(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 637 241**

(51) Int. CI.:

C12N 9/42 (2006.01)
C12N 9/96 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2013 PCT/FR2013/051269**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO13190203**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2013 E 13731388 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2872626**

(54) Título: **Uso de CO_2 para la desactivación de un microorganismo celulolítico empleado en la conversión bioquímica de materiales lignocelulósicos**

(30) Prioridad:

18.06.2012 FR 1201732

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.10.2017

(73) Titular/es:

IFP ENERGIES NOUVELLES (100.0%)
1 & 4 avenue de Bois-Préau
92500 Rueil-Malmaison, FR

(72) Inventor/es:

BEN CHAABANE, FADHEL y
LOURET, SYLVAIN

(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

Uso de CO_2 para la desactivación de un microorganismo celulolítico empleado en la conversión bioquímica de materiales lignocelulósicos

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a la producción de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas, particularmente en el contexto de la producción de etanol a partir de materiales celulósicos o lignocelulósicos.

TÉCNICA ANTERIOR

Desde los años 70, la transformación de materiales lignocelulósicos en etanol, tras la hidrólisis de los polisacáridos constitutivos en azúcares fermentables, ha sido objeto de trabajos muy numerosos. Se pueden citar, por ejemplo, los trabajos de referencia del Laboratorio nacional de energías renovables ("Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol", Humbird et al., NREL/TP-5100-57764, mayo 2011).

Los materiales lignocelulósicos son materiales celulósicos, es decir, constituidos por más de un 90 % en peso de celulosa, y/o lignocelulósicos, es decir, constituidos por celulosa, hemicelulosas, que son polisacáridos constituidos esencialmente por pentosas y hexosas, así como por lignina, que es una macromolécula de estructura compleja y de alto peso molecular, compuesta por alcoholes aromáticos unidos mediante enlaces éter.

La madera, la paja, las mazorcas de maíz son los materiales lignocelulósicos más usados, aunque se pueden utilizar otros recursos, cultivos forestales especializados, residuos de plantas productoras de alcohol, azúcar y cereales, productos y residuos de la industria papelera y productos de transformación de materiales lignocelulósicos. Están constituidos la mayor parte por aproximadamente un 35 a un 50 % de celulosa, de un 20 a un 30 % de hemicelulosa y de un 15 a un 25 % de lignina.

El procedimiento de transformación bioquímica de los materiales lignocelulósicos en etanol comprende una etapa de pretratamiento físico-químico, seguida de una etapa de hidrólisis enzimática que usa un cóctel enzimático, una etapa de fermentación etanólica de los azúcares liberados, y una etapa de purificación del etanol.

La fermentación etanólica y la hidrólisis enzimática, denominada también sacarificación, se pueden llevar a cabo simultáneamente (sacarificación y fermentación simultáneas, o SSF según la terminología inglesa), por ejemplo, añadiendo organismos etanólicos durante la etapa de hidrólisis.

El cóctel enzimático es una mezcla de enzimas celulolíticas (denominadas también celulasas) y/o hemicelulolíticas. Las enzimas celulolíticas presentan tres tipos principales de actividades: endoglucanasas, exoglucanasas y celobiasas, siendo denominadas también éstas últimas β glucosidasas. Las enzimas hemicelulolíticas presentan particularmente actividades xilanasas.

La hidrólisis enzimática es eficaz y se lleva a cabo en condiciones suaves. Por el contrario, el coste de las enzimas sigue siendo muy elevado, representando de un 20 a un 50 % del coste de transformación del material lignocelulósico en etanol. Por esta razón, se han llevado a cabo muchos trabajos a fin de reducir este coste: la optimización de la producción de enzimas en primer lugar, seleccionando los microorganismos hiperproductores y mejorando los procedimientos de producción de dichas enzimas, la disminución de la cantidad de enzimas de hidrólisis después, optimizando la etapa de pretratamiento, mejorando la actividad específica de estas enzimas, y optimizando la implementación de la etapa de hidrólisis enzimática.

La etapa de producción del cóctel enzimático comprende tres grandes etapas: una etapa (a) de crecimiento de un microorganismo celulolítico; una etapa (b) de producción del cóctel enzimático; y una etapa (c) de separación y concentración, a lo largo de la cual el cóctel enzimático se separa del microorganismo celulolítico y se concentra. La separación entre el cóctel enzimático y el microorganismo celulolítico se lleva a cabo mediante separación líquido/sólido (centrifugación, por ejemplo). La concentración del cóctel enzimático se lleva a cabo mediante filtración (ultrafiltración, por ejemplo).

