(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 625 501**

(51) Int. CI.:

C12N 9/24 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)
C12P 1/02 (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01)
C12P 19/00 (2006.01)
C12R 1/885 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2011 PCT/FR2011/000350**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2012 WO12007650**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2011 E 11740955 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2593543**

(54) Título: **Procedimiento mejorado de producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas**

(30) Prioridad:

12.07.2010 FR 1002923

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.07.2017

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

BEN CHAABANE, FADHEL y
MONOT, FRÉDÉRIC

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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 mejorado de producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas

Ámbito de la invención

La invención es relativa a un procedimiento de producción de enzimas para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica.

Técnica anterior

El aumento de las capacidades de producción de bioetanol por sus cualidades de biocarburante es hoy en día un asunto de actualidad. Los objetivos de incorporación están siendo discutidos en el seno de la Unión Europea sobre la base de une proposición inicial de un 20 % de utilización de energías renovables de aquí al 2020 con una incorporación del 10 % de biocarburantes según unos criterios de duración que deberían favorecer a los biocarburantes de segunda generación producidos a partir de biomasa lignocelulósica.

La biomasa lignocelulósica se caracteriza por una estructura compleja constituida por tres polímeros principales: la celulosa, la hemicelulosa y la lignina.

De forma clásica, el procedimiento de transformación de biomasa en etanol comprende varias etapas. Un pretratamiento permite hacer accesible la celulosa y eventualmente las hemicelulosas, que son los objetivos de la hidrólisis enzimática a las enzimas. El objetivo del pretratamiento es modificar las propiedades físicas y fisicoquímicas del material lignocelulósico, con objeto de mejorar la accesibilidad de la celulosa atrapada en la matriz de lignina y hemicelulosa. La etapa de hidrólisis enzimática permite la transformación de la celulosa y de las hemicelulosas en azúcares mediante la utilización de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas.

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

Finalmente, una etapa de destilación permite separar y recuperar el producto procedente de la fermentación así obtenido, por lo tanto, el etanol en el caso anterior, del mosto de fermentación.

Los diferentes estudios técnico-económicos demuestran la necesidad de reducir el coste relacionado con la etapa de hidrólisis enzimática para llevar el coste del etanol producido a unos valores próximos a los del etanol obtenido a partir de almidón.

En el momento actual, las celulasas industriales son producidas principalmente por un hongo filamentoso, *Trichoderma reesei*, gracias a su fuerte poder de secreción de celulasas.

Uno de los medios para la diminución de los costes consiste en optimizar las condiciones operativas del procedimiento de producción de las celulasas de forma que se aumente la productividad, o para obtener un cóctel enzimático que tenga una actividad específica mejorada.

Las cepas salvajes de *Trichoderma reesei* tienen la facultad de secretar, en presencia de un sustrato inductor, un complejo enzimático bien adaptado para la hidrólisis de la celulosa. Las enzimas del complejo enzimático contienen tres principales tipos de actividad: las endoglucanasas, las exoglucanasas y las celobiasas. Otras proteínas, tales como las xilanasas, necesarias para la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica, son igualmente producidas por *Trichoderma reesei*. La presencia de un sustrato inductor es indispensable para la expresión de las enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas.

La regulación de los genes de las celulasas sobre diferentes fuentes de carbono ha sido estudiada con detalle. La glucosa ejerce una represión catabólica sobre la producción de celulasas. Ésta es inducida en presencia de celulosa, de sus productos de hidrólisis, como la celobiosa o ciertos oligosacáridos, particularmente disacáridos, como la lactosa o la soforosa (Ilmén y al. 1997, Appl. Environ. Microbiol. Vol. 63, págs. 1298-1306). La naturaleza del sustrato carbonado tiene una fuerte influencia sobre la composición del complejo enzimático. Así, la xilosa, asociada a un sustrato carbonado inductor como la celulosa o la lactosa, permite mejorar significativamente la actividad de xilanasa cuando está presente a unas concentraciones limitantes del orden de entre 0,5 y 1 mM (Mach-Aigner y al., 2010 Applied and Environmental Microbiology, Vol. 76 nº 6, págs. 1770-1776). La solubilización de las hemicelulosas residuales (los xilanos) por parte de las xilanasas permitiría favorecer la hidrólisis enzimática (Vàrnai y al., 2010 Enzyme and Microbial Technology Vol. 46 págs. 185-193).

