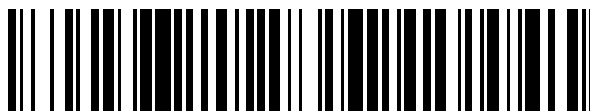


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 673**

51 Int. Cl.:

C12P 19/00	(2006.01)
C12P 19/12	(2006.01)
C12P 21/00	(2006.01)
C12N 9/42	(2006.01)
C12P 7/10	(2006.01)
C12P 7/16	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2013 PCT/FR2013/052772**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14096586**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2013 E 13803153 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2935605**

54 Título: **Procedimiento de producción de oligosacáridos a partir de biomasa lignocelulósica**

30 Prioridad:

20.12.2012 FR 1203536

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

04.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JOURDIER, ETIENNE;
AYMARD, CAROLINE y
BEN CHAABANE, FADHEL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 621 673 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 oligosacáridos a partir de biomasa lignocelulósica

5 La presente invención pertenece al ámbito de un procedimiento de producción de oligosacáridos a partir de biomasa lignocelulósica. La invención tiene también por objeto un procedimiento de producción de celulosas que integran una unidad de producción de oligosacáridos sintetizados a partir de biomasa lignocelulósica. Finalmente, la presente invención se refiere a un procedimiento denominado de "segunda generación" de producción de azúcares y de alcoholes, de disolventes o de ácidos orgánicos a partir de biomasa lignocelulósica y que comprende una unidad de producción *in situ* de oligosacáridos y de celulasas.

Estado de la técnica

15 Con el fin de responder a los desafíos de la transición energética y en particular para reducir el impacto de los transportes sobre el medio ambiente y su dependencia del petróleo, se llevan a cabo actualmente numerosos estudios para utilizar y optimizar los bio-recursos renovables, como la biomasa lignocelulósica.

20 La biomasa lignocelulósica representa uno de los recursos renovables más abundantes en la tierra. Los sustratos considerados son muy variados, ya que se refieren al mismo tiempo a los sustratos leñosos (frondosos y resinosos), los subproductos de la agricultura (paja) o los de las industrias generadoras de desechos lignocelulósicos (industrias agroalimenticias, papeleras).

25 La biomasa lignocelulósica está compuesta de tres principales constituyentes: la celulosa (del 35 al 50%), la hemicelulosa (del 23 al 32%) que es un polisacárido esencialmente constituido de pentosas y de hexosas, y la lignina (del 15 al 25%) que es una macromolécula de estructura compleja y de alto peso molecular, que proviene de la copolimerización de alcoholes fenilpropenoicos. Estas diferentes moléculas son responsables de las propiedades intrínsecas de la pared vegetal y se organizan en un entramado complejo.

30 La celulosa, mayoritaria en esta biomasa, es así el polímero más abundante en la tierra y el que presenta el mayor potencial para formar unos materiales y unos biocarburantes. Sin embargo, el potencial de la celulosa y de sus derivados no ha podido, por el momento, ser completamente explotado, principalmente debido a la dificultad de extracción de la celulosa. En efecto, esta etapa se hace difícil por la estructura misma de las plantas. Los obstáculos tecnológicos identificados para la extracción y para la transformación de la celulosa son, en particular, su accesibilidad, su cristalinidad, su grado de polimerización, la presencia de la hemicelulosa y de la lignina.

35 El principio del procedimiento de conversión de la biomasa lignocelulósica por unos procedimientos biotecnológicos utiliza una etapa de hidrólisis enzimática de la celulosa contenida en las materias vegetales para producir glucosa. La glucosa obtenida puede después ser fermentada en diferentes productos tales como los alcoholes (etanol, 1,3-propanodiol, 1-butanol, 1,4-butanodiol, etc.) o unos ácidos (ácido acético, ácido láctico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido fumárico, ácido succínico, etc.).

45 La celulosa y eventualmente las hemicelulosas son las dianas de la hidrólisis enzimática, pero no son directamente accesibles a las enzimas. Esta 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, para mejorar la accesibilidad de la celulosa atrapada dentro de la matriz de lignina y de hemicelulosa.

50 La hidrólisis es una operación difícil que utiliza generalmente una hidrólisis de tipo enzimática. En efecto, se recomienda esta última ya que genera pocos efluentes a tratar con respecto a una hidrólisis de tipo químico (por ejemplo ácido).

55 En la actualidad, esta hidrólisis se realiza en presencia de celulasas que son producidas a partir de microorganismos tales como bacterias o hongos (*Clostridium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*). Estos micro-organismos producen un cóctel de enzimas que actúan en sinergia para hidrolizar la celulosa en monómero glucosa, y también eventualmente la hemicelulosa. Entre las familias de enzimas presentes, se señalan particularmente las endogluconasas, las exogluconasas y las β -glucosidasas. Entre estos, *Trichoderma reesei* es la especie más prometedora ya que es capaz de segregar unas cantidades importantes de celulasas muy activas.

60 Sin embargo, el coste de producción de las celulasas sigue siendo elevado y representa uno de los obstáculos económicos para una utilización de tales procedimientos a escala industrial.

65 Industrialmente, la producción optimizada de celulasas por *Trichoderma reesei* se realiza en protocolo fed-batch (alimentación sin trasiego) utilizando una solución de alimentación que contiene lactosa como azúcar inductor de la producción de celulasas (FR 2555603). Sin embargo, la lactosa utilizada sola es demasiado costosa para permitir una producción de celulasas de bajo coste.

A fin de disminuir el coste asociado a la compra de lactosa, es posible considerar sustituir en totalidad o en parte la fracción del inductor lactosa por otro azúcar inductor que sería:

* o bien tan buen inductor pero menos costoso

* o bien más costoso pero mejor inductor, lo que permitiría disminuir todavía más el contenido mínimo de inductor en la solución de alimentación del protocolo fed-batch.

Así, por ejemplo, la celobiosa (dímero de glucosa de $\beta(1\rightarrow4)$) es un inductor natural de la producción de celulasas en *Trichoderma reesei*. La celobiosa es el último intermediario en la hidrólisis de la celulosa en glucosa que está catalizada por la enzima β -glucosidasa. A fin de producir la celobiosa, se puede pensar en utilizar un cóctel de celulasas desprovisto de β -glucosidasas a fin de hidrolizar la celulosa en celobiosa. Sin embargo, esta reacción es de cinética lenta, ya que las celulasas (celobiohidrolasa y endoglucanasa) están muy altamente inhibidas por la celobiosa. Por otro lado, tal opción necesitaría producir separadamente un cóctel específico desprovisto de β -glucosidasa, lo que la hace industrialmente menos rentable.

Otra alternativa consistiría en utilizar soforosa (dímero de glucosa en $\beta(1\rightarrow2)$) que es el inductor más fuerte conocido, pero su coste sigue siendo todavía prohibitivo para ser utilizado industrialmente.

Un objetivo de la invención es por lo tanto proponer unos procedimientos de producción de azúcares, de celulasas, y de alcoholes y/o de disolventes que sean optimizados desde el punto de vista del coste de explotación, en particular a partir de biomasa lignocelulósica.

El documento US2004/0121446 divulga un procedimiento de producción de una solución inductora para la producción de celulasas por un hongo filamentoso. Se ejemplifica la producción de una solución inductora que contiene soforosa, gentiobiosa y glucosa a partir de una solución esterilizada al 60% p/p de glucosa, por incubación a 65°C durante 3 días en presencia de una preparación de celulasa entera.

El documento Lo C.-M- *et al.*, Bioresource Technology, vol. 101, nº 2, 1 de enero de 2010, páginas 717-723, divulga la producción de celulasas por cultivo en continuo sobre un hidrolizado ácido que comprende unos oligosacáridos. Este hidrolizado se obtiene por hidrólisis ácida corta de serrín de madera (burbujeo durante 15 minutos con ácido sulfúrico).