Estas etapas de separación son necesarias ya que existe el riesgo de que el microorganismo celulolítico, dejado en presencia del cóctel enzimático y en ausencia de sustrato carbonado, consuma las enzimas contenidas en dicho cóctel, a fin de asegurar su supervivencia, dando como resultado, por tanto, una pérdida de producción.

Asimismo, independientemente del cuidado que se haya tenido durante la separación, siempre hay una parte del cóctel enzimático que se pierde con la fracción que contiene el microorganismo. Dependiendo de las tecnologías de separación seleccionadas, estas pérdidas pueden corresponder a de un 3 a un 50 % en peso del cóctel enzimático presente antes de la separación. Por tanto, parece interesante utilizar el mosto sin separación a fin de evitar estas pérdidas.

Las temperaturas de funcionamiento de una etapa de SSF son del orden de 30 a 35 °C. Sin embargo, estas temperaturas, son compatibles con el crecimiento de los microorganismos celulolíticos. Por tanto, si se prevé el uso del cóctel enzimático en una etapa de SSF sin separación del microorganismo celulolítico, existe el riesgo de competición entre el microorganismo celulolítico y la levadura usada para la fermentación, lo que da como resultado una disminución del rendimiento de dicha etapa de SSF. De hecho, una parte de la glucosa liberada por la hidrólisis será consumida por el microorganismo celulolítico.

Por tanto, es interesante llegar a desactivar el microorganismo celulolítico de modo que no haya que proceder a la etapa de separación del cóctel enzimático y de dicho microorganismo celulolítico con vistas a su almacenamiento y/o a su uso en una etapa de SSF. También es interesante conseguir desactivar este microorganismo usando un medio interno al procedimiento, por ejemplo, un producto de una de las etapas del procedimiento.

El documento GB1489145 enseña el cultivo del microorganismo celulolítico y de enzimas a partir de residuos de celulosa, así como la utilización del conjunto del medio de cultivo/producción de enzimas sin separación de ningún constituyente para la hidrólisis enzimática. Los autores afirman que la utilización del conjunto del medio "de acuerdo con la invención", sin tratamiento (filtración, concentración u otro) aparte de un posible ajuste del pH, permite mejorar la hidrólisis de la celulosa en términos de velocidad y de rendimiento.

Esta patente no dice nada del problema del crecimiento potencial del microorganismo celulolítico *T.reesei* en las condiciones de la hidrólisis enzimática, ni del reconsumo de las proteínas por el organismo celulolítico. De hecho, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo en general a temperaturas que impiden el crecimiento del microorganismo celulolítico (entre 45 °C y 55 °C) contrariamente a las SSF que se llevan a cabo a temperaturas comprendidas entre 30 y 35 °C.

Barta et al. ("Process Design and Economics of On-Site Cellulase Production on Various Carbon Sources in a Softwood-Based Ethanol Plant", *Enzyme Research*, Vol. 2010, doi :10.4061/2010/734182) divulgan la adición de la totalidad del medio que contiene el microorganismo celulolítico a la etapa de SSF. De acuerdo con los autores, esto no supone un problema ya que la SSF se lleva a cabo a 37 °C, mientras que el crecimiento del microorganismo celulolítico está totalmente inhibido cuando la temperatura supera los 35 °C. Este postulado se ha puesto ampliamente en cuestión, ya que son conocidas determinadas especies de *Trichoderma* (*T. pseudokoningii*, *T. saturnisporum*, por ejemplo) por ser capaces de desarrollarse a una temperatura de hasta 40-41 °C.

Sin embargo, los estudios del solicitante le han llevado a descubrir que determinados flujos internos al procedimiento de conversión bioquímica de la biomasa en etanol permitían la desactivación del microorganismo celulolítico.

La presente invención propone un procedimiento que permite la desactivación del microorganismo celulolítico superando los inconvenientes que existían hasta el momento.

