior al menos en un 5 % al valor de PO_{2min} . Este puede representar el 100 % de la presión parcial de oxígeno PO_{2sat} .

De manera preferente PO_{2max} está comprendida entre un 30 y un 70 % de PO_{2sat} .

45 De acuerdo con un modo muy preferente, PO_{2max} está comprendida entre un 40 y un 60 % de PO_{2sat} y PO_{2min} está comprendida entre un 30 y un 50 % de PO_{2sat} .

50 El sustrato inductor carbonado se selecciona entre la lactosa, la xilosa, la celobiosa, la soforosa, los residuos obtenidos tras la fermentación etanólica de los azúcares monómeros de los hidrolizados enzimáticos de biomasa celulósica y/o un extracto bruto de pentosas hidrosolubles procedentes del pretratamiento de una biomasa celulósica.

De acuerdo con un modo preferente de realización, el aporte de sustrato se realiza en solución.

55 Se prepara una solución acuosa, que contiene el sustrato inductor carbonado seleccionado para la fase de producción de las enzimas, con una concentración de entre 10 y 800 g/l, y de manera preferente entre 150 y 600 g/l.

La solución acuosa que comprende el sustrato inductor carbonado es, de preferencia, una solución de lactosa.

60 De manera ventajosa, se utilizará una solución de lactosa con 250 g/l.

El sustrato carbonado utilizado durante la fase por lotes se selecciona entre la glucosa, la galactosa, el glicerol y los residuos obtenidos tras la fermentación etanólica de los azúcares monómeros de los hidrolizados enzimáticos de biomasa celulósica y/o un extracto bruto de pentosas hidrosolubles procedentes del pretratamiento de una biomasa celulósica.

65

El microorganismo celulolítico se selecciona entre los hongos u otros microorganismos modificados (levaduras, bacterias). De manera preferente, el microorganismo celulolítico pertenece a los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Schizophyllum*, y de manera más preferente a la especie *Trichoderma reesei*.

- 5 El procedimiento que se describe en la presente invención propone una regulación del aporte de sustrato inductor carbonado en función de la presión parcial de oxígeno disuelto en el medio. Una regulación en función de la velocidad de producción de dióxido de carbono o de consumo de dióxígeno calculadas a partir de la composición del gas medido en la salida constituiría un medio equivalente de realización de la presente invención.

10 Ejemplos

Entre los siguientes ejemplos, el ejemplo 1 presenta la fermentación de referencia que utiliza la lactosa como sustrato carbonado de producción con un caudal optimizado de entre 35 y 45 mg.g⁻¹.h⁻¹ que permite una elevada producción de proteínas.

- 15 El ejemplo 2 representa el mismo experimento con un flujo de sustrato carbonado duplicado durante la fase de producción. Este ejemplo ha conducido a una gran acumulación de biomasa. Demuestra el riesgo que se corre cuando el flujo de sustrato carbonado es superior al flujo óptimo.

- 20 Los ejemplos 3 a 5 son aquellos de acuerdo con el procedimiento de la presente invención. El ejemplo 3 retoma el mismo caudal que el ejemplo 1 y el ejemplo 4 el mismo caudal que el ejemplo 2. Este último ejemplo demuestra la robustez del procedimiento ya que este conduce a una elevada producción de proteínas y no se produjo acumulación de biomasa durante la fase de producción. El ejemplo 5 ilustra un intervalo de oscilaciones más amplio.

- 25 Ejemplo 1 (comparativo): Producción de enzimas de acuerdo con un procedimiento de fermentación clásico como se describe en la patente FR-B-2 811 753.

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

- 35 El fermentador que contiene el medio mineral se esteriliza a 120 °C durante 20 minutos, la fuente carbonada de glucosa se esteriliza aparte a 120 °C durante 20 minutos y a continuación se añade de forma estéril en el fermentador de tal modo que se tenga una concentración final de 15 g/l. El fermentador se siembra al 10% (v/v) con un precultivo líquido de la cepa de *Trichoderma reesei* CL847. El medio mineral del precultivo es idéntico al del fermentador dejando aparte la adición de ftalato de potasio con 5 g/l para tamponar el pH. El crecimiento del hongo en precultivo se hace utilizando la glucosa como sustrato carbonado, con una concentración de 30 g/l. El crecimiento de la sustancia inoculada dura entre 2 y 3 días, y se lleva a cabo a 28 °C en una incubadora con agitación. El traslado hacia el fermentador se realiza si la concentración residual en glucosa es inferior a 15 g/l.

El experimento llevada a cabo en el biorreactor comprende dos fases:

- 45 - una fase de crecimiento sobre un sustrato carbonado de glucosa (concentración inicial 15 g/l) a una temperatura de 27 °C y un pH de 4,8 (regulado con amoníaco 5,5 M). La ventilación es de 0,5 vvm (volumen/volumen/minuto) y la presión parcial de oxígeno disuelto en el medio es del 40 % de PO_{2sat};
- 50 - una fase de producción de enzimas. Cuando el sustrato inicial del fermentador se agota, la solución de lactosa con 250 g/l se inyecta de manera continua a 2ml/h que corresponde al caudal de entre 35 y 45 mg por g de células y por hora hasta 200 horas. La temperatura se baja a 25 °C y el pH se mantiene en 4 hasta el final del cultivo. El pH se regula mediante la adición de una solución de amoníaco a 5,5 N que aporta el nitrógeno necesario para la síntesis de las proteínas secretadas. El contenido en oxígeno disuelto se mantiene en el 40 % de PO_{2sat}.

