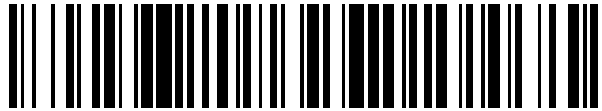


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 459**

51 Int. Cl.:

C12N 9/42

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2012 E 12758533 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 2744899**

54 Título: **Método de producción de celulasas con un hongo filamentoso adaptado a un fermentador que tiene un coeficiente de transferencia volumétrica de oxígeno $K_L a$ bajo**

30 Prioridad:

19.08.2011 FR 1102556

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

25.05.2016

73 Titular/es:

**IFP ÉNERGIES NOUVELLES (33.3%)
1 & 4, avenue de Bois-Préau
92852 Rueil-Malmaison Cedex, FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (33.3%) y
AGRO INDUSTRIE RECHERCHES ET
DEVELOPPEMENTS (33.3%)**

72 Inventor/es:

**BEN CHAABANE, FADHEL;
JOURDIER, ETIENNE;
COHEN, CÉLINE y
CHAUSSEPIED, BERNARD**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 571 459 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

Método de producción de celulasas con un hongo filamentoso adaptado a un fermentador que tiene un coeficiente de transferencia volumétrica de oxígeno $k_L a$ bajo.

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un método de producción de celulasas con un hongo filamentoso, necesario para la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica realizado, por ejemplo, en los métodos de producción de biocombustibles denominados de segunda generación u otros métodos de industrias químicas, papeleras o textiles.

Técnica anterior

15 El desarrollo de métodos económicamente viables de producción de biocombustibles de 2ª generación es en la actualidad un tema muy amplio. Estos últimos se producen a partir de biomasa lignocelulósica y plantean menos problemas de competencia de uso de las tierras agrícolas con los alimentos, en comparación con los biocombustibles denominados de primera generación que se producen a partir de caña de azúcar, maíz, trigo o remolacha.

20 La biomasa lignocelulósica se caracteriza por una estructura compleja que consiste en tres fracciones principales: celulosa, hemicelulosas y ligninas. De forma clásica, el método de su transformación en etanol comprende varias etapas. El tratamiento previo permite hacer que la celulosa sea accesible a enzimas que son celulasas. La etapa de hidrólisis enzimática permite la transformación de la celulosa en glucosa que se transforma a continuación en etanol durante la etapa de fermentación en general por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Por último, la etapa de destilación permitirá separar y recuperar el etanol a partir del caldo de fermentación.

30 Los diferentes estudios técnicos y económicos demuestran que la reducción del coste de las celulasas es uno de los puntos clave de los métodos de producción biológica de etanol a partir de materias primas lignocelulósicas. En la actualidad, las celulasas industriales se producen principalmente por un hongo filamentoso, *Trichoderma reesei*, debido a su elevado poder de secreción. La estrategia que se aplica a nivel industrial es conseguir un rápido crecimiento del hongo hasta una concentración dada y a continuación inducir la producción de celulasas para maximizar la productividad y el rendimiento. *Trichoderma reesei* es estrictamente aerobio y su crecimiento conduce a un fuerte aumento de la viscosidad del medio que dificulta la transferencia de oxígeno necesaria para su supervivencia. Esta última está vinculada a la $K_L a$ que se denomina coeficiente de transferencia volumétrica de oxígeno reducido a la unidad de volumen de medio. Es el producto del coeficiente K_L (coeficiente de intercambio global de O_2 en $m \cdot s^{-1}$ o $m \cdot h^{-1}$) y del coeficiente "a" (zona de intercambio específico reducida a la unidad de volumen de fase líquida de medio de cultivo, en m^2 por m^3 de medio de cultivo). El $K_L a$ es proporcional a la agitación y a la aireación. Para satisfacer la demanda biológica de oxígeno que aumenta durante la fase de crecimiento del hongo, es necesario aumentar la transferencia de oxígeno que se realiza por lo general mediante un aumento de la agitación o del caudal de aireación. Esto se traduce en un aumento del gasto de energía del método (potencia del motor para la agitación y compresor para la aireación) con, en consecuencia, un aumento en los costes de operación. Los costes asociados con la agitación y la aireación pueden representar hasta un 50 % de los costes de operación del método de producción de celulasas.

45 Una de las vías de disminución del coste de producción de las enzimas es por lo tanto reducir los costes de funcionamiento mediante la modificación de la realización del método para minimizar el $K_L a$ necesario a la vez que se mantiene la productividad por celulasas. Además, esto permite simplificar el estudio de la realización de escalado (o "scale-up" en inglés) para el diseño del fermentador industrial (por lo general, de 100 a 1000 m^3) que se hace difícil para valores de $K_L a$ superiores a 200 h^{-1} .

50 Las enzimas del complejo enzimático de *Trichoderma reesei* contienen tres tipos principales de actividades: endoglucanasas, exoglucanasas y celobiasas o beta-glucosidasas. Otras proteínas que poseen funciones o actividades indispensables para la hidrólisis de materiales lignocelulósicos también son producidas por *Trichoderma reesei* por ejemplo las xilanasas. La presencia de un sustrato inductor es indispensable para la expresión de las enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas.

60 La regulación de genes de celulasas en diferentes fuentes de carbono se ha estudiado con detalle. Ellos se inducen en presencia de celulosa, sus productos de hidrólisis (por ejemplo, celobiosa) o ciertos oligosacáridos como lactosa o soforosa (Ilmén *et al.*, 1997; Appl. Environ. Microbiol. 63: 1298-1306). Las técnicas de genética clásica por mutación permitieron la selección de cepas de *Trichoderma reesei* hiperproductoras de celulasas tales como las cepas MCG77 (Gallo – documento de 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". Paris. H. HESLOT Ed, pp 39-50).