SUMARIO E INTERÉS DE LA INVENCIÓN

Con la desactivación del microorganismo celulolítico al ponerlo en contacto con un flujo gaseoso interno al procedimiento de conversión bioquímica de la biomasa en etanol que contiene menos de un 0,5 % molar de oxígeno, se suprime la necesidad de separar dicho microorganismo del cóctel enzimático producido.

La selección juiciosa del flujo gaseoso interno utilizado permite evitar cualquier impacto negativo sobre los rendimientos del procedimiento que puede ser provocado por la acumulación de especies indeseables por efecto del reciclado.

Una ventaja del procedimiento de acuerdo con la invención, por tanto, es la limitación de las pérdidas del cóctel enzimático producido. Otra ventaja es la limitación del tamaño de las instalaciones: limitando las pérdidas se limita la sobreproducción necesaria para la compensación de dichas pérdidas. Otra ventaja es la limitación de los residuos, minimizando, incluso suprimiendo, las etapas de limpieza durante las separaciones cóctel enzimático/ microorganismo celulolítico. Otra ventaja es minimizar los riesgos de contaminación limitando, incluso suprimiendo, las etapas de separación cóctel enzimático/microorganismo celulolítico.

Las ventajas de la presente invención, enumeradas en el presente documento de forma no exhaustiva, permiten reducir el coste de producción del etanol a partir de materiales lignocelulósicos y contribuyen a la competitividad de este sector.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a un procedimiento de desactivación de un microorganismo celulolítico que permite la producción de un cóctel enzimático, siendo utilizado dicho cóctel enzimático sin separación del microorganismo celulolítico durante la conversión bioquímica de los materiales lignocelulósicos, que comprende al menos una etapa de puesta en contacto de un flujo gaseoso y del medio que contiene dicho microorganismo, comprendiendo dicho flujo gaseoso más de un 25 % en masa de CO_2 y comprendiendo menos de un 0,5 % molar de O_2.

Preferentemente, dicho flujo gaseoso tiene como origen una etapa de SSF.

Preferentemente, dicho flujo gaseoso ha sido sometido a un tratamiento para reducir al menos un 25 % de su contenido de etanol y de compuestos orgánicos volátiles antes de la etapa de puesta en contacto.

Preferentemente, dicho tratamiento es un lavado con agua de dicho flujo gaseoso.

Preferentemente, dicha etapa de puesta en contacto se lleva a cabo en una etapa de SSF.

Preferentemente, dicha etapa de puesta en contacto se lleva a cabo en la etapa de producción del cóctel enzimático, a la salida de la etapa de producción de dicho cóctel.

Preferentemente, dicha etapa de puesta en contacto se lleva a cabo entre la etapa de producción del cóctel enzimático y una etapa de SSF. El microorganismo celulolítico se selecciona entre las cepas de hongos que pertenecen a los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* o *Schizophyllum*.

Preferentemente, el microorganismo celulolítico pertenece a la especie *Trichoderma reesei*.

La etapa de producción del cóctel enzimático emplea un microorganismo celulolítico. Dicho procedimiento de producción se lleva a cabo en un cultivo sumergido. Por "cultivo sumergido" se entiende un cultivo en un medio líquido.

Los microorganismos celulolíticos empleados en el procedimiento de producción de un cóctel enzimático son cepas de hongos que pertenecen a los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* o *Schizophyllum*, preferentemente que pertenecen a la especie *Trichoderma reesei*. Las cepas industriales más eficaces son las cepas que pertenecen a la especie *Trichoderma reesei*, modificadas para mejorar el cóctel enzimático mediante procedimientos de mutación-selección, como, por ejemplo, la cepa IFP CL847 (patente francesa FR-B-2 555 803). Las cepas mejoradas mediante técnicas de recombinación genética se pueden emplear también. Estas cepas se cultivan en reactores agitados y aireados en condiciones compatibles con su crecimiento y la producción de las enzimas.

De acuerdo con la invención, se procede, por tanto, a poner en contacto un flujo gaseoso que comprende menos de un 0,5 % molar de oxígeno (O_2), preferentemente menos de un 0,25 % molar y, más preferentemente, exento de oxígeno, con el medio que contiene dicho microorganismo celulolítico.

La fermentación alcohólica es una reacción bioquímica a lo largo de la cual organismos como, por ejemplo, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, transforman azúcares en etanol y en dióxido de carbono (CO_2).