Resumen de la invención

Según un primer aspecto de la invención, se propone un procedimiento de producción de oligosacáridos a partir de biomasa lignocelulósica que comprende al menos las etapas siguientes:

a) se pretrata en un reactor de pretratamiento la biomasa con el fin de proporcionar un efluente que contiene un sustrato pretratado;

b) se efectúa, en un reactor, una hidrólisis enzimática del sustrato pretratado contenido en el efluente procedente de la etapa a) en presencia de celulasas con el fin de producir un hidrolizado que contiene glucosa, celulasas y agua;

c) se extrae al menos una parte del hidrolizado procedente de la etapa b) que comprende una fracción líquida;

d) se reduce el contenido en agua de dicha parte del hidrolizado extraído en la etapa c) de manera que la fracción líquida del hidrolizado presente un contenido en agua inferior al 65% en peso de agua con respecto al peso total de la fracción líquida del hidrolizado;

e) se incuba a una temperatura comprendida entre 40 y 70°C el hidrolizado procedente de la etapa d) durante el tiempo necesario para producir un efluente enriquecido en oligosacáridos.

El procedimiento de producción de oligosacáridos según la invención utiliza como materia prima biomasa lignocelulósica que es accesible de manera abundante y que es además poco costosa.

Los inventores han observado que es posible promover la formación de oligosacáridos a partir de un hidrolizado que contiene glucosa y celulasas por incubación cuando el contenido en agua de la fracción líquida del hidrolizado es inferior o igual al 65% en peso con respecto al peso total de la fracción líquida del hidrolizado.

Preferentemente, el hidrolizado procedente de la etapa de hidrólisis que se pone en incubación posee una actividad β -glucosidasa de al menos 1 IU/ml, y preferentemente de al menos 5 IU/ml. Esta actividad β -glucosidasa se mide utilizando como sustrato pNPG (*para*-nitrofenol- β -glucopiranososa) a 5 mM, en un tampón citrato 50 mM a pH 4,75, con incubación de 30 minutos a 50°C [Dashtban, Maki, Leung, Mao, y Qin (2010) Cellulase activities in biomass conversion: Measurement Methods and Comparison. Critical Reviews in Biotechnology 30 (4) páginas 302-309]. Se

mide después por absorbancia la concentración en *para*-nitrofenol, producto de la hidrólisis de *p*NPG por la β -glucosidasa. La actividad β -glucosidasa se expresa en IU/ml, en el que IU significa $\mu\text{mol}/\text{min}$ (por μmol de producto liberado por minuto de reacción).

5 Según un modo de realización, la etapa d) de reducción del contenido en agua de la fracción líquida del hidrolizado se realiza por evaporación a una temperatura inferior a 90°C.

Según otro modo de realización, la etapa d) de reducción del contenido en agua de la fracción líquida del hidrolizado se efectúa añadiendo glucosa en el hidrolizado extraído en la etapa c).

10 De manera alternativa, en la etapa d) se separa el hidrolizado extraído en la etapa c) en al menos una primera porción y una segunda porción, se concentra la primera porción de hidrolizado a una temperatura superior a 90°C con el fin de obtener una porción de hidrolizado concentrado, y se mezcla el hidrolizado concentrado con la segunda porción de hidrolizado no concentrado.

15 Según un modo de realización, en la etapa d), se efectúa una separación membranaria del hidrolizado extraída en la etapa c), por ejemplo por osmosis inversa o nanofiltración, a fin de recuperar un hidrolizado cuyo contenido en agua está reducido y una solución acuosa.

20 Es también posible, en el ámbito del procedimiento de producción de oligosacáridos según la invención, efectuar una separación sólido/líquido del efluente procedente de la etapa a) con el fin de recuperar una fracción líquida que contiene unos azúcares y una fracción sólida que contiene el sustrato pretratado que se envía a la etapa b). En cuanto a la fracción líquida, ésta puede ser o bien tratada en mezcla con el hidrolizado en la etapa d), o bien ser mezclada con el efluente enriquecido en oligosacáridos procedente de la etapa e).

25 Preferentemente, al final de la etapa e) de incubación, se obtiene un efluente que comprende unos oligosacáridos seleccionados entre la soforosa y la gentiobiosa sola o en mezcla.

30 El procedimiento de producción de oligosacáridos según la invención puede el mismo estar integrado en una unidad existente de producción de alcohol y/o de disolventes, denominada de segunda generación, que utiliza como materia prima la biomasa lignocelulósica.

35 Así, la invención tiene también por objeto un procedimiento de producción de celulasas a partir de biomasa lignocelulósica que comprende al menos las etapas siguientes:

a) se pretrata en un reactor de pretratamiento la biomasa con el fin de proporcionar un efluente que contiene un sustrato pretratado;

40 b) se efectúa, en un reactor, una hidrólisis enzimática del sustrato pretratado contenido en el efluente procedente de la etapa a) en presencia de celulasas con el fin de producir un hidrolizado que contiene glucosa, celulasas y agua;

c) se extrae al menos una parte del hidrolizado procedente de la etapa b) que comprende una fracción líquida;

45 d) se reduce el contenido en agua de dicha parte del hidrolizado extraído en la etapa c) de manera que la fracción líquida del hidrolizado presente un contenido en agua inferior al 65% en peso de agua con respecto al peso total de la fracción líquida del hidrolizado;

50 e) se incuba a una temperatura comprendida entre 40 y 70°C el hidrolizado procedente de la etapa d) durante el tiempo necesario para producir un efluente enriquecido en oligosacáridos;

f) se envía al menos una parte del hidrolizado enriquecido en oligosacáridos dentro de un reactor que contiene un medio de cultivo y unos microorganismos capaces de producir las celulasas; y

g) se pone en cultivo la mezcla con el fin de producir un efluente enriquecido en celulasas.

55 Según la invención, el efluente procedente de la etapa e) que contiene los oligosacáridos se utiliza como solución inductora en una unidad de producción de celulasas.

60 La invención se refiere además a un procedimiento de producción de alcoholes, de disolventes o de ácidos orgánicos solos o en mezcla, que comprende las etapas del procedimiento de producción de celulasas tal como se ha descrito anteriormente y unas etapas suplementarias en las que se envía una parte del hidrolizado procedente de la etapa b) dentro de un reactor de fermentación que comprende unos microorganismos a fin de producir un mosto de fermentación que comprende unos alcoholes, unos disolventes o unos ácidos orgánicos solos o en mezcla y se recicla al menos una parte del efluente enriquecido en celulasas procedente de la etapa g) en el reactor de la etapa b).

65

5 Alternativamente, el procedimiento de producción de alcoholes, de disolventes o de ácidos orgánicos solos o en mezcla según la invención puede utilizar una etapa en la que se envía una parte del efluente procedente de la etapa a) dentro de una unidad de hidrólisis y de fermentación simultáneas a fin de producir unos alcoholes y/o unos disolventes, y se recicla al menos una parte del efluente enriquecido en celulasas procedente de la etapa g) dentro de la unidad de hidrólisis y de fermentación simultáneas.

La fermentación según la invención permite, por ejemplo, producir etanol como alcohol mayoritario o n-butanol solo o en mezcla con acetona o isopropanol.

10 El procedimiento de producción de alcohol y/o de disolvente según la invención comprende una etapa de producción *in situ* de celulasas a partir de oligosacáridos que son, ellos mismos, sintetizados de manera *in situ* a partir de azúcares ya presentes en el procedimiento.

15 El procedimiento de producción de alcohol, de disolventes o de ácidos orgánicos solos o en mezcla según la invención presenta la ventaja de que su realización se libra de los costes de compra, de transporte y de almacenamiento de oligosacáridos (utilizados como inductores) necesarios para la producción de las celulasas ya que gracias al procedimiento, los oligosacáridos son producidos *in situ* a partir de azúcares que están ya disponibles dentro del procedimiento.