65

Para obtener buenas productividades de enzimas, los métodos industriales que producen celulasas tal como por ejemplo el que se describe en el documento de patente FR 2 881 753 se realizan en dos etapas:

- una etapa de crecimiento en modo "discontinuo" en el que es necesario proporcionar una fuente de carbono de asimilación rápida para el crecimiento de *Trichoderma reesei*, a continuación
- una etapa de producción en modo "semicontinuo" usando un sustrato inductor como por ejemplo la lactosa que permite la expresión de las celulasas y la secreción en el medio de cultivo. La alimentación continua de estos sustratos de carbono solubles, limitando la concentración residual en los cultivos y optimizando la cantidad de azúcar, permite obtener altas productividades enzimáticas. El flujo óptimo de fuente de carbono aplicado en el documento de patente mencionado está comprendido entre 35 mg y 45 mg (de azúcar).g (de peso seco celular)⁻¹.h⁻¹.

Este protocolo presenta el inconveniente de que requiere un gran gasto de energía para satisfacer la demanda de oxígeno del microorganismo. Al final de la fase de crecimiento, la demanda de oxígeno es muy elevada. De hecho, cuando todos los sustratos están disponibles en exceso, el crecimiento se realizará a una tasa de crecimiento cercana a la tasa máxima de crecimiento de la cepa. La demanda biológica de oxígeno que es una función de la tasa de crecimiento y de la concentración de la biomasa aumentará. Como los cultivos se preparan regulando la concentración de oxígeno disuelto a un valor constante, la tasa de transferencia de oxígeno VTO debe ser igual a la tasa de consumo de oxígeno VCO (o demanda biológica de oxígeno).

$$k_L a^*(O_2^* - O_{2L}) = (\mu * X) / R_{X/O_2}$$

con:

- O₂* : concentración de oxígeno en la saturación
- O_{2L} : concentración de oxígeno en la fase líquida
- μ : tasa de crecimiento del microorganismo (h⁻¹)
- R_{X/O₂} : rendimiento de la biomasa celular con respecto al oxígeno consumido
- X = concentración de biomasa (peso seco) celular.

Por lo tanto, este tipo de método necesita un k_{La} muy elevado para satisfacer esta demanda. Por lo general, esto se realiza mediante un aumento de la agitación (o de la aireación) que consume energía eléctrica.

Con un k_{La} 2 veces más bajo, la biomasa máxima que es posible conseguir con la misma tasa de crecimiento es 2 veces más baja. Es posible conseguir la misma cantidad de biomasa con una tasa de crecimiento más baja pero esto necesita más tiempo y por lo tanto implica una disminución de la productividad final de enzimas secretadas. La presente invención permite controlar mejor la demanda biológica de oxígeno sin disminuir la productividad de enzimas. Esto se consiguió mediante el uso de las características fisiológicas de los hongos filamentosos tales como *Trichoderma reesei* en estado de limitación por el sustrato de carbono.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un método de producción de celulasas con un hongo filamentoso que permite mantener los rendimientos de la productividad de enzimas usando un biorreactor que tiene un coeficiente de transferencia volumétrica de oxígeno k_{La} bajo.

Descripción de las figuras

La Figura 1 representa una comparación de los valores simulados con el modelo con los valores experimentados mencionados en el artículo de Tolan y Foody (1999) obtenidos con otra cepa de *Trichoderma reesei*.

La Figura 2 representa la evolución de la concentración de biomasa, en proteínas y del k_{La} que corresponde al ejemplo 1.

La Figura 3 representa la evolución de las variables de estado durante el tiempo que corresponde al ejemplo 2.

La Figura 4 representa la evolución de las variables de estado durante el tiempo que corresponde al ejemplo 3.

La Figura 5 representa la evolución del k_{La} de las variables de estado durante el tiempo que corresponde al ejemplo 3.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método de producción de celulasas con una cepa de hongo filamentoso, en biorreactor agitado y aireado que comprende al menos dos etapas:

- la primera etapa de crecimiento en presencia de al menos un sustrato de carbono de crecimiento en fase discontinua con una concentración de sustrato de carbono de crecimiento comprendida entre 10 y 80 g/l.
- una segunda etapa de crecimiento y de producción en presencia de al menos un sustrato de carbono inductor en fase semicontinua en presencia de un flujo limitante de fuente de carbono comprendido entre 50 y 140 mg por gramo de células y por hora.

De manera preferente, la concentración de sustrato de carbono de crecimiento está comprendida entre 10 y 20 g/l. Incluso de manera más preferente, está comprendida entre 12 y 17 g/l.

Durante la fase de crecimiento, la concentración de sustrato de carbono es tal que el crecimiento se realiza a una tasa máxima de crecimiento.

De manera preferente, la concentración de sustrato de carbono inductor usada en fase semicontinua está comprendida entre 70 y 100 mg por gramo de células y por hora. Incluso de manera más preferente, está comprendida entre 80 y 90 mg por gramo de células y por hora.

El biorreactor usado en la presente invención también puede tener un coeficiente de transferencia volumétrica de oxígeno k_La comprendido entre 40 y 180 h^{-1} , preferentemente entre 40 y 150 h^{-1} .

La segunda etapa se realiza en condición de limitación del sustrato de carbono inductor con un flujo inferior a la capacidad máxima de consumo de la cepa.

