

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 531**

51 Int. Cl.:

**C07H 1/00** (2006.01)

**C07H 3/04** (2006.01)

**C12N 1/38** (2006.01)

**C12N 9/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2013 PCT/FR2013/052269**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14068208**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2013 E 13779313 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2912049**

54 Título: **Procedimiento de producción de soforosa a partir de soforolípidos**

30 Prioridad:

**29.10.2012 FR 1202892**

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

**03.11.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JOURDIER, ETIENNE y  
BEN CHAABANE, FADHEL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 588 531 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 soforosa a partir de soforolípidos

5 La presente invención concierne a un procedimiento de producción de soforosa mediante la hidrólisis ácida de soforolípidos. La invención tiene igualmente por objeto la utilización de un hidrolizado obtenido según el procedimiento de la invención como solución inductora de la expresión de genes que codifican celulasas. Finalmente, la invención se refiere a un procedimiento de purificación de soforosa a partir del hidrolizado.

10 Estado de la técnica

Las celulasas adaptadas a la hidrólisis de polisacáridos permiten a los microorganismos que las producen utilizar la celulosa y la hemicelulosa (los componentes mayoritarios de los vegetales) como fuente de carbono, hidrolizando estos polímeros en azúcares simples (glucosa, xilosa, etc).

15 Actualmente, estas enzimas son empleadas en numerosos ámbitos tales como en la detergencia, la industria textil o la alimentaria, así como en los procedimientos destinados a la valoración bioquímica de la biomasa lignocelulósica (por ejemplo, para la producción de biocarburante de etanol de segunda generación). *Trichoderma reesei* se reconoce actualmente como el mejor microorganismo productor de celulasas en los procedimientos de producción de biocarburante a partir de biomasa lignocelulósica debido principalmente a su fuerte poder de secreción.

20 No obstante, el coste de la producción de las celulasas sigue siendo elevado y representa uno de los obstáculos económicos para un empleo a escala industrial de los procedimientos denominados de segunda generación.

25 Industrialmente, la producción optimizada de celulasas por parte de *Trichoderma* se lleva a cabo en un protocolo *fed-batch* (alimentación sin trasiego) mediante la utilización de una solución de alimentación que contiene lactosa como el azúcar inductor de la producción de celulasas (documento EP 448 430 B1). Aunque es utilizada industrialmente, la lactosa presenta el inconveniente de ser costosa para permitir una producción de celulasas a bajo precio.

30 La soforosa es conocida por ser un muy buen inductor del sistema celulolítico de *Trichoderma reesei*. En 1962, Mandels M. et al. [Sopforosa as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. *Journal of Bacteriology* 1962, 83: 400-408] han demostrado que la soforosa, cuando estaba presente únicamente en una cantidad del 0.006 % como impureza en la glucosa, permitía la inducción de la producción de enzimas celulolíticas (o celulasas). Estas impurezas de soforosa se forman mediante un mecanismo de transglucosilación durante la hidrólisis ácida del almidón de la glucosa.

35 La soforosa (2-O-β-D-Glucopiranosil-D-glucosa) es un diholósido constituido por dos unidades en glucosa unidas por un enlace osídico β(1->2). Está presente en la naturaleza, por ejemplo, en la vaina del árbol *Sophora japonica*, a partir de la cual se aisló por primera vez en 1938.

40 Desafortunadamente, el elevado precio de la soforosa hizo que ya no fuera posible una utilización a escala industrial. Actualmente se utiliza únicamente en el laboratorio para los experimentos que necesitan una fuerte inducción.

45 Un objetivo de la presente invención es poner remedio a los inconvenientes descritos anteriormente, y en particular proponer un procedimiento simple y económico para la producción de soforosa a partir de soforolípidos. El contenido en soforosa del hidrolizado puede utilizarse por tanto como agente inductor en los microorganismos capaces de producir celulasas, y en particular en *Trichoderma reesei*.