20 Breve descripción de la figura

Otras características y ventajas de la invención se comprenderán mejor y aparecerán más claramente a partir de la lectura de la descripción realizada a continuación, refiriéndose a los dibujos entre los cuales:

25 - la figura 1 es una representación esquemática de un modo de realización del procedimiento de producción de oligosacáridos según la invención,

30 - la figura 2 es una representación esquemática de un modo de realización del procedimiento de producción de celulasas según la invención,

- la figura 3 es una representación esquemática de un primer modo de realización del procedimiento de producción de alcoholes y/o de disolventes según la invención,

35 - la figura 4 es una representación esquemática de un segundo modo de realización del procedimiento de producción de alcoholes y/o de disolventes según la invención.

Generalmente, los elementos parecidos se indican por unas referencias idénticas en las figuras.

40 Descripción detallada de la invención

En referencia a la figura 1, el procedimiento de producción de oligosacáridos según la invención comprende una etapa de pretratamiento de la biomasa, previa a la etapa de hidrólisis enzimática, que se realiza en un reactor 1 de pretratamiento. El objetivo del pretratamiento es hacer accesible la celulosa y eventualmente las hemicelulosas a las enzimas. El pretratamiento tiene como objetivo en particular modificar las propiedades físicas y fisicoquímicas del material lignocelulósico, para mejorar la accesibilidad de la celulosa aprisionada dentro de la matriz de lignina y de hemicelulosa.

50 Numerosas tecnologías para realizar este pretratamiento existen. Se puede citar por ejemplo la cocción ácida, la cocción alcalina, la explosión con vapor, los procedimientos Organosolv, etc. La eficacia del pretratamiento se mide al mismo tiempo por el balance de materiales al final del pretratamiento (porcentaje de recuperación de los azúcares en forma de monómeros o de oligómeros solubles o polímeros insolubles) y también por la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática de los restos celulósicos y hemicelulósicos.

55 Preferentemente, se utiliza un pretratamiento por explosión con vapor, también conocido bajo el nombre de "steam explosion", "steam gunning", "expansión explosiva", "pretratamiento con vapor", que se distingue por sus rendimientos en términos de degradabilidad de la celulosa y su bajo porcentaje de dilución. En este procedimiento, la biomasa se lleva rápidamente a alta temperatura (150°C-250°C) por inyección de vapor bajo presión. La interrupción del tratamiento se efectúa generalmente por descompresión brutal, denominada expansión o explosión, que desestructura la matriz lignocelulósica. Los tiempos de estancia varían de 10 segundos a algunos minutos, para presiones que va de 10 a 50 bares. Esta técnica puede ser realizada o bien en discontinuo o bien en continuo. Algunas tecnologías proponen una inyección de agua para enfriar el medio antes de la descompresión.

65 La explosión por vapor puede preceder a una impregnación de ácido para favorecer la hidrólisis de las hemicelulosas durante la cocción. Cuando la explosión con vapor se aplica en un sustrato previamente acidificado, por ejemplo con H₂SO₄, conduce a una solubilización y a una hidrólisis casi total de las hemicelulosas en sus monómeros, limitando la degradación de furfural. Además, se mejora la susceptibilidad de la celulosa a la hidrólisis

enzimática. La utilización de un catalizador ácido permite disminuir la temperatura de procedimiento (150 a 200°C frente a 250°C para la explosión con vapor sin catalizador), y así minimizar la formación de compuestos de degradación. La explosión con vapor puede también ser precedida de una etapa de cocción ácida que tiene como objetivo hidrolizar las hemicelulosas y retirarlas en una solución líquida en forma de azúcares monómeros y/o de oligómeros.

El efluente que comprende la biomasa pretratada se retira mediante una línea 2 y está tratado en el reactor de hidrólisis enzimático 3 con el fin de obtener unos azúcares fermentables por acción de las celulosas sobre la celulosa hecha accesible por la etapa de pretratamiento. Como se muestra en la figura 1, las celulasas son introducidas en la unidad por medio de la línea 5. Preferentemente, las celulasas útiles para la conversión de la celulosa en azúcares monómeros (por ejemplo la glucosa) pertenece a un sistema multi-enzimático que comprende generalmente:

* endoglucanasas (EG) que cortan la celulosa aleatoriamente al nivel de las zonas amorfas de la celulosa;

* exoglucanasas que actúan de manera progresiva sobre los extremos libres de las cadenas de celulosa;

* β -glucosidasas que hidrolizan en particular las celodextrinas y la celobiosa en glucosa.

Las condiciones de la hidrólisis enzimática, principalmente el porcentaje de materia seca de la mezcla a hidroliza (determinado según el método ASTM E1756-01) y la cantidad de enzimas utilizada, se seleccionan de tal manera que se obtiene una solubilización de la celulosa comprendida entre el 20% y el 99% y de manera preferida entre el 30% y el 95% en peso con respecto al peso total de celulosa, con el fin de proporcionar un hidrolizado que contiene unos azúcares monómeros que comprenden en particular glucosa. El agua necesaria para la obtención del porcentaje de materia seca considerado se añade por un conducto (no representado) en el reactor 3. El porcentaje de materia seca deseada está generalmente comprendido entre el 5% en peso y el 45% en peso, y preferiblemente entre el 8% en peso y el 40% en peso. La hidrólisis enzimática se realiza preferiblemente a pH comprendido entre 4 y 5,5 y a una temperatura comprendida entre 40°C y 60°C. Los aditivos necesarios, por ejemplos los nutrientes, de los reactivos químicos como, por ejemplo, la sosa y/o el amoníaco y/o la potasa, son introducidos por un conducto (no representado) dedicado a este propósito.

El hidrolizado procedente del reactor de hidrólisis enzimática comprende una fracción líquida que contiene agua, una mezcla de azúcares monómeros de los cuales glucosa, un cóctel enzimático y una fracción sólida que comprende unas materias sólidas no hidrolizadas (entre ellas la lignina). Preferentemente, el hidrolizado utilizado a continuación en el procedimiento presenta una actividad β -glucosidasa de al menos 1 IU/ml, y preferentemente de al menos 5 IU/ml. Generalmente, el contenido en agua de la fracción líquida del hidrolizado procedente de la etapa de hidrólisis está comprendido entre el 85 y el 95% con respecto al peso total de la fracción líquida del hidrolizado.

Como se indica en la figura 1, el hidrolizado se evacúa de dicho reactor 3 por el conducto 7 y una porción (o fracción) del hidrolizado se envía, a través de la línea 8, a una unidad de tratamiento que permite reducir el contenido en agua de la fracción líquida del hidrolizado con el fin de llevar este contenido a un valor inferior o igual al 65% en peso con respecto al peso total de la fracción líquida, preferentemente inferior al 60% en peso, y de manera aún más preferida inferior al 50%.

El contenido en agua de la fracción líquida del hidrolizado se determina filtrando una muestra de hidrolizado en un medio filtrante de porosidad 1,2 μm a fin de recuperar una fracción líquida. Dicha fracción líquida se somete después al ensayo según la norma ASTM E1756-01 que consiste en medir la pérdida de masa de la fracción líquida por secado a 105°C hasta obtener una masa constante del residuo. La masa perdida durante el secado corresponde así a la masa de agua presente inicialmente en la muestra y la masa restante corresponde a las materias sólidas y solubles contenidas en la fracción líquida.

La etapa de reducción del contenido en agua se puede efectuar mediante todas las técnicas de concentración conocidas por el experto en la técnica, como por ejemplo por separación membranaaria (por ejemplo ósmosis inversa, nanofiltración), por evaporación de una parte del agua, por extracción líquido-líquido. Según una variante no representada, la reducción del contenido en agua se obtiene por mezcla del hidrolizado con una solución de azúcares más concentrada, como por ejemplo un jarabe de glucosa.