El sustrato de carbono de crecimiento se elige preferentemente entre lactosa, glucosa, xilosa, los restos obtenidos después de fermentación etanólica de azúcares monómeros de hidrolizados enzimáticos de biomasa celulósica, y/o un extracto bruto de pentosas hidrosolubles que provienen del tratamiento previo de una biomasa celulósica.

El sustrato de carbono inductor se elige preferentemente entre lactosa, celobiosa, soforosa, los restos obtenidos después de fermentación etanólica de azúcares monómeros de hidrolizados enzimáticos de biomasa celulósica, y/o un extracto bruto de pentosas hidrosolubles que provienen del tratamiento previo de una biomasa celulósica.

Los sustratos de crecimiento e inductores mencionados anteriormente se pueden usar solos o en mezcla. De acuerdo con su naturaleza, el sustrato de carbono de crecimiento elegido para la obtención de la biomasa se introduce en el fermentador antes de esterilización o se esteriliza por separado y se introduce en el biorreactor después de esterilización.

El sustrato de carbono inductor introducido durante la fase semicontinua se esteriliza de manera independiente, antes de ser introducido en el reactor.

De manera preferente, cuando la fuente de carbono inductora es la lactosa, la solución acuosa se prepara a la concentración de 200-250 $g.l^{-1}$.

El método de acuerdo con la presente invención permite obtener una productividad análoga de celulasas usando un biorreactor que tiene una capacidad de transferencia de oxígeno dos veces y media más baja, es decir un K_La de 100 h^{-1} en lugar de 250 h^{-1} . La correlación entre el K_La a la potencia disipada en los biorreactores aireados y agitados, tal como la que se indica por ejemplo en el informe de NREL "Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and economic utilizing co-current Dilute acide pre-hydrolysis and enzymatic hydrolysis current and futuristic scenarios", R Wooley *et al.* NREL/TP-580-26157 (1999), sección de producción de enzimas, es la siguiente:

$$K_La = 0,026*(P/V)^{0.4}*V_G^{0.5}$$

con:

- PN : potencia disipada en W/m^3
- V_G : velocidad superficial de gas (m/s).

Por lo tanto, de acuerdo con esta correlación, la potencia disipada (PN) para un K_La de 100 h^{-1} es aproximadamente 10 veces inferior a la necesaria cuando el K_La tiene un valor de 250 h^{-1} .

Las ventajas del método de acuerdo con la presente invención es permitir una simplificación de la extrapolación del método a escala industrial (por lo general de 100 à 1000 m³) y una reducción de los costes de funcionamiento.

5 El método es sencillo, robusto y usar las propiedades fisiológicas del hongo en condiciones de limitación por el sustrato de carbono.

El modo de realización se ha adaptado con respecto al método clásico, por un lado disminuyendo la concentración inicial de sustrato de crecimiento durante la primera fase del método en modo « discontinuo » para disminuir la demanda biológica máxima de oxígeno al final de esta fase y por otro lado aumentando el flujo de sustrato de carbono durante la fase « semicontinua » para continuar, durante el comienzo de esta fase, produciendo, una tasa de crecimiento reducida, de la biomasa celular al mismo tiempo que las enzimas. Las propiedades fisiológicas del hongo se usan para determinar el flujo de alimentación semicontinua y la concentración de biomasa deseada.

15 Esto permite mantener los rendimientos finales de productividad del método a la vez que se necesitan capacidades de transferencia de oxígeno inferiores del biorreactor.

La cepa usada en el método es una cepa de un hongo filamentoso que pertenece a los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* o *Schizophyllum*.

De manera preferente, las cepas usadas son cepas que pertenecen a la especie *Trichoderma reesei*.

20 Las cepas industriales usadas pertenecen a la especie *Trichoderma reesei*, opcionalmente modificadas para mejorar las enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas con los métodos de mutación-selección, como por ejemplo la cepa IFP CL847 ; también se pueden usar las cepas mejoradas con las técnicas de recombinación genética. Estas cepas se cultivan en fermentadores agitados y aireados en condiciones compatibles con su crecimiento y la producción de las enzimas. Se pueden usar otras cepas de microorganismos que producen enzimas de acuerdo con métodos similares a los usados para *Trichoderma*.

De manera preferente, la felpa usada es una cepa de *Trichoderma reesei* modificada mediante mutación, selección o recombinación genética.

30 Por ejemplo, la cepa es una cepa CL847, RutC30, MCG77, o MCG80.

Un flujo de de sustrato de carbono inductor q_s superior a aproximadamente 140 mg de azúcar por g de biomasa por h comprende una acumulación de azúcar en el medio y modificar el comportamiento fisiológico de *Trichoderma* dando como resultado una disminución de la velocidad específica de producción de las proteínas q_p (fenómeno de represión catabólica). Limitando este flujo valores comprendidos entre 50 y 140 mg de azúcar por gramo de biomasa y por hora, la cepa se produce de forma simultánea, cuando se encuentra en condición de limitación, de la biomasa y las enzimas, para evolucionar hacia un estado de equilibrio en el que sólo se necesitan enzimas.

35 Se estableció un modelo sobre la base de estas observaciones y se aplicó para estimular la producción de biomasa y enzimas realizada en modo continuo a una tasa de dilución de 0,018 h⁻¹ para diferentes concentraciones iniciales en sustrato de carbono. Las condiciones corresponden a las de los trabajos que se describen en un artículo de Tolan y Foody ("Cellulase from submerged fermentation", (1999), Adv. in biochemical engineering biotechnology, Vol 65, p42-67) que mencionan los trabajos de Nicholson *et al.* (1989) (Proceedings 7th Canadian bioenergy seminar, Energy Mines, and Resources) y proporcionan los resultados experimentales de las concentraciones de biomasa y proteínas. Los inventores han guardado los parámetros genéticos identificados de la cepa CL847 incluso si los autores usan una cepa diferente. Los resultados se informan en la figura 1 y demuestran una adecuación muy buena entre el modelo de la experiencia.