50 Resumen de la invención

Este objetivo se consigue gracias a un procedimiento en el que:

55 a) se proporciona una solución acuosa de soforolípidos;  
b) se añade un compuesto ácido a la solución acuosa de soforolípidos, estando comprendido el contenido en compuesto ácido entre el 0,01 % y el 6 % en peso con respecto al peso de soforolípidos;  
c) se calienta la mezcla obtenida en la etapa b) durante entre 2 y 200 horas y a una temperatura comprendida entre 60 y 110 °C.

60 El procedimiento según la invención emplea una hidrólisis de un soforolípidos en un medio acuoso en presencia de un compuesto ácido, es decir, que es capaz de liberar iones H<sup>+</sup> en solución.

65 En el ámbito de la presente invención, el término soforolípidos (o soforosa lípidos) designa los compuestos que comprenden una unidad de soforosa unida a un ácido graso mediante un enlace de tipo osídico (entre el carbono 1' de la soforosa y el de ω-1 del ácido graso). Los soforolípidos pueden ser producidos por microorganismos, en

particular por levaduras del género *Candida*. Según el lípido proporcionado al microorganismo y las condiciones de cultivo, se puede obtener una mezcla de diferentes soforolípidos, en una forma ácida (función carboxílica libre) o de lactona cíclica (enlace éster entre el ácido graso y el grupo -OH en 4" de la soforosa), y con los grupos -OH 6' y 6" que pueden estar acetilados.

5 El contenido en soforolípidos del medio está comprendido generalmente entre 2 y 800 g/l, y preferentemente entre 100 y 400 g/l.

10 El contenido en compuesto ácido está comprendido entre el 0,01 % y el 6 % en peso con respecto al peso de soforolípidos, preferentemente está comprendido entre el 0,1 y el 2 % en peso con respecto al peso de soforolípidos. De una forma aún más preferida, el contenido en compuesto ácido está comprendido entre el 0,1 y el 1 % en peso con respecto al peso de soforolípidos.

15 Según una realización particular, el contenido en soforolípidos del medio está comprendido entre 100 y 400 g/l y el contenido en compuesto ácido está comprendido entre el 0,1 y el 2 % en peso con respecto al peso de soforolípidos.

El compuesto ácido empleado es un ácido inorgánico o un ácido orgánico.

20 Preferentemente, el compuesto ácido es un ácido inorgánico elegido entre ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico. Preferentemente, el ácido inorgánico es ácido sulfúrico.

25 Según una realización particular del procedimiento, se lleva a cabo además la etapa de separación de la fase lipídica y de la fase acuosa de la mezcla procedente de la etapa de hidrólisis, de forma que se recupere una solución acuosa (hidrolizado) que contiene soforosa y glucosa.

El hidrolizado así obtenido a la salida de la etapa de hidrólisis, y después de una separación de la fase lipídica, se utiliza como solución para la inducción de la expresión de los genes que codifican para las celulasas en un microorganismo tal como, por ejemplo, *Trichoderma reesei*.

30 Antes de su empleo como solución inductora, igualmente se puede purificar dicha solución acuosa que contiene la mezcla de soforosa y de glucosa mediante la adición a dicha solución de un microorganismo alcoholígeno capaz de fermentar la glucosa en etanol, y efectuando después una fermentación etanólica, y finalmente llevando a cabo una separación del etanol (por ejemplo, mediante desorción) con el fin de recuperar un hidrolizado purificado que contiene soforosa.

35 Descripción detallada de la invención

La presente invención describe las condiciones de empleo de una hidrólisis ácida moderada con objeto de producir soforosa y evitando una hidrólisis total de los soforolípidos que conduciría a la liberación de dos unidades de glucosa por molécula de soforolípidos.

45 En las condiciones descritas a continuación, la hidrólisis permite romper preferentemente el enlace osídico entre la soforosa y la cadena lipídica, lo que conduce a la liberación de la soforosa. No obstante, inevitablemente y en mayor o menor medida, en función de las condiciones operativas, la soforosa liberada también puede ser hidrolizada en dos unidades de glucosa.

50 En la práctica, se proporciona en primer lugar una solución acuosa de soforolípidos. Esta solución acuosa presenta típicamente una concentración de soforolípidos comprendida entre 2 y 800 g/l, preferentemente entre 100 y 400 g/l. De forma preferente, se utilizarán soforolípidos en la forma ácida más que en la forma de lactona. La forma ácida puede obtenerse bien optimizando las condiciones de fermentación durante la producción de los soforolípidos, o bien llevando a cabo una hidrólisis en condiciones básicas (saponificación) del producto de la fermentación.