Un flujo gaseoso que comprende el CO_2 producido durante la etapa de fermentación alcohólica y/o durante la etapa de SSF, se separa en el transcurso de la fermentación, mediante desgasificación continua del fermentador. Un flujo gaseoso que comprende la fracción de CO_2 disuelta en el medio de fermentación se produce durante la etapa de purificación del etanol.

El flujo gaseoso utilizado en la presente invención está constituido ventajosamente por una mezcla del flujo gaseoso separado mediante desgasificación continua del fermentador y del flujo producido durante la etapa de purificación del etanol.

El flujo gaseoso producido durante la etapa de fermentación alcohólica comprende al menos un 25 % en masa de CO_2, preferentemente al menos un 50 % en masa y, más preferentemente, al menos un 75 % en masa. Dicho flujo gaseoso comprende también entre un 0 y un 10 % en peso de etanol, preferentemente entre un 0 y un 5 % en peso. Dicho flujo gaseoso comprende igualmente agua y compuestos orgánicos volátiles (COV), estando definidos estos últimos de acuerdo con el artículo 2 de la directiva 1999/13/CE del Consejo del 11 de marzo de 1999.

Durante dicha etapa de purificación del etanol, dicha fracción de CO_2 disuelta se separa del medio que contiene el etanol por cualquier medio conocido por el experto en la materia, por ejemplo, mediante expansión ultrarrápida, que consiste en reducir la presión del medio para vaporizar el CO_2 disuelto, mediante destilación, mediante separación con membrana, o mediante una combinación de estos medios u otros medios conocidos por el experto en la materia.

Preferentemente, el flujo gaseoso que contiene el CO_2 separado mediante desgasificación continua y/o el flujo gaseoso que contiene el CO_2 separado en la etapa de purificación del etanol se trata en una etapa de lavado a fin de reducir su contenido de etanol y de COV así como, si fuera necesario, su contenido de oxígeno. Dicha etapa de lavado se puede efectuar mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Preferentemente, dicha etapa de lavado es un lavado con agua o una separación con membrana.

Dicha etapa de lavado tiene como objeto reducir de un 25 a un 100 % el contenido de etanol y de COV en el flujo gaseoso, preferentemente de un 50 a un 100 % y, más preferentemente, de un 75 a un 100 %.

En una configuración preferente, el flujo gaseoso se pone en contacto con el medio que contiene el microorganismo celulolítico sin tratamiento previo en dicha etapa de lavado.

Durante dicha puesta en contacto, el etanol contenido eventualmente en dicho flujo gaseoso es absorbido en el medio que contiene el microorganismo celulolítico. Por efecto del reciclado, se consigue de este modo un aumento de la concentración de etanol a la salida de la etapa de fermentación alcohólica. Este incremento de la concentración de etanol tiene como efecto la disminución del consumo energético de la etapa de purificación del etanol.

Durante dicha puesta en contacto, el CO_2 acidificará el medio. La puesta en contacto del flujo gaseoso y del medio que contiene el microorganismo celulolítico se llevará a cabo siempre con control y, eventualmente, con ajuste del pH.

La puesta en contacto del flujo gaseoso y del medio que contiene el microorganismo celulolítico, teniendo dicho medio un comportamiento similar al de un líquido, se puede llevar a cabo mediante cualquier medio que ponga en contacto íntimo un gas y un líquido conocido por el experto en la materia. Tales medios son descritos, por ejemplo, de manera no exhaustiva en "Adsorption en traitement d'air", Michel Roustan, *Techniques de l'ingénieur*, G1750.

Preferentemente, la etapa de puesta en contacto del flujo gaseoso con el medio que contiene el microorganismo celulolítico se lleva a cabo en una etapa de SSF. Para efectuar esta puesta en contacto, el equipo en el que implementa una etapa de SSF está provisto de un sistema de dispersión de gas en el medio líquido. Otro método consiste en extraer una fracción del medio de reacción contenido en dicho equipo, mezclar íntimamente dicha fracción con dicho flujo gaseoso y reintroducir dicha fracción, liberada o no de la porción gaseosa, en dicho equipo. Otro método consiste en inyectar dicho flujo gaseoso en el espacio de cabeza gaseoso de dicho equipo.