40 Esto también demuestra que este modelo se puede aplicar a otras cepas de *Trichoderma reesei* que tienen el mismo comportamiento fisiológico que la cepa CL847.

La concentración de sustrato de carbono de crecimiento durante la fase discontinua se disminuyó con respecto a la enseñanza de la técnica anterior (FR 2 881753) para disminuir la demanda biológica máxima de oxígeno al final de esta fase ($a_{\mu\text{máx}}$) para un biorreactor con un $k_L a$ de 100 h⁻¹. El flujo de sustrato de carbono se aumenta a continuación durante la fase « semicontinua » con respecto al documento de patente FR 2 881 753 que recomendaba un flujo comprendido entre 35 et 45 mg de sustrato de carbono inductor por gramo de biomasa y por hora. Esto permite continuar produciendo biomasa al mismo tiempo que las enzimas durante el comienzo de esta fase pero a una tasa de crecimiento reducida, lo que permite controlar la demanda biológica de oxígeno. Por lo tanto, el flujo de fuente de carbono durante la fase semicontinua aumenta a un valor superior a 50 mg de azúcar por gramo de biomasa y por hora al comienzo de la fase de alimentación semicontinua. El crecimiento continúa al mismo tiempo que la producción de enzimas y se estabiliza cuando el flujo de fuente de carbono esté cercano al óptimo de la cepa.

Ejemplos

Entre los ejemplos que se indican a continuación, el ejemplo 1 presenta un cultivo que usa las condiciones de referencia del documento de patente FR 2 881 753 con un biorreactor que tiene un k_{La} de 250 h^{-1} . El ejemplo 2 presenta un experimento realizado en las mismas condiciones que las del ejemplo 1 con un fermentador que tiene un k_{La} de 100 h^{-1} . Este ejemplo conduce a una acumulación de sustrato de carbono con una fuerte producción de biomasa y una producción de enzimas baja. El ejemplo 3 es el de la aplicación del método de acuerdo con la presente invención. Permite obtener una productividad análoga a la del ejemplo 1 con un biorreactor que tiene un k_{La} de 100 h^{-1} .

Ejemplo 1: Producción de enzimas sobre glucosa

La producción de celulasas se realiza en fermentador agitado de forma mecánica. El medio mineral tiene la siguiente composición : 1,66 g/l de KOH, 2 ml/l de H_3PO_4 al 85 %, 2,8 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,6 g/l de MgSO_4 , 7 H_2O , 0,6 g/l de CaCl_2 , 3,2 mg/l de MnSO_4 , 2,8 mg/l de ZnSO_4 , 7 H_2O , 104,0 mg/l de CoCl_2 , 10 mg/l de FeSO_4 , 7 H_2O , 1,2 g/l de Macerado de Maíz, 0,5 ml/l de anti-ratón.

El fermentador que contiene el medio mineral se esteriliza a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos, la fuente de carbono es una solución de glucosa esterilizada por separado a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos y después agitada de forma estéril en el fermentador para tener una concentración final de 30 g/l. El fermentador se siembra a un 10 % (v/v) con un precultivo líquido de la cepa CL847 de *Trichoderma reesei*. El medio mineral del precultivo es idéntico al del fermentador aparte de la adición de ftalato de potasio a 5 g/l para taponar el pH. El crecimiento del hongo en precultivo se realiza usando glucosa como sustrato de carbono, a la concentración de 30 g.l^{-1} . El crecimiento del inóculo dura de 2 a 3 días y se realiza a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ en una incubadora agitada a presión atmosférica. La transferencia hacia el fermentador se realiza esta concentración residual de glucosa es inferior a 15 g/l.

El experimento realizado en biorreactor comprende dos fases:

- Una fase de crecimiento sobre sustrato de carbono de glucosa (concentración inicial = 30 g/l) a una temperatura de $27 \text{ }^\circ\text{C}$ y un pH de 4,8 (regulado con una solución de amoníaco 5,5 M). La aireación es de 0,5 vvm y la agitación se aumenta entre 200 y 800 rpm en función de la $p\text{O}_2$ (presión de oxígeno disuelto), que se regula a un 30 %.
- Una fase de producción de enzimas. Después de 30 horas, la solución de lactosa a 250 g.l^{-1} se inyecta de forma continua con un caudal de 35 mg por g de células y por hora hasta 250 horas. La temperatura se reduce a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y el pH a 4 hasta el final del cultivo. El pH se regula mediante la adición de una solución de amoníaco a 5,5 N que proporcionan nitrógeno necesario para la síntesis de las proteínas excretadas. El contenido de oxígeno disuelto se mantiene por encima de un 30 % mediante la acción de la agitación.

La producción de enzimas va seguida de la dosificación de las proteínas extracelulares con el método de Lowry basado sobre una calibración realizada con BSA ("Albumina en suero bovino"), después de separación del micelio por filtración o centrifugación. Las actividades celulolíticas determinadas son:

- La actividad del papel de filtro o FP, expresada en UPF (unidad de papel de filtro) que permite dosificar la actividad global el combinado enzimático de endoglucanasas y exoglucanasas.
- Las actividades de β -glucosidasa y xilanasas para las actividades específicas.