55 A esta solución acuosa se añade un compuesto ácido de forma que se obtenga una concentración de ácido en la mezcla comprendida entre el 0,01 % y el 6 % en peso con respecto al peso de soforolípidos, y preferentemente entre el 0,1 y el 2 % en peso, y de una forma más preferida entre el 0,1 y el 1 % en peso.

60 El compuesto ácido es bien un ácido orgánico, bien un ácido inorgánico. Preferentemente se emplea un ácido inorgánico que puede elegirse entre ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico. Preferentemente, el ácido es ácido sulfúrico. Si se utiliza un ácido orgánico, puede elegirse entre ácido fórmico, ácido acético, ácido oxálico, ácido trifluoroacético y ácido maleico.

65 La hidrólisis se lleva a cabo llevando la mezcla ácida a una temperatura comprendida generalmente entre 60 °C y 110 °C durante entre 2 horas y 200 horas, preferentemente entre 5 horas y 24 horas. Al final de este tratamiento, los ácidos grasos liberados por la hidrólisis fermentan una fase no miscible con el agua, que puede ser fácilmente separada de la fase acuosa. La fase acuosa (denominada hidrolizado) contiene una mezcla de glucosa y de soforosa cuyas proporciones varían en función de la dosis de ácido utilizada y de la duración de la hidrólisis.

El hidrolizado así obtenido puede utilizarse para la producción de las proteínas de interés (celulasas) por parte de los microorganismos cuyos genes codifican bajo el control de un promotor inducible por la soforosa. En particular, el microorganismo es del género *Trichoderma* y preferentemente es *Trichoderma reesei*.

5 Se puede utilizar cualquier tipo de procedimiento de producción adaptado al microorganismo conocido por el experto en la materia. En particular, el hidrolizado que contiene la soforosa se emplea en un procedimiento de tipo "alimentación sin trasiego" o "fed-batch" según la terminología anglosajona, como se describe en el documento FR 2 555 603.

10 Con este fin, se prepara un precultivo que contiene un microorganismo y un medio de cultivo que contiene las sales minerales y los complementos vitamínicos habituales, y una fuente de carbono y de energía, preferentemente en forma de azúcares solubles (por ejemplo, lactosa). A continuación el precultivo es transferido a un fermentador de producción de enzimas que comprende un medio de cultivo que contiene al menos un azúcar y es complementado de forma regular con una solución inductora. En el marco de la invención, la solución inductora utilizada es el hidrolizado procedente de la hidrólisis de los soforolípidos. A continuación se procede a la producción de las enzimas en el fermentador manteniendo el contacto necesario entre el microorganismo, el medio de cultivo y aportando de forma regular (por ejemplo, de forma continua) la solución inductora de soforosa.

20 Antes de su utilización, igualmente es posible purificar la mezcla (el hidrolizado) procedente de la etapa de hidrólisis con el fin de aislar la soforosa producida. Con este fin se añade a dicha mezcla un microorganismo capaz de fermentar la glucosa en etanol, tal como, por ejemplo, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y a continuación se procede a una etapa de fermentación. La mezcla final obtenida tras la fermentación se somete a una etapa de desorción del etanol con el fin de recuperar una solución acuosa de soforosa. Igualmente es posible la utilización de la solución acuosa de soforosa así obtenida como solución inductora de la expresión de los genes en los microorganismos.

#### Descripción de las figuras

30 La Figura 1 representa la concentración de las celulasas producidas en presencia de glucosa, de lactosa y de soforolípido, solos o en una mezcla.

La Figura 2 representa la evolución de las concentraciones de glucosa y de soforosa en función de la concentración de ácido sulfúrico empleada para la hidrólisis moderada de los soforolípidos.

35 La Figura 3 compara las velocidades específicas de producción de celulasa por parte de *Trichoderma reesei*, durante una producción con alimentación en fed-batch con una solución que comprende glucosa y lactosa o soforosa.