De manera preferida, el tratamiento de concentración implica al menos una etapa de evaporación del agua. Se detallarán ahora, en referencia a la figura 1, tres modos de realización.

Según un primer modo de realización preferido, esta etapa de reducción del contenido en agua del hidrolizado se realiza en un evaporador a fin de extraer el agua y así concentrar el hidrolizado en azúcares. Al menos una parte del hidrolizado extraído del reactor de hidrólisis 3 se envía a través de la línea 8, 8a a un evaporador 9 a fin de evaporar el agua. Esta evaporación se lleva a cabo calentando el hidrolizado a una temperatura inferior a 90°C y preferentemente comprendida entre 40 y 70°C bajo presión atmosférica o a vacío. La temperatura de realización se selecciona con el fin de no desnaturalizar las celulasas presentes en el hidrolizado y que son útiles para la operación

siguiente de incubación como se explica a continuación. El efluente empobrecido en agua procedente del evaporador 9 se transfiere después por la línea 10 a un reactor de incubación 11.

Según un segundo modo de realización, como se indica en la figura 1, el hidrolizado extraído por la línea 8 se divide en dos flujos respectivamente por las líneas 12 y 13. El flujo de hidrolizado retirado por la línea 12 se envía hacia un evaporador 14 que opera a una temperatura superior a 90°C, a fin de extraer el agua y así concentrar el hidrolizado en azúcares y en particular en glucosa. Al final de la etapa de evaporación, el hidrolizado se envía a la incubadora 11 gracias a la línea 15. En cuanto al flujo de hidrolizado retirado por la línea 13, éste se envía directamente a la incubadora 11 con el fin de aportar las celulasas necesarias para la conversión de la glucosa en oligosacáridos.

Según un tercer modo de realización, que combina los dos primeros modos de realización descritos antes, el hidrolizado extraído por la línea 8 se divide en tres flujos que son enviados respectivamente por las líneas 8a, 12 y 13 al evaporador 9, al evaporador 14 y a la incubadora 11.

Conforme a la invención, el procedimiento de producción de oligosacáridos comprende una etapa de incubación del hidrolizado cuya fracción líquida comprende un contenido en agua inferior o igual al 65% en peso. El objetivo de esta etapa es realizar la conversión de al menos una parte de la glucosa en oligosacáridos que tienen unas propiedades inductoras de expresión de genes que codifican unas celulasas en los hongos. En particular, la etapa de incubación permite producir soforosa, dímero de moléculas de glucosas unidas por una unión β -1-2 y/o gentiobiosa, dímero de moléculas de glucosas unidas por una unión β -1-6. Preferentemente, la solución de oligosacáridos contiene una mezcla de soforosa y de gentiobiosa a una concentración total (soforosa + gentiobiosa) generalmente inferior a 30 g/l. Estos dos oligosacáridos (o disacáridos) son potentes inductores para la secreción de celulasas en hongos filamentosos y en particular en *Trichoderma reesei*.

Esta etapa de incubación consiste en calentar el hidrolizado a una temperatura comprendida entre 40 y 70°C, preferentemente entre 50 y 65°C durante un tiempo comprendido entre 0,1 y 100 horas, preferentemente durante al menos 24 horas, y de manera muy preferida entre 24 y 72 horas.

Al final de la etapa de incubación, una solución acuosa que comprende unos oligosacáridos se retira de la incubadora 11 por el conducto 16.

Según un modo de realización alternativo del procedimiento de síntesis de oligosacáridos (no representado en la figura 1), el hidrolizado retirado por el conducto 8 se trata en una unidad de separación sólido/sólido del cual se evacúa una fracción sólida y una fracción líquida de hidrolizado que contiene glucosa y celulasas. La fracción líquida de hidrolizado se trata después según uno de los tres modos de realización descritos anteriormente, con el fin de reducir su contenido en agua antes de la etapa de incubación. Esta separación sólido/líquido puede utilizar una de las técnicas siguientes: la centrifugación, el drenaje, el prensado, la filtración, la decantación.

En referencia a la figura 1, el procedimiento según la invención puede comprender una etapa opcional de separación sólido/líquido, mediante la unidad 17, efectuada en el efluente procedente del reactor de pretratamiento. Esta etapa permite así extraer:

* una fracción líquida que contiene unos azúcares procedentes de la hemicelulosa (por ejemplo xilosa, arabinosa, galactosa y manosa) por la línea 18; y

* una fracción que contiene unos sólidos (la biomasa pretratada) que se envía al reactor de hidrólisis 3 por la línea 2a.

Conforme a la figura 1, todo o parte de la fracción líquida 18 está o bien directamente mezclada con el efluente procedente de la incubadora 11 a través de la línea 20, o bien se envía por la línea 19 al evaporador 14 sola o en mezcla con el hidrolizado procedente de la etapa de hidrólisis a fin de evaporar el agua, o bien (por una línea no representada) al evaporador 9 sola o en mezcla con el hidrolizado.

Según la invención, para reducir el contenido en agua en el hidrolizado, se puede utilizar otro método, alternativo o complementario a los descritos anteriormente, que consiste en añadir azúcar en el hidrolizado.

En referencia a la figura 2, el procedimiento de producción de celulasas según la invención utiliza además unas etapas ya descritas anteriormente, una etapa de producción de celulasas mediante un fermentador 4 y que utiliza los oligosacáridos que son sintetizados *in situ*. La producción de enzimas se utiliza en el fermentador 4 mediante un microorganismo que se aporta a través de la línea 6. Los microorganismos se seleccionan preferentemente entre las bacterias celulolíticas que pertenecen al género *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermonospora*, *Streptomyces* o entre los hongos celulolíticos del género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*. Entre estos, *Trichoderma reesei* es la especie preferida ya que es capaz de segregar unas concentraciones importantes de celulasas muy activas.

Como se representa en la figura 2, todo o parte del efluente que se extrae por la incubadora 11 a través la línea 16

se envía al fermentador 4.

Estas cepas se cultivan en fermentadores agitados y aireados en condiciones compatibles con su crecimiento y la producción de enzimas. Se puede utilizar todo tipo de procedimiento de producción adaptado al microorganismo conocido por el experto en la materia. En particular, se realiza un procedimiento de tipo "alimentación sin trasiego" (o "fed-batch" según la terminología anglosajona) como se describe en el documento FR 2 555 603.

Para este fin, se prepara un precultivo que contiene el microorganismo y un medio de cultivo que contiene sales minerales y complementos vitamínicos habituales y una fuente de carbono y de energía, preferentemente en forma de azúcares solubles (por ejemplo la lactosa, la glucosa, la xilosa, la arabinosa). El precultivo se transfiere después a un fermentador de producción de enzimas que comprende un medio de cultivo que contiene al menos un azúcar y suplementado de manera regular con la solución inductora de oligosacáridos. Se procede después a la producción de las enzimas en el fermentador manteniendo el contacto necesario entre el microorganismo, el medio de cultivo y aportando regularmente (por ejemplo en continuo) la solución inductora de oligosacáridos.

La solución acuosa que contiene los oligosacáridos inductores se inyecta, después del agotamiento de la fuente de carbono inicial, de manera regular o en continuo con el fin de aportar una cantidad optimizada, comprendida entre 35 y 135 mg de azúcares totales (que contienen los oligosacáridos inductores) por gramo de células y por hora, y preferentemente entre 35 y 45 mg.

Como se indica en la figura 2, todo o parte del mosto de fermentación que contiene las celulasas de interés se retira del fermentador 4 por la línea 5 para alimentar el reactor de hidrólisis 3.