La actividad FP se mide sobre papel Whatman n.º 1 (Procedimiento recomendado por la comisión biotecnológica IUPAC) a la concentración inicial de 50 g.l^{-1} ; se determina la muestra de ensayo de la solución enzimática a analizar que libera el equivalente de 2 g.l^{-1} de glucosa (dosificación colorimétrica) en 60 minutos. El principio de la actividad del papel de filtro es determinar, mediante dosificación al DNS (ácido dinitrosalicílico), la cantidad de azúcares reductores obtenida en un papel Whatman n.º 1. El sustrato usado para determinar la actividad de β -glucosidasa es el p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (PNPG). Se extiende por la β -glucosidasa que libera el p-nitrofenol. Una unidad de actividad de β -glucosidasa se define como la cantidad de enzima necesaria para producir $1 \text{ } \mu\text{mol}$ de p-nitrofenol a partir de PNPG por minuto y se expresa en IU/ml.

El principio de dosificación de la actividad de xilanasas se basa en la determinación por dosificación DNS de la cantidad de azúcares reducidos obtenida de la solución de xilano hidrolizado. Este método de explicación usa las propiedades de reducción de los azúcares y principalmente de la xilosa. La actividad de xilanasas se expresa en IU/ml y corresponde a la cantidad de enzima necesaria para producir $1 \text{ } \mu\text{mol}$ de xilosa por minuto.

Las actividades específicas se obtienen dividiendo las actividades expresadas en IU/ml entre la concentración de proteínas. Se expresan en IU.mg^{-1} .

Los K_{La} se determinan a partir de los equilibrios gaseosos después de verificación de los equilibrios de carbono y redox.

Las determinaciones analíticas con respecto al mosto final del ejemplo 1 proporcionan los siguientes resultados:

Biomasa celular g/l 15,5
Proteínas g/l 50,1

Productividad = 0,20 g/l/h
 UPF 29,1 IU/ml
 Xilanasa específica 8,2 IU/mg
 β -Glucosidasa específica 1,0 IU/mg

5 La figura 2 muestra la evolución de la concentración de biomasa, de proteínas y del K_{La} en el transcurso del tiempo. Se observa que la biomasa celular aumenta hasta 15 g/l durante las primeras 50 horas del experimento y que el K_{La} es de 240 h^{-1} . La concentración de proteínas aumenta ligeramente durante las primeras 50 horas y a continuación bruscamente a partir del momento en el que la concentración de biomasa es estable. Al final del cultivo alcanza 50 g/l.

10 Ejemplo 2

15 El ejemplo 2 se realiza en las mismas condiciones que las del ejemplo 1 excepto que el fermentador usado tiene un K_{La} máximo de 100 h^{-1} y que su volumen inicial es de 750 ml. La fermentación da como resultado una fuerte producción de biomasa celular (45 g/l) y tiene una producción baja de proteínas (19 g/l) (véase la Figura 3). Esto se debe a la presencia de concentraciones residuales importantes de sustrato de carbono (lactosa, glucosa) durante todo el experimento. Esto contiene la producción de celulasas que está inducida en condición de limitación de sustrato de carbono inductor. La glucosa no se consume ya que las capacidades de transferencia de oxígeno del biorreactor son 2,5 veces más bajas, lo que disminuye la velocidad de consumo de sustrato de carbono que es proporcional a la velocidad de consumo de O_2 . De hecho, la velocidad de transferencia de oxígeno se expresa de la manera siguiente:

$$VTO = K_{La} (O_2^* - O_{2L})$$

25 con:

O_2^* : concentración de oxígeno en la saturación
 O_{2L} : concentración de oxígeno en la fase líquida

30 Por lo tanto, la velocidad de consumo de oxígeno está limitada por la VTO que es 2,5 veces más baja. Las determinaciones analíticas sobre el mosto final proporcionan los siguientes resultados:

35 Biomasa celular g/l 45
 Proteínas g/l 19
 UPF 10,1 IU/ml
 Xilanasa específica 8,5 IU/mg
 β -Glucosidasa específica 1,2 IU/mg

40 Ejemplo 3 (de acuerdo con la invención)

45 El biorreactor que tienen un k_{La} de 100 h^{-1} se usa pero el método de producción se modifica para su realización de acuerdo con la presente invención. La concentración de glucosa inicial se reduce de este modo a 15 g/l para que la velocidad biológica máxima de consumo de dioxígeno sea compatible con el fermentador usado. El rendimiento de la producción de biomasa celular con respecto a la glucosa es de 0,5 g/g cuando esta está presente en exceso. Esto quiere decir que la velocidad máxima de consumo de dioxígeno para esta cantidad de glucosa es de $0,5 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (para una tasa de crecimiento máxima de $0,08 \text{ h}^{-1}$ y un rendimiento de conversión de dioxígeno en biomasa en de 1,2 g/g).

50 La fase semicontinua se pone en marcha después de 24 horas con un flujo de 89 mg de sustrato por gramo de biomasa y por hora (solución de lactosa a 250 g/l). La fase de crecimiento continúa al mismo tiempo que la producción de proteínas. Esta última alcanza 51,7 g/l después de 240 horas de experimento (Figura 4). La productividad final de proteínas por lo tanto se mantiene a pesar del uso del fermentador que tiene capacidades de transferencia reducidas. Es de 0,21 g/l/h (siendo de 0,20 g/l/h en el caso del ejemplo 1).