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1 (no conforme)

40 Después del cultivo de *T. reesei* en un frasco con 10 g/l de glucosa y hasta el agotamiento de la glucosa, se obtiene un medio que contiene 5 g/l de biomasa (células de *T. reesei*). En este medio se realizan inyecciones de soluciones concentradas de glucosa y de soforolípido en forma ácida procedentes de un cultivo de *Candida bombicola* con el fin de obtener las cantidades deseadas de glucosa y de soforolípido indicadas en la figura 1. Igualmente se han realizado inyecciones solo de glucosa, solo de lactosa (inductor industrial clásico) y solo de soforolípido, que se corresponden con los medios de blanco.

50 Después de 20 h de incubación, se analiza la cantidad de proteínas (celulasas) producidas en los diferentes medios ensayados. La cuantificación de las proteínas se lleva a cabo según el método de Lowry OH et al. (1951) [Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193, 1, 265-275] mediante un kit DC Protein Assay (Biorad).

55 En referencia a la figura 1, los resultados muestran que la cantidad de enzimas producida en presencia de soforolípidos siempre es menor que en presencia de lactosa, y por lo tanto que el soforolípido en bruto es peor inductor que la lactosa.

##### Ejemplo 2 (optimización de las condiciones de la hidrólisis ácida moderada del soforolípido)

60 En tubos de ensayo se mezcla 1 ml de una solución acuosa de soforolípido (procedente de un cultivo de *Candida bombicola*) en forma ácida a aproximadamente 250 g/l y ácido sulfúrico concentrado, de forma que se obtenga una concentración de ácido sulfúrico comprendida entre el 0,25 y el 2 % en peso de ácido con respecto al peso de soforolípido.

65 Los tubos de ensayo se tapan con un tapón hermético y después se colocan en un baño seco a 100 °C durante 16 horas. Las concentraciones de los azúcares (glucosa y soforosa) liberados durante la hidrólisis se miden mediante una HPLC.

En referencia a la figura 2, se observa que cuando se aumenta el contenido en ácido sulfúrico, mejora la liberación de azúcares totales (para una misma duración de la hidrólisis), pero no obstante, la mezcla contiene mayoritariamente glucosa. Por el contrario, para los menores contenidos en ácido sulfúrico, es decir, entre un 0,1 y un 1 % en peso de ácido sulfúrico con respecto al peso de soforolípido, la mezcla después de la hidrólisis contiene menos azúcares totales, pero una proporción de soforosa mucho más importante (41 % en peso de soforosa en la mezcla hidrolizada con un 0,25 % en peso de ácido sulfúrico con respecto al peso de soforolípidos).

Una experiencia idéntica llevada a cabo durante 5 horas con un 8 % en peso de ácido sulfúrico con respecto al peso de soforolípido ha conllevado la liberación únicamente de glucosa, sin una liberación asociada de soforosa.

Ejemplo 3 (hidrólisis moderada del soforolípido)

Se preparan 200 ml de una solución que contiene aproximadamente 200 g/l de soforolípidos en forma ácida y un 0,25 % de ácido sulfúrico con respecto al peso de soforolípido. Esta solución se lleva a ebullición en un globo con agitación y a reflujo durante 12 horas. La fracción oleosa que contiene los lípidos resultantes de la hidrólisis se separa de la fase acuosa y los azúcares (glucosa y soforosa) liberados en la fracción acuosa se miden mediante una HPLC. Las concentraciones medidas son de 10,3 g/l de soforosa y de 16,6 g/l de glucosa, es decir, un 38 % en peso de soforosa en la mezcla de azúcares liberados.

Ejemplo 4 (utilización del hidrolizado de soforolípido para la inducción de la producción de celulasas por parte de *T. reesei*)

Después del cultivo de células de *T. reesei* CL847 (Durand H. et al. (1988a) Classical and molecular genetics applied to *Trichoderma reesei* for the selection of improved cellulolytic industrial strains. In: FEMS Symposium n° 43: Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation, págs. 135-151. Academic Press, Londres) con glucosa en frascos agitados hasta el agotamiento de la glucosa, la producción de celulasas se lleva a cabo según un procedimiento "fed-batch" que emplea una solución cuya composición es la siguiente: 50 g/l de una mezcla de azúcares y 15 ml/l de NH<sub>3</sub> al 20 % en peso según se describe en la publicación "A new stoichiometric miniaturization strategy for screening of industrial microbial strains: application to cellulase hyper-producing *Trichoderma reesei* strains", Microbial Cell Factories 2012, 11: 70.