Para obtener unas buenas productividades en las enzimas es necesario aportar una fuente de carbono rápidamente asimilable para permitir un rápido crecimiento de *Trichoderma reesei*, y un sustrato inductor que permita la expresión de las celulasas y su secreción en el medio de cultivo. La celulosa puede jugar estos dos papeles. No obstante, es

difícil de utilizar a escala industrial, y ha sido sustituida por fuentes de carbono solubles, tales como la lactosa, que igualmente juega el papel de sustrato inductor.

Otros azúcares tales como la celobiosa o la soforosa han sido igualmente descritos como inductores (limen y al. (1997), Foreman y al. (2003) Biol Chem 278, págs. 31988-31997, Pakula y al. (2005) Microbiology, 151, págs. 135-143) pero son demasiado costosos para ser utilizados a escala industrial.

De forma general, se ha constatado que las producciones de celulasas por parte de *Trichoderma reesei* con sustratos solubles son muy inferiores a las obtenidas con celulosa en modo « batch » (es decir, en un medio cerrado) debido al efecto represor de los azúcares fácilmente asimilables a una elevada concentración.

La patente FR-B-2 555 603, depositada a nombre de la Demandante, propone una alimentación continua de los sustratos carbonados que permite aumentar la represión catabólica limitando la concentración residual en los cultivos y optimizando la cantidad de azúcares, para obtener un mejor rendimiento y una mejor productividad enzimática. El procedimiento descrito en esa patente propone comenzar la alimentación con sustrato utilizando azúcares solubles como fuente de carbono, eventualmente en forma de una mezcla. Sin embargo un aporte continuo limitante de glucosa o de xilosa no asociado a la lactosa o a otro inductor de celulasas (soforosa, celobiosa,...) no permite la obtención de unas grandes productividades en enzimas.

La lactosa sigue siendo, en los procedimientos de producción industriales de enzimas celulolíticas, uno de los sustratos más apropiados. Además de ser elevado, su precio varía mucho y representa aproximadamente un tercio del precio de coste de las enzimas.

Una de las soluciones contempladas y presentadas en la patente EP-B-0 448 430 consiste en la utilización de sustratos carbonados procedentes del sector, por ejemplo, hemicelulosas hidrolizadas, como fuente de carbono inductora. Sin embargo, la productividad sigue siendo inferior a aproximadamente el 50 % con respecto al procedimiento que utiliza la lactosa como el único sustrato inductor.

La solicitud de patente WO 2009/026716 describe un procedimiento de producción de celulasas en el que los derivados hemicelulolíticos representan más del 40 % de la fuente de carbono, y los azúcares inductores de la producción de celulasas representan entre el 3 y el 20 % de esta mezcla. Este procedimiento permite la producción de al menos dos veces más de celulasas con respecto a un procedimiento que utiliza únicamente dos azúcares procedentes de las hemicelulosas. Sin embargo, los rendimientos de producción de celulasas descritos siguen siendo todavía inferiores a los de un procedimiento que utiliza únicamente lactosa.

Las investigaciones actuales demuestran que es necesario, para mejorar los procedimientos de producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas, desarrollar nuevos sustratos inductores, que se comporten al menos como los que utilizan lactosa, y con un menor coste.

Es en este ámbito en el que se inscribe la presente invención.

Resumen de la invención

La presente invención describe un procedimiento de producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas en el que el sustrato inductor es una mezcla de glucosa, lactosa y xilosa.

Descripción detallada de la invención

El procedimiento de producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas por parte de un microorganismo celulolítico y/o hemicelulolítico según la presente invención comprende al menos una fase de crecimiento en presencia de una fuente de carbono y al menos una fase de producción en presencia de un sustrato inductor, en el que dicho sustrato inductor es una mezcla de glucosa o de hidrolizados celulósicos, de lactosa y de xilosa, o de una solución de hidrolizados hemicelulolíticos, estando definidos el contenido de cada uno de los constituyentes de la mezcla por los siguientes límites:

- del 40 al 65 % en peso de glucosa,
- del 21 al 25 % en peso de lactosa y
- del 10 al 39 % en peso de xilosa,

siendo la suma de estos tres constituyentes igual a 100 %.