55 La figura 5 ilustra la evolución del k_{La} en el transcurso del experimento que permanece inferior a 100 h^{-1} .

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

60 Biomasa celular g/l 18,9
 Proteínas g/l 51,7
 Productividad = 0,21 g/l/h
 UPF 30,1 IU/ml
 Xilanasa específica 9,5 IU/mg
 β -GLucosidasa específica 1,12 IU/mg

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de producción de celulasas con una cepa que pertenece a un hongo filamentoso, en biorreactor agitado y aireado que comprende al menos dos etapas:
- la primera etapa de crecimiento en presencia de al menos un sustrato de carbono de crecimiento en fase discontinua que se realiza con una concentración de sustrato de carbono de crecimiento comprendida entre 10 y 60 g/l
 - 10 - una segunda etapa de crecimiento y de producción de enzimas en presencia de al menos un sustrato de carbono inductor alimentado en fase semicontinua en presencia de un flujo limitante de fuente de carbono comprendido entre 50 y 140 mg por gramo de biomasa celular y por hora,
 - y el biorreactor tiene un coeficiente de transferencia volumétrica de oxígeno k_{La} comprendido entre 40 y 180 h^{-1} .
- 15 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la concentración de sustrato de carbono de crecimiento está comprendida entre 10 y 20 g/l.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 2 en el que la concentración de sustrato de carbono está comprendida entre 12 y 17 g/l.
- 20 4. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes en el que el flujo de fuente de carbono está comprendido entre 70 y 100 mg por gramo de biomasa celular y por hora.
5. Método de acuerdo con la reivindicación 4 en el que el flujo de fuente de carbono está comprendido entre 80 y 90 mg por gramo de biomasa y por hora.
- 25 6. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes en el que el biorreactor tiene un coeficiente de transferencia volumétrica de oxígeno k_{La} comprendido entre 40 y 150 h^{-1} .
- 30 7. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes en el que el sustrato de carbono de crecimiento se elige entre lactosa, glucosa, xilosa, los restos obtenidos después de fermentación etanólica de azúcares monómeros de hidrolizados enzimáticos de biomasa celulósica, y/o un extracto bruto de pentosas hidrosolubles que provienen del tratamiento previo de una biomasa celulósica.
- 35 8. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes en el que el sustrato de carbono inductor se elige entre lactosa, celobiosa, soforosa, los restos obtenidos después de fermentación etanólica de azúcares monómeros de hidrolizados enzimáticos de biomasa celulósica, y/o un extracto bruto de pentosas hidrosolubles que provienen del tratamiento previo de una biomasa celulósica.
- 40 9. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes en el que el sustrato de carbono de crecimiento elegido para la obtención de la biomasa se introduce en el fermentador antes de esterilización.
10. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9 en el que el sustrato de carbono de crecimiento elegido para la obtención de la biomasa se esteriliza por separado y se introduce en el biorreactor después de esterilización.
- 45 11. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes en el que el sustrato de carbono inductor introducido durante la fase semicontinua se esteriliza de manera independiente, antes de su introducción en el reactor.
- 50 12. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes en el que la cepa usada es una cepa de *Trichoderma reesei*.
13. Método de acuerdo con la reivindicación precedente en el que la cepa usada es una cepa de *Trichoderma reesei* modificada por mutación, selección o recombinación genética.