- 55 La producción de enzimas se continúa con la dosificación de las proteínas extracelulares mediante el método de Lowry y estándar BSA, tras la separación del micelio por filtración o centrifugación. Las actividades celulolíticas determinadas son:

- 60 - la actividad papel filtro (UPF: unidad de papel filtro) que permite dosificar la actividad global de la reserva enzimática de endoglucanasas y exoglucanasas;
- la actividad aril β-glucosidasa.

- 65 La actividad UPF se mide en papel Whatman n.º 1 (procedimiento recomendado por la comisión biotecnológica IUPAC) en la concentración inicial de 50 g/l; se determina la muestra para el ensayo de la solución enzimática que hay que analizar, la cual libera el equivalente de 2 g/l de glucosa (dosificación colorimétrica) en 60 minutos. El principio de la actividad papel filtro es determinar mediante dosificación con DNS (ácido dinitrosalicílico) la cantidad

de azúcares reducidos procedentes de un papel Whatman nº. 1.

El sustrato utilizado para determinar la actividad aril β -glucosidasa es la p-nitrofenil- β -D-glucopiranosida (PNPG). Lo divide la β -glucosidasa que libera el p-nitrofenol.

5 Una unidad de actividad aril β -glucosidasa se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μ mol de p-nitrofenol a partir de PNPG por minuto y se expresa en IU/ml.

10 Las actividades específicas se obtienen dividiendo las actividades expresadas en IU/ml por la concentración de proteínas. Estas se expresan en IU/mg.

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

15 Biomasa g/l 14,5;
Proteínas g/l 35,6;
UPF IU/ml 18,7;
UPF específica IU/mg 0,52;
aril β -Glucosidasa específica 0,95 IU/mg.

20 Ejemplo 2 (comparativo): Producción de enzimas con un flujo duplicado de sustrato carbonado durante la fase de alimentación por bloques con respecto al del ejemplo 1.

25 La producción de enzimas se lleva a cabo en las mismas condiciones que en el ejemplo 1. Tras 30 horas de crecimiento, tras el agotamiento del sustrato inicial, la solución de alimentación por bloques se inyecta con un caudal duplicado (4 ml/h en lugar de 2 ml/h) con respecto al experimento del ejemplo 1. Esto conduce a una elevada formación de biomasa y una baja producción de proteínas. El rendimiento de producción de proteínas con respecto al sustrato carbonado es de 0,1 g/g mientras que es de 0,3 g/g en el ejemplo 1.

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

35 Biomasa g/l 35,4;
Proteínas g/l 16,8;
UPF IU/ml 11,7;
UPF específica 0,70 IU/mg;
aril β -Glucosidasa específica 2,02 IU/mg.

Ejemplo 3 (de acuerdo con la invención): Producción de enzimas regulando el aporte del azúcar mediante la regulación de la presión parcial de oxígeno disuelto en el medio (flujo 2 ml/h)

40 La producción de enzimas se lleva a cabo en las mismas condiciones que en el ejemplo 1. Tras el agotamiento del sustrato carbonado de la fase de crecimiento, el caudal de ventilación se mantiene a 0,5 vvm y la agitación a 800 rpm. Lo que permite en el caso del fermentador utilizado tener un K_{La} superior a 70 h^{-1} . El sustrato carbonado se añade en función del valor de la PO_2 . El flujo de sustrato se inicia cuando la presión parcial de oxígeno es superior al 50 % de la presión de oxígeno con saturación con un caudal de 2 ml/h y se detiene cuando esta es inferior al 40 % de la presión parcial de oxígeno con saturación (véase la figura 1).

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

50 Biomasa g/l 13,5;
Proteínas g/l 40,6;
UPF IU/ml 28,1;
UPF específica 0,69 IU/mg;
aril β -Glucosidasa específica 1,97 IU/mg.

55 El rendimiento final de producción de proteínas con respecto al sustrato carbonado es de 0,4 g/g. La actividad específica FPasa del cóctel enzimático producido se mejora en un 33 %.

Ejemplo 4: Producción de enzimas regulando el aporte del azúcar mediante la regulación de la presión parcial de oxígeno con un caudal duplicado con respecto al ejemplo 3 (flujo 4 ml/h)

60 La producción de enzimas se lleva a cabo en las mismas condiciones que en el ejemplo 3. El sustrato carbonado se añade en función del valor de la PO_2 . El caudal de sustrato se inicia cuando la presión parcial de oxígeno es superior al 50 % de la presión de oxígeno con saturación con un caudal de 4 ml/h en lugar de 2 ml/h y se detiene cuando esta es inferior al 40 % de la presión de oxígeno con saturación. Esto permite probar el efecto de un mayor aporte de
65 azúcar.