El sustrato inductor está desprovisto de cualquier otro azúcar distinto a los constituyentes indicados anteriormente. Así, las proporciones relativas de cada uno de los constituyentes se eligen de forma que la suma de los contenidos ponderales sea igual a 100 %.

Gracias al procedimiento según la invención, que utiliza una mezcla de azúcares particulares como sustrato inductor, las concentraciones finales de proteínas obtenidas son entre un 50 y un 60 % superiores a las obtenidas con la lactosa utilizada como único sustrato de producción. Igualmente son aproximadamente 3 veces superiores a las obtenidas con las mezclas mejoradas ricas en xilosas tales como las descritas en el documento de la técnica anterior WO 2009/026716.

El procedimiento según la presente invención utiliza una mezcla a base de glucosa. Más del 60 % de la lactosa, inductor de la producción de celulosa, puede ser sustituido por glucosa, conocido por lo tanto por ser un represor de la producción de celulasas, con un comportamiento final de la mezcla inductora mejorado. La glucosa presenta un coste mucho más bajo que la lactosa, y una solubilidad en agua aproximadamente 3 veces más elevada. Por lo tanto, es posible disminuir los volúmenes implicados. Así, en este procedimiento, la glucosa se utiliza a la vez en la fase de crecimiento e igualmente en la fase de producción en una cantidad del 60 % de la mezcla que constituye el sustrato inductor.

La glucosa utilizada en la mezcla de azúcares puede ser igualmente reemplazada por la glucosa procedente de la etapa de hidrólisis enzimática de la celulosa, por lo tanto procedente directamente del procedimiento de transformación de biomasa lignocelulósica en etanol. Esto contribuye a disminuir el coste de la producción de enzimas mediante la utilización de los co-productos del procedimiento. Hablamos por lo tanto de hidrolizados celulósicos.

La xilosa utilizada en la mezcla que constituye el azúcar inductor puede ser reemplazada por una solución de hidrolizados hemicelulolíticos, procedente del procedimiento de transformación de biomasa lignocelulósica en etanol, y procedente particularmente del pretratamiento de la biomasa.

Por otro lado, la posibilidad de utilizar una mezcla muy concentrada de azúcares permite ventajosamente limitar los riesgos de contaminación.

El hecho de añadir xilosa a la mezcla que constituye el sustrato inductor permite aumentar de forma importante la actividad de xilanasa del cóctel enzimático final. La xilosa puede ser ventajosamente sustituida por una solución de hidrolizado hemicelulósico, procedente de la hidrólisis de las hemicelulosas durante el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica en los procedimientos de producción de biocarburantes de segunda generación, y que puede estar concentrada si fuera necesario.

De una forma preferida, la mezcla que constituye el sustrato inductor comprende entre 50 y 65 % en peso de glucosa, entre 22 y 24 % en peso de lactosa y entre 15 y 25 % en peso de xilosa, procedente eventualmente de un pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, siendo la suma de los constituyentes igual a 100 %.

Muy preferiblemente, el sustrato inductor es una mezcla constituida por 60 % en peso de glucosa, 23 % en peso de lactosa y 17 % en peso de xilosa.

El sustrato carbonado utilizado durante la fase de crecimiento se elige entre la glucosa, la xilosa, la lactosa, los residuos obtenidos después de la fermentación etanólica de los azúcares monómeros de los hidrolizados enzimáticos de biomasa celulósica y/o un extracto bruto de pentosas hidrosolubles procedente eventualmente del pretratamiento de una biomasa celulósica.

Muy preferiblemente, el sustrato de crecimiento es glucosa.

Las cepas industriales utilizadas pertenecen a la especie *Trichoderma reesei*, modificadas para mejorar las enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas mediante procesos de mutación-selección. Se mencionará, por ejemplo, la cepa IFP CL847. También pueden utilizarse cepas mejoradas mediante técnicas de recombinación genética. Deben estar delecionadas para la represión catabólica por la glucosa (Δ CRE1), como, por ejemplo, la CL847.