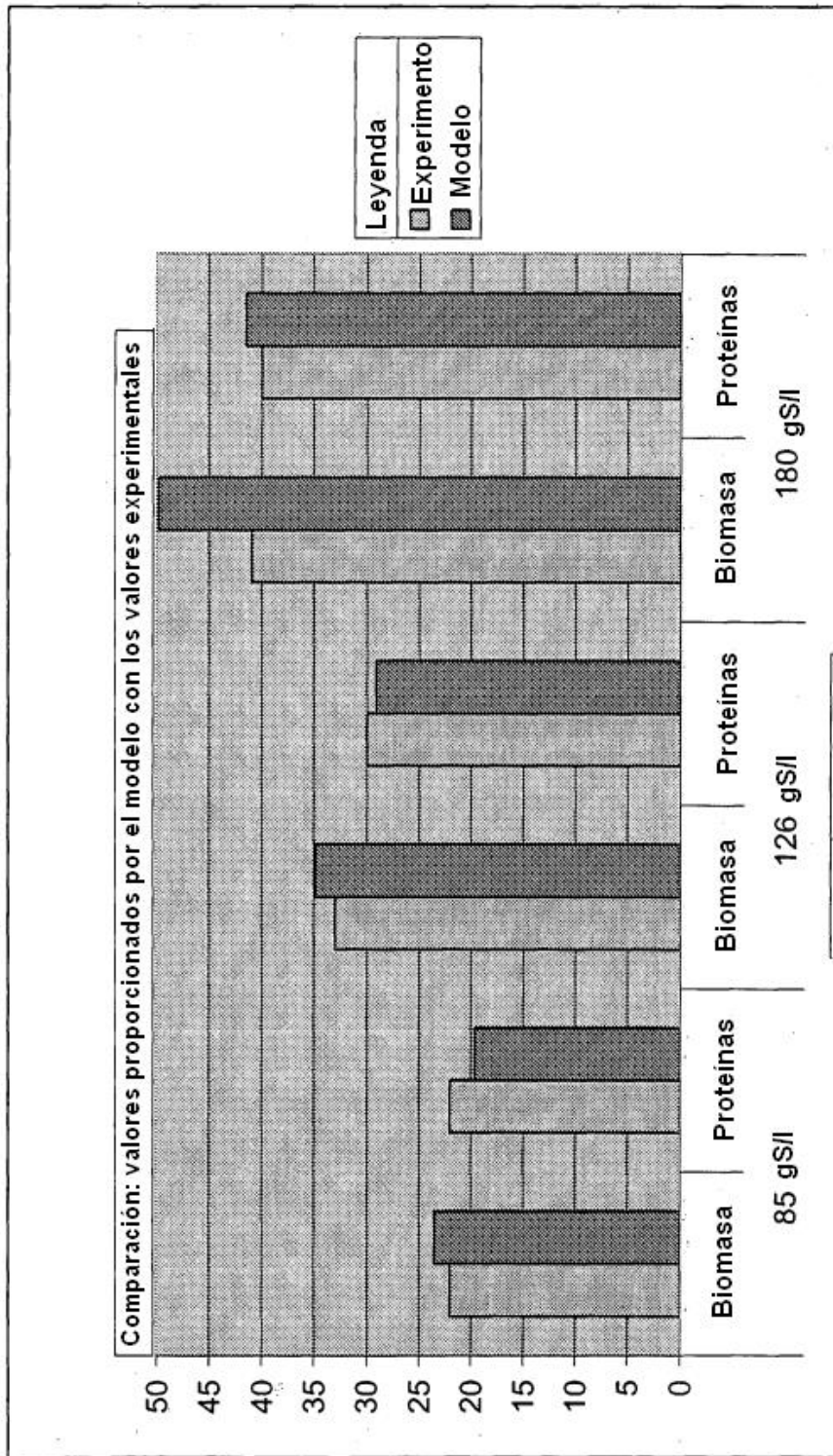


Figura 1

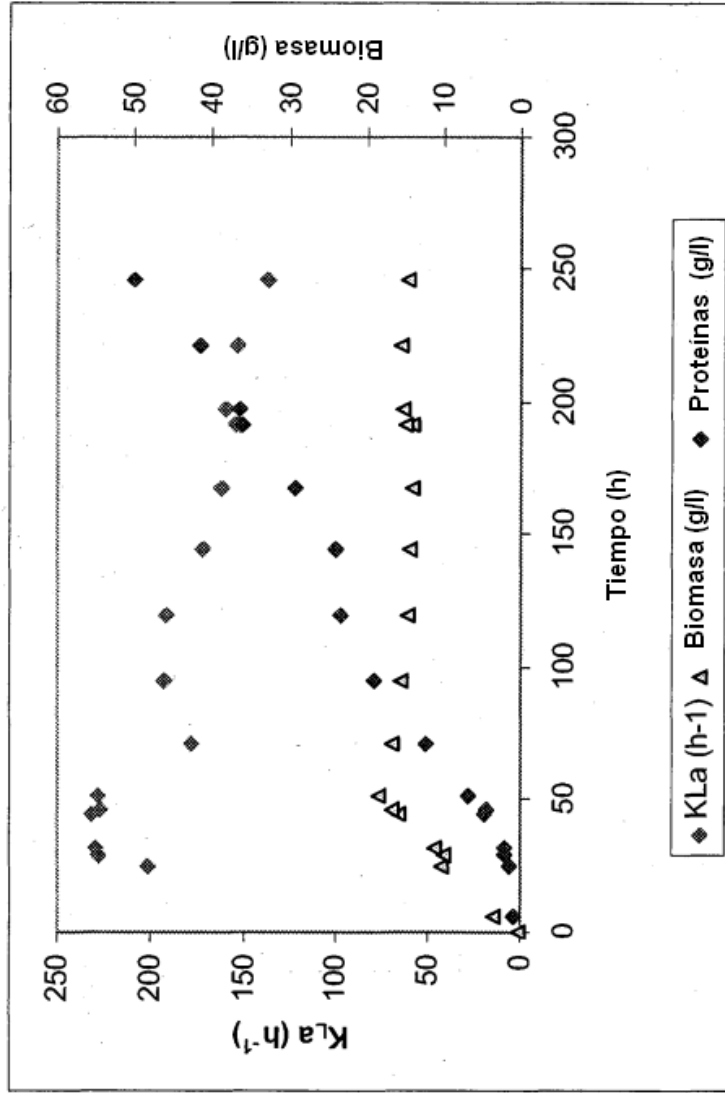


Figura 2

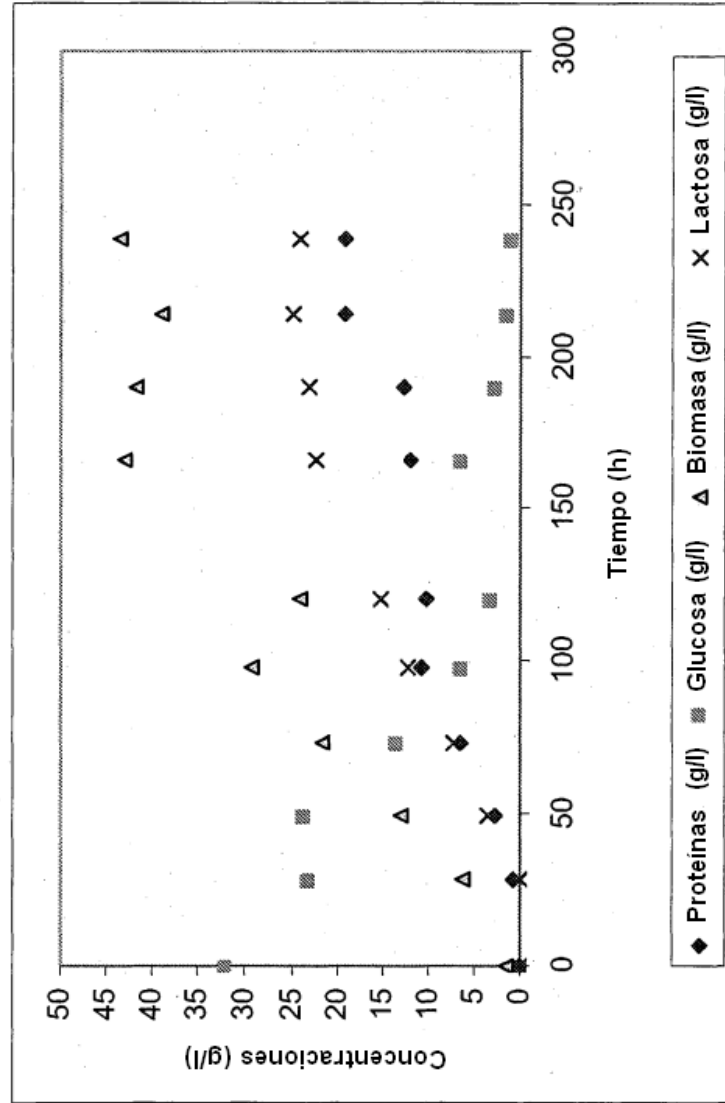