La figura 3 es una representación de un modo de realización del procedimiento de producción de alcoholes, de disolventes o de ácidos orgánicos que integra una unidad de producción de celulasas mediante oligosacáridos producidos a partir de un flujo interno al procedimiento.

En referencia a la figura 3, la fracción (o porción) del hidrolizado que no se utiliza para la síntesis *in situ* de oligosacáridos se envía a través de la línea 21 a una unidad de fermentación 22 de los azúcares presentes en el hidrolizado.

En la unidad de fermentación 22, el hidrolizado se pone en contacto con uno o varios micro-organismos de fermentación, introducidos por la línea 23. Los azúcares fermentables se transforman así en alcoholes, disolventes o ácidos orgánicos solos o en mezcla por los microorganismos. La etapa de fermentación en la unidad 22 se puede realizar a una temperatura entre 30°C y 40°C, a un pH comprendido entre 3 y 6,5. Al final de la etapa de fermentación, se obtiene un mosto de fermentación, evacuado por el conducto 24 de la unidad 22, que comprende unas materias en suspensión y una fase líquida en la que se encuentra el o los productos buscados (alcoholes y/o disolventes).

El mosto procedente de la unidad de fermentación 22 se introduce mediante el conducto 24 en una unidad de separación (no representada) que permite separar el mosto en diferentes productos: los alcoholes y/o los disolventes, una vinaza líquida que contiene unos azúcares no fermentados y un residuo sólido que comprende principalmente la lignina, así como celulosa, hemicelulosa que no se han hidrolizado.

Por ejemplo, la fermentación puede ser del tipo:

a) "etanólica" que corresponde a la producción de etanol como alcohol mayoritario mediante levaduras (por ejemplo, *S. cerevisiae*) o de bacterias (por ejemplo, *Z. mobilis*) u otros micro-organismos.

b) "butílica", que a su vez agrupa aquí:

* una fermentación que produce n-butanol solo;

* una fermentación "ABE" que corresponde a la producción de una mezcla que comprende acetona, n-butanol (producto mayoritario), etanol. También pueden estar presentes unas trazas de isopropanol.

* una fermentación "IBE" que corresponde a la producción de isopropanol, de n-butanol (producto mayoritario) y de etanol.

Estas fermentaciones se realizan generalmente mediante microorganismos del género *Clostridium* y se llevan a cabo es estricta anaerobiosis.

* una fermentación "isobutílica" que corresponde, en general, a la producción de isobutanol solo. Numerosos microorganismos, todos genéticamente modificados, tienen la posibilidad de realizar esta conversión (por ejemplo *E. coli*, *Corynebacterium*, *S. cerevisiae*) a partir de la vía de los aminoácidos.

c) "propílica", que corresponde a la producción de propanol o de isopropanol.

Según un modo de realización del procedimiento de producción de alcohol y/o de disolvente que integra una unidad de producción de celulasas mediante oligosacáridos producidos a partir de un flujo interno al procedimiento, la fermentación de los azúcares en alcoholes y/o disolventes se realiza de manera concomitante a la etapa de hidrólisis enzimática (modo de realización "SSF" por *Simultaneous Saccharification and Fermentation*). En referencia a la figura 4, el efluente procedente de la unidad de pretratamiento 1 se divide en dos flujos a través de las líneas 2 y 25. El flujo 2 que contiene la biomasa pretratada se envía a la unidad de producción *in situ* de celulasa tal como se describe en la figura 2. En cuanto al flujo 25, éste se transfiere hacia la unidad de fermentación SSF 26 que realiza simultáneamente:

* la hidrólisis de la celulosa gracias a las celulasas aportadas por la línea 27 que proviene de la unidad de producción *in situ* de celulasas 4, y

* la fermentación de los azúcares fermentables liberados durante la hidrólisis enzimática gracias a los microorganismos que son introducidos por la línea 23.

Cuando la hidrólisis enzimática y la fermentación alcohólica se realizan en una misma y única operación (procedimiento SSF), la temperatura está generalmente comprendida entre 30 y 45°C, y el pH comprendido entre 4 y 6.

Cabe señalar que es muy posible combinar los modos de realización descritos en relación con el procedimiento de producción de oligosacáridos y de celulasas en el ámbito del procedimiento de producción de alcoholes y/o de disolventes según la presente invención.

Ejemplos

En lo que sigue, se designa bajo la abreviatura "MS" las materias secas (sólidas y solubles) presentes en un medio. El porcentaje de materias secas (o "Total Solids") se determina según el método ASTM E1756-01 que consiste en una pérdida de masa a 105°C hasta la obtención de una masa constante de residuo.

Ejemplo 1 (no conforme):

Se realiza una hidrólisis enzimática de paja pretratada por cocción ácida en un medio que comprende un 15% en peso de MS (15 g de masa seca de paja para 100 g de masa total) mediante un cóctel de celulasas producido por *Trichoderma reesei*. La cantidad de celulasas utilizada para la hidrólisis se ha fijado en 10 mg de celulasas por gramo de materia seca (MS). La mezcla se pone en hidrólisis a una temperatura de 50°C y bajo agitación durante 72 horas. Al final de la hidrólisis, se recupera un hidrolizado bruto que tiene una concentración en glucosa de 75 g/l, una actividad β -glucosidasa de 10 IU/ml. Además, la fracción líquida tiene un contenido en agua del 92% en peso con respecto al peso de la fracción líquida.

El hidrolizado bruto se pone después a incubar durante 24 horas a 50°C bajo agitación. Al final de la fase de incubación, el hidrolizado se pone a hervir durante 5 minutos a fin de desnaturalizar las enzimas, después se analiza por HPLC. El análisis indica que el hidrolizado no contiene oligosacáridos.

El ejemplo 1 no conforme a la invención muestra que la incubación de un hidrolizado que tiene un contenido en agua superior al 65% en peso no permite transformar al menos una parte de la glucosa en oligosacáridos, y en particular en soforosa y/o gentiobiosa.

Ejemplo 2 (según la invención):

El hidrolizado bruto obtenido en el ejemplo 1 se complementa con jarabe de glucosa al 60% en peso a fin de obtener una fracción líquida que tiene una concentración en glucosa de 500 g/l y un contenido en agua del 57,5% en peso de agua con respecto al peso total de la fracción líquida de hidrolizado. La mezcla se pone a incubar durante 24 horas a 50°C bajo agitación. Al final de la fase de incubación, la mezcla se pone a hervir durante 5 minutos a fin de desnaturalizar las enzimas, después se analiza por HPLC. El hidrolizado obtenido contiene 22 g/l de una mezcla de soforosa y de gentiobiosa y 477 g/l de glucosa (es decir, un 4,4% de conversión de la glucosa en oligosacáridos).

Ejemplo 3 (según la invención):

El hidrolizado bruto obtenido en el ejemplo 1 se filtra mediante un filtro de porosidad 100 μm , a fin de separar:

* una fracción líquida que contiene un 12% en peso de materia seca (MS);

* una fracción sólida que contiene un 35% en peso de materia seca (MS).

La fracción líquida contiene 75 g/l de glucosa y tiene una actividad β -glucosidasa de 6 IU/ml y un contenido en agua de aproximadamente un 90% en peso.

La fracción líquida se complementa después con jarabe de glucosa al 60% en peso a fin de obtener una fracción líquida que tiene una concentración en glucosa de 500 g/l y un contenido en agua del 57,5% en peso. La mezcla se pone a incubar durante 24 horas a 50°C bajo agitación. Al final de la fase de incubación, la mezcla se pone a hervir durante 5 minutos a fin de desnaturalizar las enzimas y después se analiza por HPLC. El análisis indica que el hidrolizado contiene aproximadamente 11 g/l de una mezcla de soforosa y de gentiobiosa y 488 g/l de glucosa (es decir un 2,2% de conversión de la glucosa en oligosacáridos).