Estas cepas se cultivan en biorreactores agitados y aireados en unas condiciones compatibles con su crecimiento y la producción de las enzimas. Las condiciones son tales que el pH está ajustado a entre 3,5 y 6, y la temperatura a entre 20 y 35 ºC. Se elegirá preferiblemente un pH de 4,8 y una temperatura de 27 ºC durante la fase de crecimiento, y un pH de 4 y una temperatura de 25 ºC durante la fase de producción. El índice de aireación, expresado en volumen de aire por volumen de medio de reacción y por minuto o vvm aplicado durante el procedimiento, está comprendido entre 0.3 y 1.5 min-1, y la velocidad de rotación o rpm debe permitir regular la presión de O2 a entre el 20 % y 60 %. Se elegirá preferiblemente una aireación de 0.5 vvm y una agitación que permite regular la presión de O2 al 30 %.

Según su naturaleza, el sustrato carbonado elegido para la obtención de la biomasa es introducido en el biorreactor antes de la esterilización, o es esterilizado por separado y después introducido en el biorreactor después de la esterilización de este último, para obtener una concentración inicial de azúcares de entre 15 y 60 g/l.

Con respecto a la fase de producción, se prepara una solución acuosa que contiene el sustrato inductor constituido por la mezcla de glucosa/lactosa/xilosa o una solución de hidrolizado hemicelulósico elegida para la fase de producción de las enzimas a una concentración de entre 350 y 600 g/l en la solución de alimentación utilizada.

Preferentemente, la concentración está comprendida entre 450 y 550 g/l.

La solución acuosa es inyectada trás el agotamiento del sustrato inicial, de forma que se aporte una cantidad optimizada. El flujo de introducción de la solución de alimentación es de entre 30 y 45 mg por gramo de células y por hora.

La concentración residual de azúcar en el medio de cultivo es inferior a 1 g/l durante la fase de producción ("fed-batch"), de forma que se limite la producción de biomasa. De forma preferida, esta concentración es inferior a 0,5 g/l, y aún más preferiblemente a 0,1 g/l.

Ejemplos

Entre los siguientes ejemplos, el ejemplo 1 presenta un cultivo que utiliza la glucosa como sustrato carbonado durante la fase de crecimiento y la fase de producción. Este ejemplo muestra la baja producción de proteínas obtenida cuando se utiliza este azúcar como único sustrato carbonado, incluso si el flujo es limitante durante la fase de fed-batch (concentración residual de glucosa próxima a 0). El segundo ejemplo representa la fermentación de referencia mediante la utilización de lactosa como sustrato carbonado durante la fase de crecimiento y la fase de producción, lo que permite una importante producción de proteínas. El ejemplo 3 reproduce un experimento que utiliza en la fase de producción una mezcla tal como la descrita en la solicitud de patente WO 2009/026716 que contiene una elevada proporción de xilosa que permite, según los autores, aumentar en gran medida la producción de las celulasas con respecto a un experimento en el que la xilosa o los derivados hemicelulósicos son utilizados como únicos sustratos carbonados. Los ejemplos 4 a 6 son de patentes conformes con el procedimiento según la presente invención.

Ejemplo 1: producción de enzimas con glucosa (no conforme con la invención)

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

El biorreactor que contiene el medio mineral es esterilizado a 120 ºC durante 20 minutos, la fuente carbonada glucosa es esterilizada aparte a 120 ºC durante 20 minutos y después añadida de forma estéril al biorreactor, de forma que se obtenga una concentración final de 30 g/l. El biorreactor se cultiva al 10 % (v/v) con un precultivo líquido de la cepa de *Trichoderma reesei* CL847. El medio mineral del precultivo es idéntico al del biorreactor excepto por la adición de ftalato de potasio a 5 g·l-1 para tamponar el pH. El crecimiento del hongo del precultivo se realiza utilizando glucosa como sustrato carbonado, a una concentración de 30 g/l. El crecimiento del inóculo dura entre 2 y 3 días y se realiza a 28 ºC en una estufa de incubación agitada. La transferencia al biorreactor se lleva a cabo cuando la concentración residual de glucosa es inferior a 15 g/l.

El experimento realizado en el biorreactor comprende dos fases:

- una fase de crecimiento en el sustrato carbonado glucosa (concentración inicial = 30 g/l) a una temperatura de 27 ºC y a un pH de 4,8 (regulado por amoníaco 5.5 M). La aireación es de 0,5 vvm y la agitación se aumenta hasta entre 200 y 800 rpm en función de la pO2 (la presión del oxígeno disuelto), que se mantiene superior al 30 %.