La mezcla de azúcares utilizada contiene (100-x) % en peso de glucosa y x % en peso del azúcar inductor:

- en el 1<sup>er</sup> caso (blanco), el azúcar inductor es la lactosa, en una cantidad x = 8 %
- en los 2<sup>o</sup>, 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> caso, el azúcar inductor es la soforosa procedente del hidrolizado obtenido en el ejemplo 3 que se ha complementado con glucosa pura para que tenga respectivamente x = 8 %, x = 0,3 % y x = 0,03 %.

El "fed-batch" se lleva a cabo durante 166 horas con un caudal de alimentación en solución de 0,3 ml/h y a una temperatura de 30 °C.

Se tomaron muestras diariamente para hacer un seguimiento de la concentración de células y de la concentración de proteínas. La capacidad de inducción de la mezcla de azúcares utilizada para el "fed-batch" se expresa por la velocidad específica de producción de proteínas (mg de proteínas producidas por gramo de células productoras y por hora).

En la figura 3 se observa que la mezcla que contiene soforosa provoca una inducción aproximadamente dos veces más fuerte que la mezcla que contiene lactosa a la misma concentración, con unas velocidades específicas de producción de proteínas respectivas de 12 frente a 6,4 mg/g/h.

Además, en la figura 3 se remarca que la mezcla que contiene un 0,03 % de soforosa ya provoca una inducción equivalente a la mezcla que contiene un 8 % de lactosa, con unas velocidades específicas de producción de proteínas respectivas del orden de 6 mg/g/h.

Finalmente, en la figura 3 se observa que la mezcla que contiene un 0,3 % de soforosa provoca una inducción equivalente a la mezcla que contiene un 8 % de soforosa, con unas velocidades específicas de producción de proteínas respectivas de 10,5 y de 12 mg/g/h.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de producción de soforosa a partir de soforolípidos en el que:
- 5 a) se proporciona una solución acuosa de soforolípidos;  
b) se añade un compuesto ácido a la solución acuosa de soforolípidos, estando comprendido el contenido en compuesto ácido entre un 0,01 % y un 6 % en peso con respecto al peso de soforolípidos  
c) se calienta la mezcla obtenida en la etapa b) durante entre 2 y 200 horas y a una temperatura comprendida entre 60 y 110 °C.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el contenido en soforolípidos de la solución acuosa está comprendido entre 2 y 800 g/l.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el contenido en compuesto ácido está comprendido entre el 0,1 y el 2 % en peso con respecto al peso de soforolípidos.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el compuesto ácido es un ácido inorgánico o un ácido orgánico.
- 20 5. Procedimiento según la reivindicación 4 en el que el ácido inorgánico se elige entre ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que se lleva a cabo una separación de la fase lipídica y de la fase acuosa de la mezcla procedente de la etapa c) de forma que se recupere un hidrolizado acuoso que contiene soforosa y glucosa.
- 25 7. Procedimiento de purificación de soforosa de un hidrolizado obtenido según el procedimiento de la reivindicación 6 que comprende las siguientes etapas:
- 30 a) se añade un microorganismo capaz de fermentar la glucosa en etanol en el hidrolizado;  
b) se lleva a cabo una fermentación etanólica del hidrolizado de forma que se proporcione un hidrolizado fermentado;  
c) se lleva a cabo una desorción del etanol presente en el hidrolizado fermentado.