Ejemplo 4 (según la invención):

Se prepara una solución acuosa que contiene 300 g/l de glucosa, 300 g/l de xilosa y 10 IU/ml de actividad β -glucosidasa y cuyo contenido en agua es de aproximadamente un 50% en peso. Esta solución se pone a incubar durante 24 horas a 50°C bajo agitación. Después de la incubación, la mezcla se pone a hervir durante 5 minutos a fin de desnaturalizar las enzimas y después se analiza por HPLC. El hidrolizado contiene así 21 g/l de mezcla soforosa y gentiobiosa (es decir un 7% de conversión de glucosa en oligosacáridos), 278 g/l de glucosa y 300 g/l de xilosa.

Los ejemplos 2 a 4 según la invención muestran que es posible producir unos oligosacáridos por incubación de un hidrolizado de biomasa lignocelulósica cuando su fracción líquida tiene un contenido en agua inferior al 65% en peso con respecto al peso total de la fracción líquida.

El ejemplo 4 indica además que es posible sustituir al menos una parte de la glucosa por unas pentosas en la solución de incubación para producir unos oligosacáridos inductores.

Ejemplo 5 (según la invención):

Cuatro biorreactores Dargip de volumen útil de 750 ml que contienen un medio salino (5 g/l KH_2PO_4 , 2,8 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,6 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,6 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 60 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 13 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 17 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/l cornsteep) y 15 g/l de glucosa son esterilizados, después inoculados con un precultivo de *Trichoderma reesei* en frasco. A lo largo del cultivo, el pH se mantiene a 4,8 por adición de base amoníaco NH_4OH o de ácido sulfúrico H_2SO_4 . Después del agotamiento de la glucosa (después de aproximadamente 30 horas), se realiza una síntesis de celulasas segregadas por *Trichoderma reesei* en modo semi-continuo (o "fed-batch") mediante soluciones acuosas que contienen cada una un contenido total en azúcares de 250 g/l pero de composición diferentes en azúcar:

* la solución 1 contiene sólo glucosa sola a 250 g/l;

* la solución 2 es la fracción líquida del ejemplo 2 diluida con agua de tal manera que contiene 11 g/l de una mezcla soforosa y gentiobiosa y 239 g/l de glucosa;

* la solución 3 es la fracción líquida del ejemplo 3 diluida con una solución acuosa de glucosa a 100 g/l, de manera que contiene 6 g/l de una mezcla soforosa y gentiobiosa y 244 g/l de glucosa;

* la solución 4 contiene sólo lactosa sola a 250 g/l.

La concentración en proteínas (celulasas) en el medio de cultivo se mide mediante el método de Lowry [Lowry, Rosenbrough, Farr, Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biochemical Chemistry 193 (1) páginas 265-275].

Con la solución 1, no se observa ninguna inducción de la producción de proteínas. La concentración en proteínas sigue estable a aproximadamente 1 a 2 g/l después de 250 horas de cultivo.

Cuando se utilizan las soluciones 2, 3 y 4 (según la invención) para el cultivo, se observa una producción de proteínas. Después de 250 horas de cultivo, el medio de cultivo contiene respectivamente 35 g/l, 36 g/l y 34 g/l de proteínas. El procedimiento según la invención permite por lo tanto producir unas celulasas por microorganismos a partir de una solución inductora, que contiene una mezcla de soforosa y de gentiobiosa, obtenida a partir de un hidrolizado de material lignocelulósico.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de oligosacáridos a partir de biomasa lignocelulósica que comprende al menos las etapas siguientes:
- 5 a) se pretrata en un reactor de pretratamiento la biomasa con el fin de proporcionar un efluente que contiene un sustrato pretratado;
- 10 b) se lleva a cabo, en un reactor, una hidrólisis enzimática del sustrato pretratado contenido en el efluente procedente de la etapa a) en presencia de celulasas con el fin de producir un hidrolizado que contiene glucosa, celulasas y agua;
- c) se extrae al menos una parte del hidrolizado procedente de la etapa b) que comprende una fracción líquida;
- 15 d) se reduce el contenido en agua de dicha parte del hidrolizado extraído en la etapa c) de manera que la fracción líquida del hidrolizado presente un contenido en agua inferior al 65% en peso de agua con respecto al peso total de la fracción líquida del hidrolizado;
- 20 e) se incuba a una temperatura comprendida entre 40 y 70°C el hidrolizado procedente de la etapa d) durante el tiempo necesario para producir un efluente enriquecido en oligosacáridos.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que, en la etapa d) se concentra por evaporación a una temperatura inferior a 90°C el hidrolizado extraído en la etapa c).
- 25 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que en la etapa d) se añade glucosa en el hidrolizado extraído en la etapa c).
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que en la etapa d) se efectúa una separación membranaria del hidrolizado extraído en la etapa c) a fin de separar al menos una parte del agua de la fracción líquida.
- 30 5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que en la etapa d) se separa el hidrolizado extraído en la etapa c) en al menos una primera porción y una segunda porción, se concentra la primera porción de hidrolizado a una temperatura superior a 90°C y se mezcla la porción de hidrolizado concentrado con la segunda porción de hidrolizado.
- 35 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que se efectúa una separación sólido/líquido del efluente procedente de la etapa a) con el fin de recuperar una fracción líquida que contiene unos azúcares y una fracción sólida que contiene el sustrato pretratado, siendo dicha fracción sólida enviada en la etapa b).
- 40 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que en la etapa d) se trata el hidrolizado en mezcla con la fracción líquida.
8. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que se mezcla la fracción líquida con el efluente enriquecido en oligosacáridos procedente de la etapa e).
- 45 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el efluente procedente de la etapa e) comprende soforosa y/o gentiobiosa.
10. Procedimiento de producción de celulasas a partir de biomasa lignocelulósica que comprende un procedimiento de producción de oligosacáridos según una de las reivindicaciones 1 a 9 y además las etapas:
- 50 f) se envía al menos una parte del hidrolizado enriquecido en oligosacáridos a un reactor que contiene un medio de cultivo y unos microorganismos capaces de producir las celulasas; y
- 55 g) se pone en cultivo la mezcla obtenida en la etapa f) con el fin de producir un efluente enriquecido en celulasas.
11. Procedimiento de producción de celulasas según la reivindicación 10, en el que el microorganismo utilizado en la etapa f) es del género *Trichoderma reesei*.
- 60 12. Procedimiento de producción de celulasas según una de las reivindicaciones 10 u 11, en el que la etapa g) se realiza en modo semi-continuo.
13. Procedimiento de producción de celulasas según una de las reivindicaciones 10 a 12, en el que se efectúa una separación sólido/líquido del efluente procedente de la etapa g) con el fin de recuperar una fracción líquida que contiene las celulasas y se recicla dicha fracción líquida en el reactor de la etapa b).
- 65

- 5 14. Procedimiento de producción de alcoholes, de disolventes o de ácidos orgánicos solos o en mezcla que comprende las etapas del procedimiento de producción de celulasas según una de las reivindicaciones 10 a 13, y en el que se envía una parte del hidrolizado procedente de la etapa b) a un reactor de fermentación que comprende unos microorganismos a fin de producir un mosto de fermentación que comprende unos alcoholes y/o unos disolventes.
- 10 15. Procedimiento de producción de alcoholes, de disolventes o de ácidos orgánicos solos o en mezcla que comprende las etapas del procedimiento de producción de celulasas según una de las reivindicaciones 10 a 13, y en el que se envía una parte del efluente procedente de la etapa a) a una unidad de hidrólisis y de fermentación simultáneas.
- 15 16. Procedimiento según la reivindicación 14 o 15, en el que se efectúa una fermentación etanólica a fin de producir etanol como alcohol mayoritario.
- 15 17. Procedimiento según la reivindicación 14 o 15 en el que se efectúa una fermentación butílica a fin de producir n-butanol solo o en mezcla con acetona o iso-propanol.