Figura 3

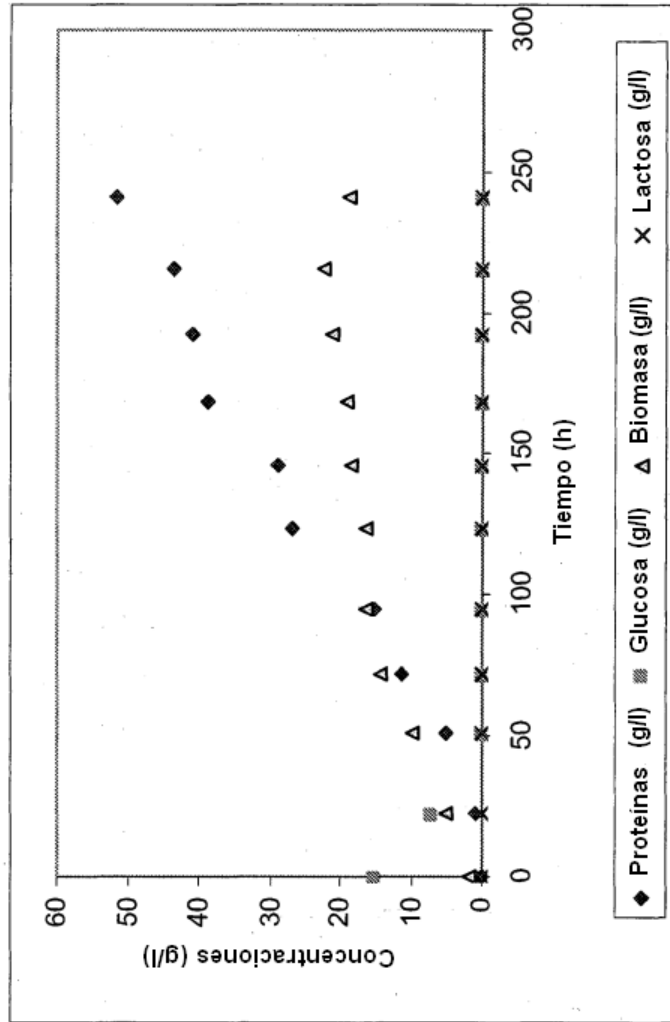


Figura 4

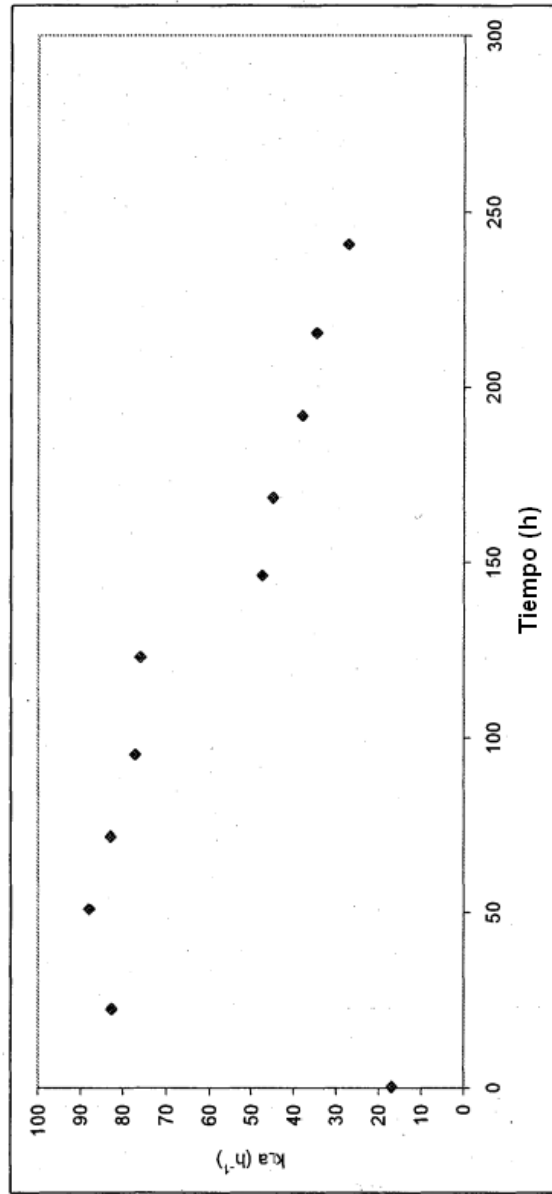


Figura 5