- una fase de producción de enzimas. Cuando el sustrato inicial del fermentador se ha agotado y se ha inyectado la solución de glucosa a 250 g/l de forma continua con un caudal de entre 30 y 40 mg por g de células y por hora hasta 164 horas. La temperatura se reduce hasta 25 ºC y el pH a 4 hasta el final del cultivo. El pH es regulado mediante la adición de una solución de amoníaco 5.5 N que aporta el nitrógeno necesario para la síntesis de las proteínas excretadas. El contenido en oxígeno disuelto se mantiene por encima de entre el 15 y el 20 % mediante una aireación y una agitación.

La producción de enzimas esta seguida por la adición de las proteínas extracelulares mediante el método de Lowry y BSA estándar, después de la separación del micelio mediante una filtración o una centrifugación. Las actividades celulolíticas determinadas son:

- la actividad de papel de filtro (UPF: unidad de papel de filtro) que permite calcular la actividad global del conjunto enzimático de endoglucanasas y exoglucanasas

- las actividades de aril β-glucosidasa y xilanasas para las actividades específicas.

La actividad de UPF se mide con un papel de Whatman nº 1 (procedimiento recomendado por la comisión biotecnológica IUPAC) a una concentración inicial de 50 g/l; se determina la muestra de ensayo de la solución enzimática que se va a analizar, que libera el equivalente a 2 g/l de glucosa (análisis colorimétrico) en 60 minutos. El principio de la actividad de papel de filtro es determinar mediante el análisis del DNS (ácido dinitrosalicílico) la cantidad de azúcares reducidos procedentes de un papel de Whatman nº 1 (procedimiento recomendado por la comisión biotecnológica IUPAC).

El sustrato utilizado para la determinación de la actividad de aril β-glucosidasa es el p-nitrofenil-β-D-glucopiranósido (PNPG). Es escindido por la β-glucosidasa, lo que libera el p-nitrofenol.

Una unidad de actividad de aril β-glucosidasa se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 µmol de p-nitrofenol a partir de PNPG por minuto, y se expresa en IU/ml. El principio del análisis de la actividad de xilanasa se basa en la determinación mediante el análisis del DNS de la cantidad de azúcares reducidos procedentes de la solución de xilanasa hidrolizada. Este método de análisis utiliza las propiedades reductoras de los azúcares, y principalmente de la xilosa. La actividad de xilanasa se expresa en IU/ml, lo que se corresponde con la cantidad de enzima necesaria para producir 1 µmol de xilosa por minuto.
Las actividades específicas se obtienen dividiendo las actividades expresadas en IU/ml por la concentración de proteínas. Se expresan en IU/mg.

Las determinaciones analíticas sobre el mosto final del ejemplo 1 proporcionan los siguientes resultados:

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

Biomasa g/l 15.2
Proteínas g/l 2,9
UPF IU/ml 1,4
Xilanasa 29.1 IU/mg
β-Glucosidasa específica 0.35 IU/mg

La cepa CL847 se presenta desreprimida frente a la represión catabólica ejercida por la glucosa sobre la producción de celulasa (tiene delecionado el gen CRE1). Parece que incluso para un fed-batch llevado a cabo en unas condiciones de limitación de glucosa, la producción final de proteínas es muy baja.

Ejemplo 2: producción de enzimas con lactosa (no conforme con la invención)

La producción de enzimas es realizada en las mismas condiciones que en el Ejemplo 1. El sustrato carbonado durante las fases de crecimiento y de producción es la lactosa pura. La lactosa es un inductor importante de la producción de celulasas. Este es el sustrato más utilizado industrialmente para la producción de celulasas.

Después de 30 horas de crecimiento, tras el agotamiento del sustrato inicial, la solución de fed-batch a 250 g/l es inyectada de forma continua con un caudal de 35 mg por g de células y por hora hasta 164 horas.