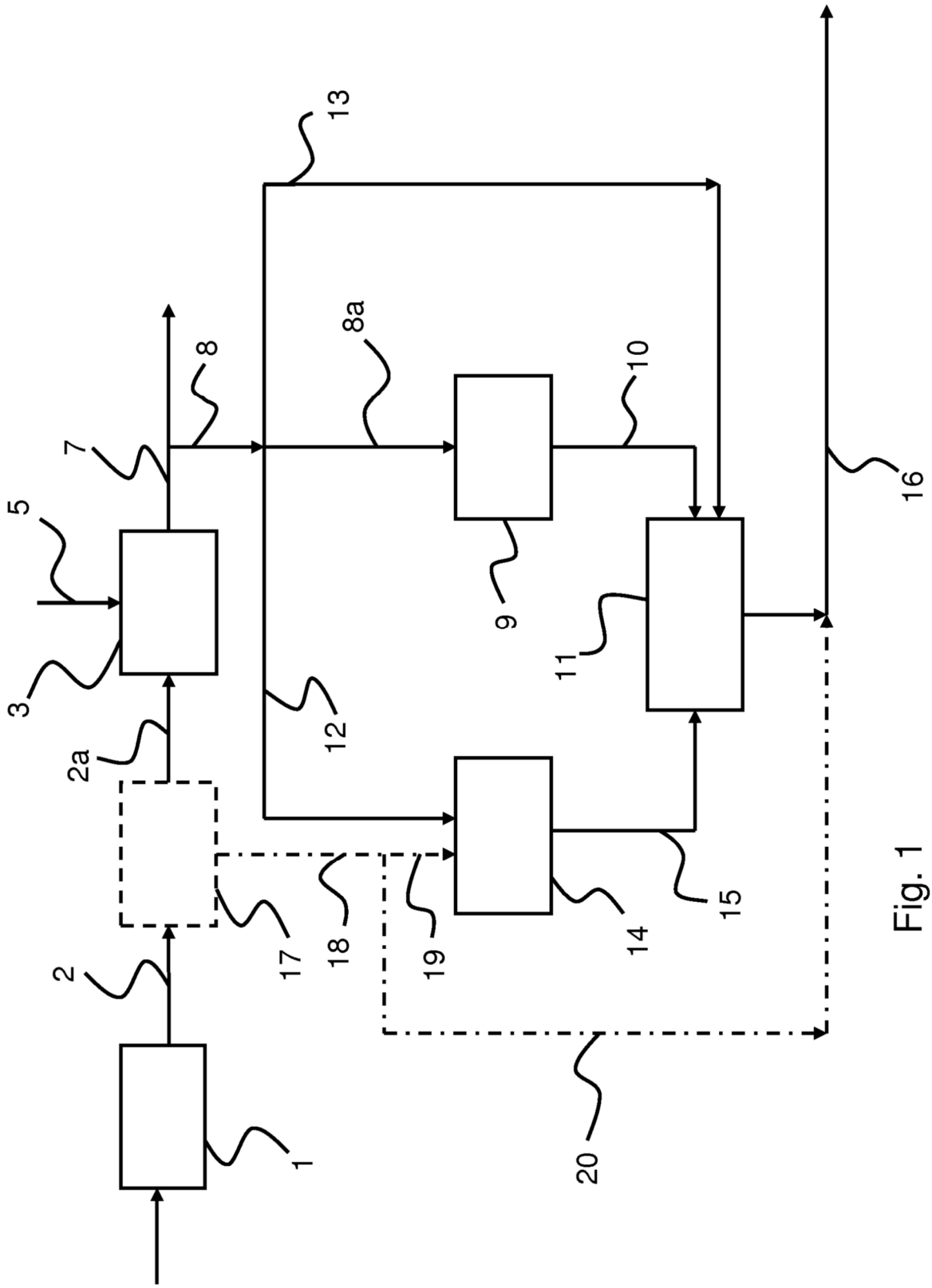


Fig. 1

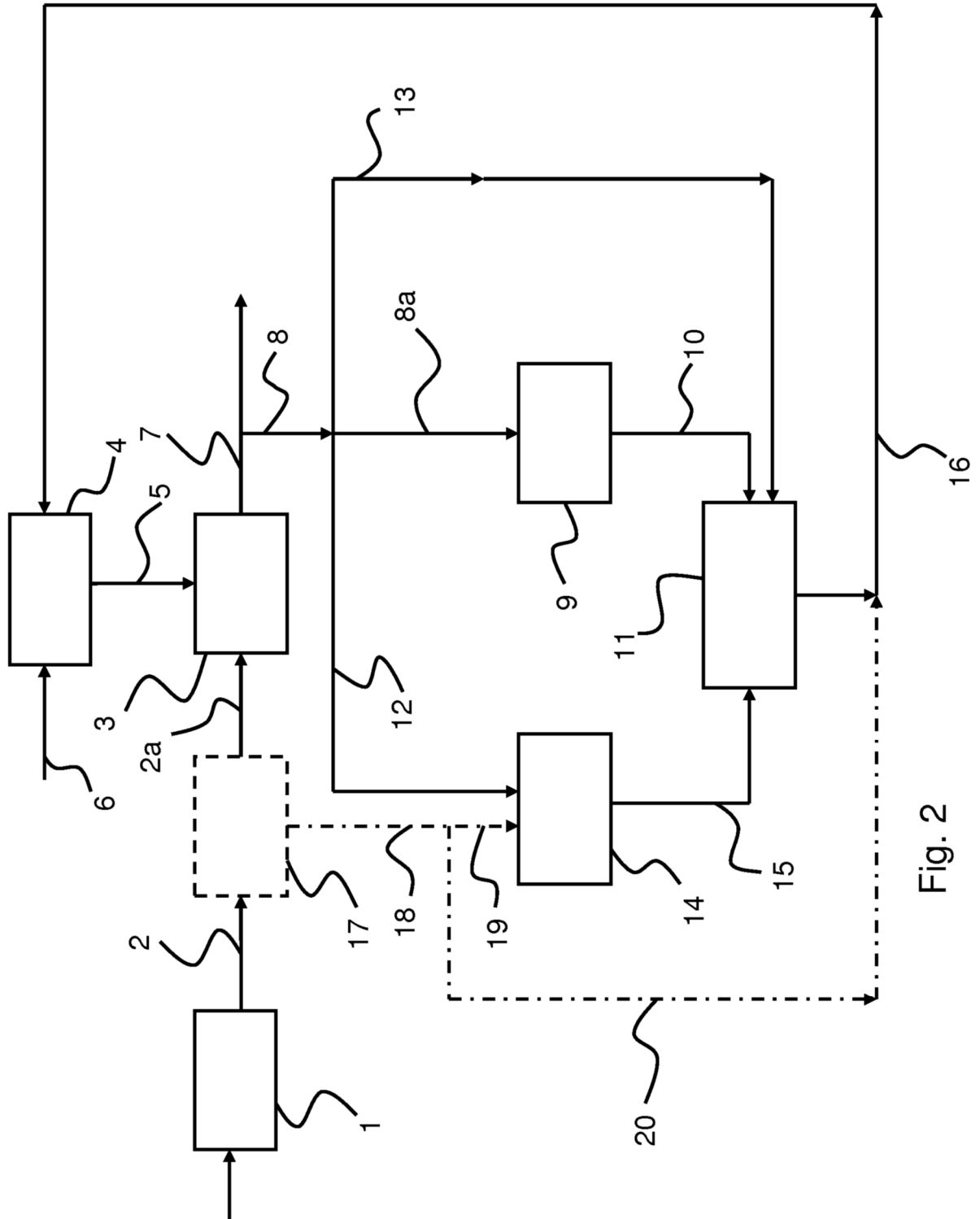


Fig. 2