Preferentemente, la etapa de puesta en contacto del flujo gaseoso con el medio que contiene el microorganismo celulolítico se lleva a cabo durante la etapa de producción del cóctel enzimático, a la salida de la etapa (b) de producción de dicho cóctel enzimático. Puesto que el equipo que permite la producción del cóctel enzimático se airea y se agita tal como es conocido por el experto en la materia y tal como se describe, por ejemplo, en la patente EP 1 690 944, se corta la inyección de aire a la salida de dicha etapa (b) de producción y en su lugar se inyecta dicho flujo gaseoso hasta que se alcanza una presión parcial de oxígeno inferior a un 0,5 % molar, preferentemente inferior a un 0,25 % molar y, más preferentemente, de un 0 %. Otra ventaja de la adición de CO_2 es que permite disminuir el pH preferentemente a un valor entre 3,5 y 3,7. Estos valores de pH reducidos permiten limitar los riesgos de contaminaciones con respecto al pH del cultivo que está comprendido entre 4,8 y 4. En esta etapa se ha de tener cuidado de que el pH no disminuya a un valor inferior a 3,3, lo que podría tener un efecto negativo sobre la actividad de determinadas enzimas del cóctel.

Preferentemente, la etapa de puesta en contacto del flujo gaseoso con el medio que contiene el microorganismo celulolítico se lleva a cabo entre la etapa de producción del cóctel enzimático y la etapa de SSF. Esta puesta en contacto se puede llevar a cabo en un equipo especializado que usa las tecnologías convencionales de puesta en contacto gas/líquido conocidas por el experto en la materia.

Los flujos gaseosos que contienen el CO_2 se pueden usar igualmente para la producción de microalgas destinadas a la producción de biocombustible denominado "de tercera generación" tras la extracción de los lípidos de dichas microalgas, permitiendo de este modo la producción de un coproducto de gran valor añadido, es decir, directamente para su aplicación en acuicultura.

Otros flujos gaseosos que comprenden menos de un 0,5 % molar de oxígeno se pueden emplear también, por ejemplo, los efluentes procedentes de las unidades de tratamiento anaerobio del agua, los humos de combustión de residuos, los efluentes de unidades de metanación de residuos orgánicos.

Los ejemplos que siguen ilustran la invención sin limitar el alcance de la misma. En lo que sigue a continuación, la actividad del cóctel enzimático se mide en Unidades de papel de filtro FPU (*Filter Paper Unit* según la terminología inglesa). Esta actividad se mide sobre papel Whatman n.º 1 (Procedimiento recomendado por la comisión biotecnológica IUPAC) a la concentración inicial de 50 g/l; se determina la porción analítica de la solución enzimática que se va a analizar, la cual libera el equivalente de 2 g/l de glucosa (dosificación colorimétrica) en 60 minutos.

Ejemplo 1: Comparación de conservaciones de mosto de *Trichoderma reesei*

El ejemplo 1 muestra la evolución de la actividad del cóctel enzimático de un medio que contiene a la vez dicho cóctel enzimático y el microorganismo celulolítico *T.reesei*, denominado mosto, conservado durante 3 semanas y que ha sido sometido a tres tratamientos diferentes. Este ejemplo muestra que, en el mosto que se ha colocado en una atmósfera con CO_2 o N_2, la actividad FPU se conserva, mientras que se reduce notablemente en el conservado al aire.

En un fermentador de acuerdo con un protocolo convencional tal como el descrito, por ejemplo, en la solicitud de patente EP 1690944, se lleva a cabo una producción de un cóctel enzimático por *Trichoderma reesei* CL847. La concentración del cóctel enzimático obtenida es de 39,9 g/l y la actividad es de 32 FPU/ml.

El mosto se divide, sin separación entre el microorganismo celulolítico y el sobrenadante que contiene el cóctel enzimático, en diferentes matraces previamente esterilizados.

En el matraz A, se burbujea un flujo gaseoso que comprende más del 99 % molar de CO_2 y que contiene menos de un 0,5 % molar de O_2 hasta que el espacio de cabeza gaseoso contiene menos de un 0,5 % molar de O_2. Dicho flujo gaseoso se ha obtenido recogiendo el producto de desgasificación de una fermentación alcohólica efectuada en otra parte.

En el matraz B, se burbujea un flujo gaseoso que comprende más del 99 % molar de N_2 y que contiene menos de un 0,5 % molar de O_2 hasta que el espacio de cabeza gaseoso contiene menos de un 0,5 % molar de O_2.