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

Biomasa g/l 13.5
Proteínas g/l 37.8
UPF IU/ml 22.1
Xilanasa 408.5 IU/ml
β-Glucosidasa específica 0.96 IU/mg

Ejemplo 3: producción con la mezcla de 97 % de xilosa / 3 % de azúcares inductores de la producción de celulasas o de CIC (no conforme con la invención)

El experimento se ha llevado a cabo en las mismas condiciones que en el ejemplo 1 mediante la utilización de xilosa pura como único sustrato carbonado en el transcurso de la fase de crecimiento, y en la fase de producción, la mezcla de 97 % de xilosa / 3 % de CIC presentada en la solicitud de patente WO 2009/026716 A1. Los CIC (azúcares inductores de la producción de celulasas) son una mezcla de azúcares que permite la inducción de la producción de las celulasas. Su composición es la siguiente: 56 % de gentiobiosa, 14 % de soforosa, 10 % de trehalosa, 6 % de celobiosa, 6 % de maltotriosa, 8 % de glucosa.

Tras el agotamiento del sustrato inicial, se inyecta la mezcla de 97 % de xilosa / 3 % de CIC a 360 g/l según las recomendaciones descritas, con un caudal de 0.4 g de carbono·L-1·h-1

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

Biomasa 14.3 g/l
Proteínas 18.7 g/l
UPF 6.4 IU/ml
Xilanasa 6000.1 IU/ml
UPF específica 0.34 IU/mg
β-Glucosidasa específica 1,15 IU/mg

La producción final de proteínas está próxima a la presentada en la patente WO 2009/026716 A1, en la que los autores han obtenido una concentración final de proteínas de 25 g/l con la cepa P59G. La actividad específica de FPasa (0.34 IU/mg) es baja, mientras que la actividad de xilanasa es muy elevada.

Ejemplo 4: producción con la mezcla de lactosa (23 %) / glucosa (60 %) / xilosa (17 %) a 500 g/l (según la invención)

El experimento del ejemplo 4 se lleva a cabo en las mismas condiciones que en el ejemplo 1 con la glucosa como sustrato carbonado de crecimiento, a 60 g/l. A continuación hemos utilizado, en el transcurso de la fase de producción en modo "fed-batch", una solución en la que se mezclan tres sustratos carbonados según las siguientes proporciones: lactosa (23 %) / glucosa (60 %) / xilosa (17 %) a 500 g/l. Esta mezcla se ha inyectado a 45 $mg \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$. Las determinaciones analíticas sobre el mosto final proporcionan los siguientes resultados:

Biomasa 26.1 g/l
Proteínas 61.8 g/l
UPF 33.7 IU/ml
Xilanasa 4017 IU/ml
UPF específica 0.55 IU/mg
β-Glucosidasa específica 1,2 IU/mg

La producción final de proteínas es más de 3 veces superior a la del ejemplo 3. La actividad de papel de filtro, que es indicativa de la actividad de celulasa, es aproximadamente 5 veces superior.

La actividad de xilanasa es 10 veces superior a la del ejemplo 2 realizado con lactosa como único sustrato carbonado de crecimiento y de producción, pero aproximadamente un 50 % inferior a la del ejemplo 3.

Ejemplo 5: utilización de la mezcla de lactosa (23 %) / glucosa (60 %) / solución de azúcares C5 (17 %) a 500 g/l (según la invención)

El ejemplo 5 se lleva a cabo en las mismas condiciones que en el ejemplo 4. Se utiliza glucosa durante la fase de crecimiento a una concentración de 15 g/l. La xilosa de la solución de fed-batch es sustituida por una solución hemicelulósica soluble o una solución de azúcares C5 procedente de paja de trigo impregnada con ácido sulfúrico 0,08 N y pretratada con una explosión de vapor (19 bar, 5 minutos). La mezcla es inyectada a 30 $mg \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ durante 170 h.

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

Biomasa 19.1 g/l
Proteínas 57.3 g/l
UPF 25.1 IU/ml
Xilanasa 1151 IU/ml
UPF específica 0.44 IU/mg
β-Glucosidasa específica 1,4 IU/mg

Este experimento ha permitido aumentar las producciones de proteínas en más del 50 % con respecto al ejemplo 2, y la actividad de xilanasa es casi 3 veces superior. La mayor parte de la lactosa es sustituida durante la fase de crecimiento y de producción por glucosa y la solución de azúcares C5. La concentración de glucosa durante la fase de crecimiento se ha reducido con respecto a la del ejemplo 4, desde 60 hasta 15 g/l. La concentración de biomasa se ha disminuido desde 26 hasta 19 g/l, pero esto tiene poca incidencia sobre la concentración final de proteínas (reducción del 7 %). Así tenemos, por lo tanto, una utilización óptima de los azúcares y una disminución notable del coste de la fuente de carbono.