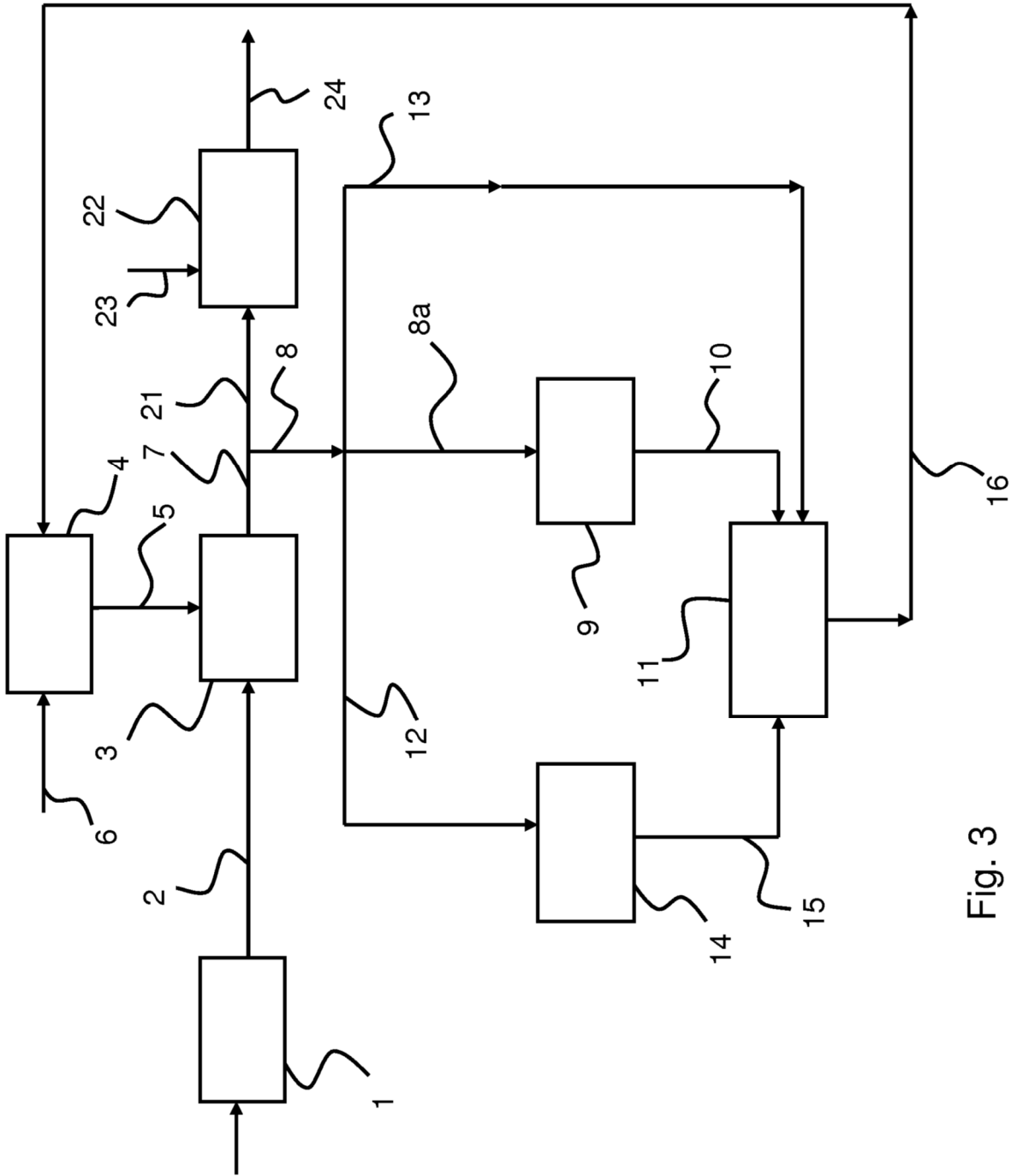


Fig. 3

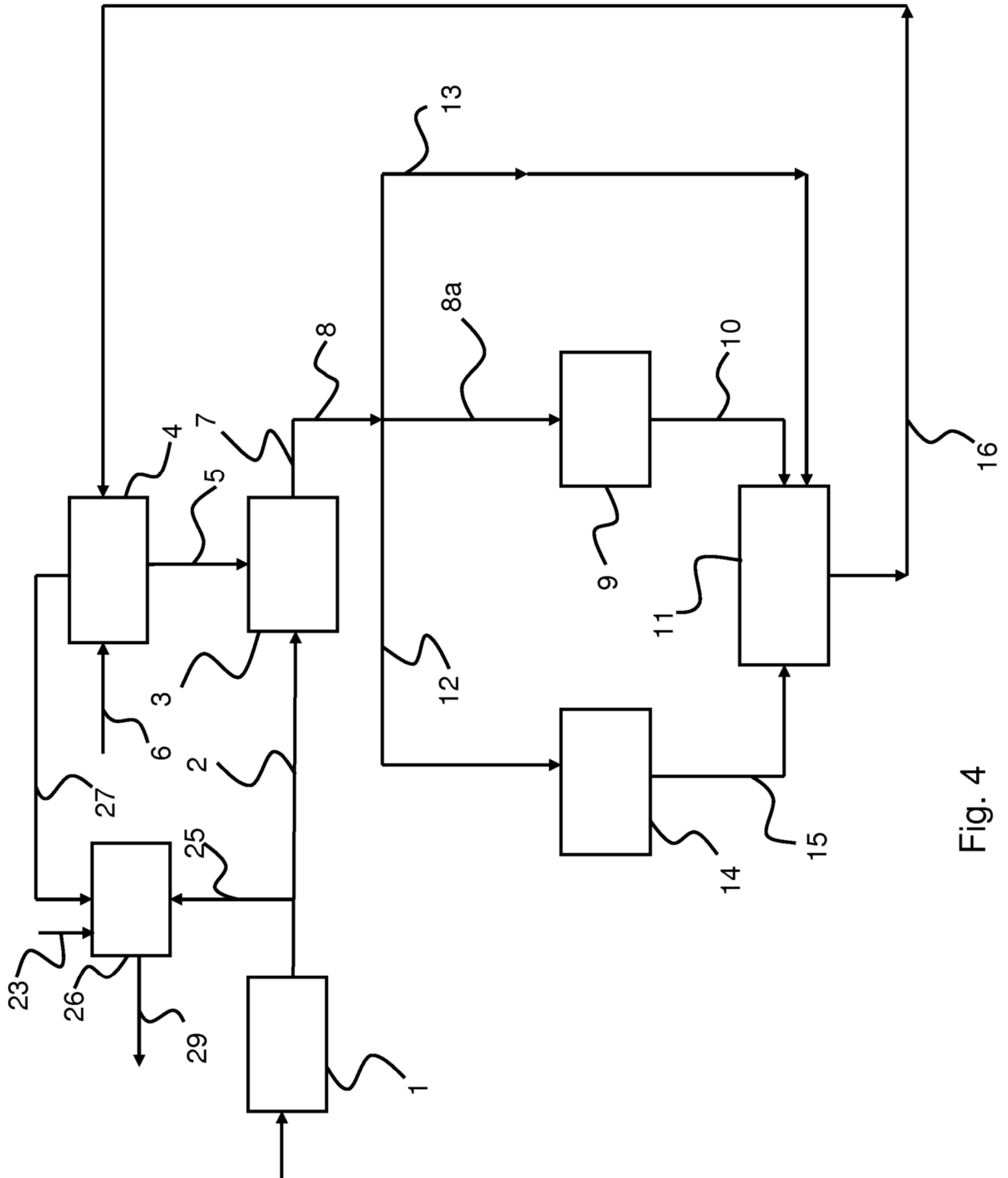


Fig. 4