Este ejemplo demuestra la robustez del procedimiento. El hecho de duplicar el caudal no conduce a una acumulación de la biomasa como en el caso del ejemplo 2 gracias a la regulación. Esto significa que aunque la concentración del sustrato carbonado en la cuba de alimentación es variable (lo que puede suceder a escala industrial), el procedimiento se auto-regula para mantener el flujo óptimo para la producción de enzimas.

5 Las determinaciones analíticas en el mosto final dan los siguientes resultados:

10 Biomasa g/l 16,1;
Proteínas g/l 43,6;
UPF IU/ml 33,9;
UPF específica 0,78 IU/mg;
amil β -Glucosidasa específica 1,60 IU/mg.

15 El rendimiento final de producción de proteínas con respecto al sustrato carbonado es de 0,4 g/g. La actividad específica FPasa del cóctel enzimático producido se mejora en un 50 % con respecto al ejemplo 1.

Ejemplo 5: Producción de enzimas regulando el aporte del azúcar mediante una oscilación de la presión parcial de oxígeno entre un 20 y un 80 %

20 La producción de enzimas se lleva a cabo en las mismas condiciones que en el ejemplo 4. El sustrato carbonado se añade en función del valor de la PO_2 . El caudal de sustrato se inicia cuando la presión parcial de oxígeno es superior al 80 % de la presión de oxígeno con saturación con un caudal de 4 ml/h y se detiene cuando esta es inferior al 20 % de la presión de oxígeno con saturación. Esto permite probar el efecto de una mayor amplitud de oscilación.

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

30 Biomasa g/l 13,6;
Proteínas g/l 21,8;
UPF IU/ml 20,4;
UPF específica 0,93 IU/mg;
 β -Glucosidasa específica 2,14 IU/mg.

35 La producción final de proteínas es más baja ya que la cantidad de sustrato inyectado es menor. Se constata sin embargo que las actividades específicas del cóctel enzimático son mayores que las del ejemplo 4 (oscilación de la PO_2 entre un 40 y un 50 %). Las condiciones utilizadas a lo largo del ejemplo 4 son más interesantes ya que permiten tener una productividad y un rendimiento más elevados.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas mediante un microorganismo celulolítico en un biorreactor ventilado y agitado que comprende una fase de crecimiento en presencia de una fuente de carbono y una fase de producción en presencia de un sustrato inductor carbonado en el cual el aporte de sustrato inductor carbonado durante la fase de producción se regula en función de la presión parcial de oxígeno disuelto en el medio de crecimiento, oscilando dicha presión entre dos valores PO_{2min} y PO_{2max} , siendo el valor de PO_{2min} superior a la presión crítica $PO_{2critica}$ por debajo de la cual el metabolismo del microorganismo se ve afectado e inferior al 95 % de la presión parcial de oxígeno con saturación PO_{2sat} fijada cuando se arranca el biorreactor, y siendo el valor de PO_{2max} superior al menos en un 5 % a PO_{2min} , realizándose la adición de sustrato inductor carbonado en cuanto la presión parcial de oxígeno disuelto en el medio es superior al valor de PO_{2max} y se detiene en cuanto la presión de oxígeno disuelto en el medio es inferior al valor PO_{2min} .
- 15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual PO_{2max} está comprendida entre un 30 y un 70 % de PO_{2sat} y PO_{2min} está comprendida entre un 10 y un 60 % de PO_{2sat} .
- 20 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 en el cual PO_{2max} está comprendida entre un 40 y un 60 % de PO_{2sat} y PO_{2min} está comprendida entre un 30 y un 50 % de PO_{2sat} .
- 25 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores en el cual el sustrato inductor carbonado se selecciona entre la lactosa, la xilosa, la celobiosa, la soforosa, los residuos obtenidos tras la fermentación etanólica de los azúcares monómeros de los hidrolizados enzimáticos de biomasa celulósica, y/o un extracto bruto de pentosas hidrosolubles procedentes del pretratamiento de una biomasa celulósica.
- 30 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores en el cual el aporte de sustrato se realiza en solución.
- 35 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 en el cual el sustrato inductor carbonado seleccionado para la fase de producción de las enzimas se encuentra en una concentración de entre 10 y 800 g/l, de preferencia en una concentración entre 150 y 600 g/l.
- 40 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 o 6 en el cual el sustrato inductor carbonado es una solución de lactosa, de preferencia en una concentración de 250 g/l.
8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores en el cual la agitación y la ventilación del biorreactor se fijan en un valor predefinido que permite tener una capacidad de oxigenación de dicho biorreactor comprendida entre 50 y 150 h^{-1} .
9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores en el cual el microorganismo celulolítico se seleccionado entre los hongos que pertenecen a los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Schizophyllum*.
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 en el cual el microorganismo celulolítico pertenece a la especie *Trichoderma reesei*.

Figura 1