En el matraz C, se conserva el mosto al aire, en un matraz estéril con filtro de 0,2 µm.

El % de O_2 se mide mediante cromatografía en fase gaseosa (CG) en una muestra extraída del espacio de cabeza gaseoso.

A continuación los matraces se conservan a 33 °C durante 3 semanas.

Las actividades obtenidas al cabo de tres semanas se dan en la tabla 1. Más del 90 % de la actividad se mantiene en una atmósfera de CO_2 o de nitrógeno mientras que se pierde un 50 % de la actividad cuando el hongo está en presencia de aire. El microorganismo celulolítico, por tanto, está bien desactivado en ausencia de aire.

Tabla 1 Evolución de las actividades enzimáticas

	Actividad inicial FPU/ml	Actividad después de tres semanas FPU/ml
Matraz A	32,00	29,08
Matraz B		30,44
Matraz C		15,15

Ejemplo 2: Comparación de dos SSF

El ejemplo 2 compara dos SSF efectuadas a 33 °C usando un mosto que contiene a la vez el microorganismo celulolítico y el cóctel enzimático con o sin adición de CO_2 en el espacio de cabeza gaseoso.

Las dos SSF se llevan a cabo usando directamente el mosto de producción de enzimas (cóctel enzimático + microorganismo celulolítico) en el reactor de hidrólisis y de fermentación con una dosis de enzima de 30 mg de enzimas por gramo de materia seca (MS). El porcentaje en peso de materia seca es la proporción en masa de la muestra obtenida tras el secado a 105 °C durante 24 horas con respecto a la masa inicial de la muestra. La masa de materia seca es el producto del porcentaje en peso de materia seca y el peso de la muestra.

El experimento se lleva a cabo a un 18 % de MS (paja de trigo sometida a explosión con vapor en condiciones ácidas, lavada y secada) en un reactor de 2 l. La temperatura se ajusta a 33 °C y el pH se ajusta a 5 con hidróxido sódico (NaOH) 5 N. La levadura se añade 1 hora después del inicio de la hidrólisis a una concentración de 0,5 g de levadura por kg de medio de fermentación. La primera SSF (SSF1) se lleva a cabo con un ligero burbujeo de un flujo de gas que comprende un 99,8 % molar de CO_2 y un 0,2 % molar de O_2. La segunda SSF (SSF2) se lleva a cabo sin burbujeo de CO_2.

La SSF1 ha llevado a una concentración final de etanol de 40,2 g/l mientras que la SSF2 ha llevado a una concentración final de solamente 34,1 g/l. El rendimiento de SSF1 es superior al de la SSF2 en un 17,9 %. En el caso de la SSF2, el microorganismo celulolítico ha consumido una parte del azúcar liberado por la hidrólisis de la celulosa, causando una disminución del rendimiento final de la producción de etanol.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de desactivación de un microorganismo celulolítico seleccionado entre las cepas de hongos que pertenecen a los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* o *Schizophyllum*, que permite la producción de un cóctel enzimático, siendo utilizado dicho cóctel enzimático sin separación del microorganismo celulolítico durante la conversión bioquímica de los materiales lignocelulósicos, que comprende al menos una etapa de puesta en contacto de un flujo gaseoso y del medio que contiene dicho microorganismo, comprendiendo dicho flujo gaseoso más de un 25 % en masa de CO_2 y comprendiendo menos de un 0,5 % molar de O_2.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el flujo gaseoso tiene como origen una etapa de SSF.

3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho flujo gaseoso ha sido sometido a un tratamiento para reducir al menos un 25 % de su contenido de etanol y de compuestos orgánicos volátiles antes de la etapa de puesta en contacto.

4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho tratamiento es un lavado con agua de dicho flujo gaseoso.

5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha etapa de puesta en contacto se lleva a cabo en una etapa de SSF.

6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha etapa de puesta en contacto se lleva a cabo en la etapa de producción del cóctel enzimático, a la salida de la etapa de producción de dicho cóctel.

7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha etapa de puesta en contacto se lleva a cabo entre la etapa de producción del cóctel enzimático y una etapa de SSF.

8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el microorganismo celulolítico pertenece a la especie *Trichoderma reesei*.