Ejemplo 6: utilización de la mezcla: lactosa (23 %) / hidrolizados C6 (56 %) / xilosa (21 %) a 500 g/l (según la invención)

El ejemplo 6 se lleva a cabo en las mismas condiciones que en el ejemplo 4. Se utiliza glucosa durante la fase de crecimiento a una concentración de 15 g/l. La glucosa de la solución de fed-batch es sustituida por una solución de hidrolizado procedente de la hidrólisis enzimática de paja de trigo impregnada con ácido sulfúrico 0,08 N y pretratada

con una explosión de vapor (19 bar, 5 minutos). La hidrólisis enzimática de la paja de trigo se ha llevado a cabo a 50 ºC y a un pH de 4.8. Ha dado lugar a una hidrólisis del 95 % de la celulosa en glucosa.

Se han disuelto lactosa y xilosa en esta solución de forma que se consiga en la mezcla:

lactosa (23 %) / hidrolizados C6 (56 %) / xilosa (21 %) a 500 g/l
La mezcla es inyectada a 30 $mg \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ durante 170 h durante la fase de fed-batch.

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

Biomasa 16.1 g/l
Proteínas 43.1 g/l
UPF 31.4 IU/ml
Xilanasa 6595.1 IU/ml
UPF específica 0.73 IU/mg
β-Glucosidasa específica 1,2 IU/mg

El cóctel enzimático obtenido es de muy buena calidad, ya que la actividad final de FPasa está próxima a la actividad obtenida en el ejemplo 4, incluso si la concentración de proteínas es más baja. La actividad final de FPasa es aproximadamente 5 veces superior a la obtenida con el ejemplo 3, y aproximadamente un 50 % superior a la obtenida para el ejemplo 2, en el que se utiliza lactosa como único sustrato carbonado durante la fase de fed-batch.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas por parte de un microorganismo celulolítico y/o hemicelulolítico que comprende al menos una fase de crecimiento en presencia de una fuente de carbono y al menos una fase de producción en presencia de un sustrato inductor, en el que dicho sustrato inductor es una mezcla de glucosa o de hidrolizados celulósicos, de lactosa y de xilosa, o una solución de hidrolizados hemicelulolíticos, estando el contenido de cada uno de los constituyentes de la mezcla definido por los siguientes límites:

- del 40 al 65 % en peso de glucosa,
- del 21 al 25 % en peso de lactosa y
- del 10 al 39 % en peso de xilosa,

siendo la suma de estos tres constituyentes igual a 100 %, y
el microorganismo pertenece a la especie *Trichoderma reesei*, y está delecionado para la represión catabólica por la glucosa.

2. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que el aporte del sustrato inductor se lleva a cabo en solución, siendo la concentración del sustrato inductor en la solución de alimentación utilizada durante la fase de producción de entre 350 y 600 g/l.

3. Procedimiento según la reivindicación 2 en el que la concentración está comprendida entre 450 y 550 g/l.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores en el que la mezcla que constituye el sustrato inductor comprende del 50 al 65 % en peso de glucosa, del 22 al 24 % en peso de lactosa y del 15 al 25 % en peso de xilosa, siendo la suma de los constituyentes de la mezcla igual a 100 %.

5. Procedimiento según la reivindicación 4 en el que el sustrato inductor es una mezcla constituida por 60 % en peso de glucosa, 23 % en peso de lactosa y 17 % en peso de xilosa.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores en el que el sustrato carbonado utilizado durante la fase de crecimiento se elige entre la glucosa, la xilosa, la lactosa, los residuos obtenidos después de la fermentación etanólica de los azúcares monómeros de los hidrolizados enzimáticos de biomasa celulósica y/o un extracto bruto de pentosas hidrosolubles procedente eventualmente del pretratamiento de una biomasa celulósica.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores en el que el pH está ajustado a entre 3,5 y 6 y la temperatura está comprendida entre 20 y 35 ºC.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores en el que el flujo de introducción de la solución de alimentación es de 30 a 45 mg por gramo de células y por hora.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores en el que la concentración residual de azúcar en el medio de cultivo durante la fase de producción es inferior a 1 g/l, preferiblemente a 0,5 g/l y muy preferiblemente a 0,1 g/l.