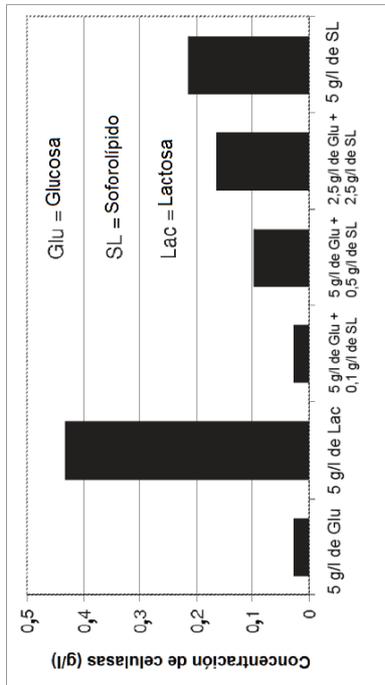


Figura 1

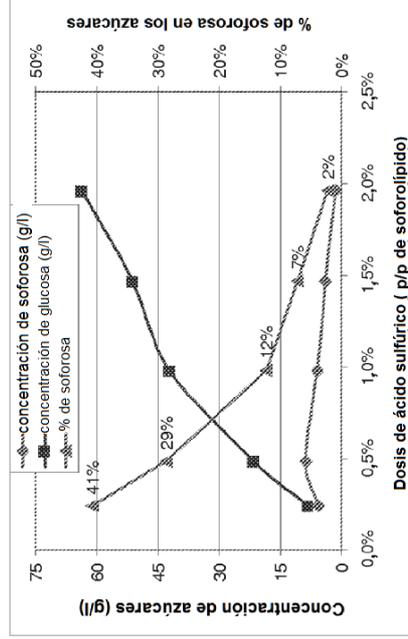
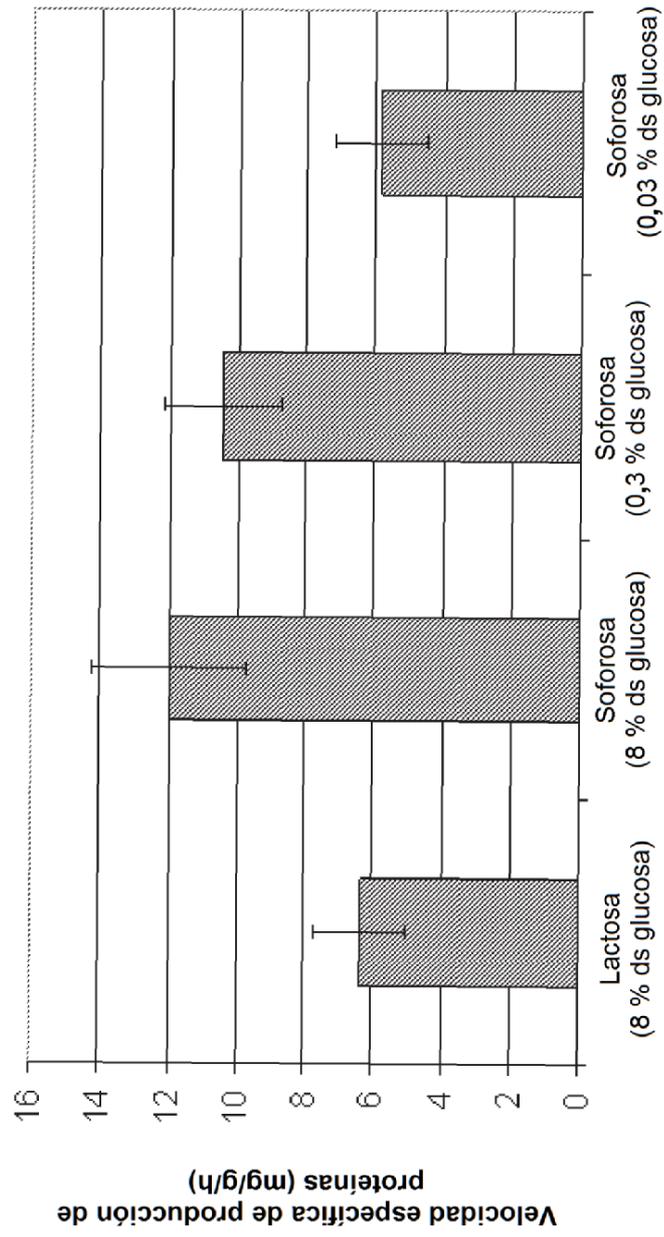


Figura 2



**Figura 3**