

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 254**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/14** (2006.01)

**C12N 9/42** (2006.01)

**C12N 1/38** (2006.01)

**C12N 9/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2012 PCT/FR2012/000381**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13054005**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2012 E 12775738 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2766471**

54 Título: **Procedimiento de producción continua de celulasas por un hongo filamentoso utilizando un sustrato carbonado obtenido de un pretratamiento ácido**

30 Prioridad:

**14.10.2011 FR 1103149**

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

**08.11.2017**

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  
CHAUSSEPIED, BERNARD**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 641 254 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 continua de celulasas por un hongo filamentoso utilizando un sustrato carbonado obtenido de un pretratamiento ácido

5      Ámbito de la invención

10     La presente invención concierne a la producción de celulasas y de hemicelulasas, particularmente en el marco de la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos. En particular, la presente invención concierne a un procedimiento de producción continua de celulasas a partir de un hongo filamentoso.

Técnica anterior

15     La puesta a punto de procedimientos económicamente viables de producción de biocarburantes de 2ª generación es hoy en día un asunto de gran actualidad. Estos últimos son producidos a partir de biomasa lignocelulósica y presentan menos problemas de competencia de uso de las tierras agrícolas con las alimentarias, con respecto a los biocarburantes denominados de primera generación, que son producidos a partir de la caña de azúcar, el maíz, el trigo o la remolacha.

20     La biomasa lignocelulósica se caracteriza por una estructura compleja constituida por tres fracciones principales: la celulosa, las hemicelulosas y las ligninas. De forma clásica, el procedimiento de transformación en etanol comprende varias etapas. El pretratamiento permitía hacer que la celulosa fuera accesible a las enzimas, que son las celulasas. La etapa de hidrólisis enzimática permite la transformación de la celulosa en glucosa, que a continuación es transformada en etanol durante la etapa de fermentación, en general, por parte de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Finalmente, la etapa de destilación permitirá separar y recuperar el etanol del mosto de fermentación.

30     Los diferentes estudios técnico-económicos demuestran que la reducción del coste de las celulasas es uno de los puntos clave de los procedimientos de producción biológica de etanol a partir de materias primas lignocelulósicas.

35     En el momento actual, las celulasas industriales son producidas principalmente por un hongo filamentoso, *Trichoderma reesei*, debido a su elevado poder de secreción. *Trichoderma reesei* es el microorganismo más utilizado para la producción de celulasas. Las cepas salvajes tienen la facultad de excretar, en presencia de un sustrato inductor, celulosa, por ejemplo, considerado el cóctel enzimático como el mejor adaptado a la hidrólisis de la celulosa. Las enzimas del cóctel enzimático contienen tres principales tipos de actividades: las endoglucanasas, las exoglucanasas y las celobiasas. Otras proteínas que poseen unas propiedades indispensables para la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos son igualmente producidas por *Trichoderma reesei*, las xilanasas, por ejemplo. La presencia de un sustrato inductor es indispensable para la expresión de las enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas.

40     La regulación de los genes de las celulasas sobre diferentes fuentes de carbono se ha estudiado con detalle. Son inducidas en presencia de celulosa, de sus productos de hidrólisis (ejemplo: celobiosa) o de algunos oligosacáridos, como la lactosa o la soforosa (limén et al., 1997; Appl. Environ. Microbiol. 63: 1298-1306). Las técnicas de genética clásicas de mutación han permitido la selección de cepas de *Trichoderma reesei* hiperproductoras de celulasas, tales como las cepas MCG77 (Gallo - patente US 4275 167), MCG 80 (Allen, A. L. y Andreotti, R. E., Biotechnol-Bioengi 1982, 12, 451-459 1982), RUT C30 (Montenecourt, B. S. y Eveleigh, D. E., Appl. Environ. Microbiol. 1977, 34, 777-782) y CL847 (Durand et al, 1984, Proc. Colloque SFM "Génétique des microorganismes industriels". París. H. HESLOT Ed, págs. 39-50).

50     El procedimiento de producción de celulasas por parte de *Trichoderma reesei* ha sido objeto de importantes mejoras en vista de la extrapolación a escala industrial. La estrategia que se aplica industrialmente es realizar un rápido crecimiento del hongo hasta una concentración dada en una etapa denominada fase de crecimiento de dicho hongo, después inducir la producción de celulasas a partir de dicho hongo con el fin de maximizar la productividad y el rendimiento en una etapa denominada fase de producción. Dicha fase de crecimiento se lleva a cabo el general en un reactor cerrado, es decir, en modo "batch" según la terminología anglosajona. Dicha fase de producción se lleva a cabo en general en un reactor con un suministro continuo, durante la cual no se realiza ninguna extracción del contenido del reactor, es decir, en modo "fed batch" según la terminología anglosajona. Para obtener unas buenas productividades de enzimas, es necesario aportar una fuente de carbono rápidamente asimilable para el crecimiento de *Trichoderma reesei* en la fase de crecimiento, y un sustrato inductor que permita la expresión de las celulasas y la secreción en el medio de cultivo en la fase de producción. La celulosa puede jugar dos papeles; no obstante, es difícil de utilizar en el estadio industrial y ha sido sustituida por otras fuentes de carbono solubles, tales como la lactosa, que permite la expresión de las celulasas. Otros azúcares solubles como la celobiosa y la soforosa se han descrito como sustratos inductores, pero son demasiado caros para ser utilizados en el estadio industrial. No obstante, las producciones de celulasas por parte de *Trichoderma reesei*, con los sustratos solubles, son muy inferiores a las obtenidas con la celulosa en modo "batch". Esto es debido al efecto represor de los azúcares fácilmente asimilables, a elevada concentración. El suministro continuo en el modo "fed-batch" de los sustratos

carbonados inductores solubles ha permitido elevar la represión catabólica limitando la concentración residual de sustrato carbonado en los cultivos y optimizando la cantidad de azúcar, permitiendo la obtención de un mejor rendimiento y una mejor productividad enzimática. Por ejemplo, la patente FR-B-2 881 753 describe un procedimiento de producción de celulasas que comprende dos etapas:

- una fase de crecimiento en modo "batch" en la que es necesario aportar una fuente de carbono rápidamente asimilable para el crecimiento de *Trichoderma reesei*, después
- una fase de producción en modo "fed-batch" utilizando un sustrato inductor tal como, por ejemplo, la lactosa, que permite la expresión de las celulasas y su secreción en el medio de cultivo. El suministro del sustrato carbonado soluble se realiza de forma continua, con un caudal específico óptimo aplicado, expresado en mg de sustrato por gramo de peso seco del hongo filamentoso y por hora, comprendido entre 35 y 45 mg.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

En esta patente, la etapa de producción de las proteínas no se lleva a cabo más allá de aproximadamente 170 h. Este protocolo permite alcanzar una concentración de proteínas del orden de entre 35 y 40 g/l, con una productividad del orden de 0,2 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

No obstante, el reactor debe ser limpiado y debe realizarse una nueva cadena de siembra. El inconveniente de este modo operativo es una productividad demasiado baja, que hace aumentar la inversión inicial en número de fermentadores de producción de enzimas. La concentración de proteínas obtenida es igualmente poco elevada y a menudo necesita una etapa de concentración después de la filtración del micelio. Todo esto contribuye a hacer que el procedimiento de producción de etanol de segunda generación sea poco competitivo. El documento WO2009/026716 describe un cultivo continuo de *Trichoderma* para la producción de celulasas y de hemicelulasas. La fuente de carbono es una mezcla de azúcares derivados de la hemicelulosa y azúcares inductores de la celulasas. El índice de dilución del cultivo continuo es de 0.025 h<sup>-1</sup>.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de producción de celulasas y de hemicelulasas utilizando al menos un sustrato carbonado inductor específico procedente de un pretratamiento ácido de un sustrato lignocelulósico que permite aumentar, incluso duplicar, la productividad y la concentración de las celulasas y de las hemicelulasas producidas con respecto a los procedimientos de la técnica anterior, y producir estas celulasas de forma continua durante un periodo más largo. El procedimiento según la presente invención permite aumentar, incluso duplicar, la productividad y la concentración de las celulasas y de las hemicelulasas producidas, manteniendo constante el rendimiento de la producción de celulasas con respecto al sustrato carbonado utilizado con respecto a los procedimientos de la técnica anterior.

#### Resumen e interés de la invención

La presente invención concierne a un procedimiento de producción de celulasas y de hemicelulasas por parte de una cepa perteneciente a un hongo filamentoso, en un biorreactor agitado y aireado, que comprende al menos dos fases:

- una fase a) de crecimiento de dicha cepa en presencia de al menos un sustrato carbonado de crecimiento en un reactor cerrado, llevándose a cabo dicha fase de crecimiento con una concentración de sustrato carbonado de crecimiento comprendida entre 10 y 90 g/l
- una fase b) de producción continua de celulasas en la que al menos un sustrato carbonado inductor es suministrado con un caudal de suministro al menos constante durante un periodo al menos superior a 200 h, siendo dicho sustrato carbonado inductor al menos una solución acuosa de un hidrolizado hemicelulósico procedente de un pretratamiento ácido de un sustrato lignocelulósico, no experimentando dicha solución acuosa de hidrolizado hemicelulósico ninguna estabilización previa ni ninguna rectificación del pH, estando dicho pH de la solución acuosa comprendido entre 0,5 y 3, siendo mantenida la masa del volumen de reacción constante mediante la extracción de una fracción de dicho volumen de reacción, operando dicha fase b) a un índice de dilución comprendido entre 0,001 y 0,008 h<sup>-1</sup>,

en el que el sustrato carbonado inductor utilizado en la fase b) es una solución acuosa de un hidrolizado hemicelulósico procedente de un pretratamiento ácido de un sustrato lignocelulósico en una mezcla con al menos otro sustrato carbonado elegido entre azúcares inductores o no inductores, en el que el caudal de suministro de dicho sustrato carbonado inductor está comprendido entre 35 y 140 mg de sustrato carbonado inductor por gramo de peso seco de cepa y por hora.

#### Ventaja de la invención

Una ventaja de la presente invención es que permite mejorar la productividad y la concentración de las proteínas producidas en un periodo de funcionamiento más largo. En particular, el procedimiento según la invención permite la obtención de una concentración de proteínas superior a 100 g.l<sup>-1</sup>. Estos rendimientos se han mantenido experimentalmente en modo continuo durante más de 400 h.

La gran productividad obtenida permite reducir los costes de inversión en el biorreactor. El periodo prolongado permite reducir el tiempo consagrado a la limpieza de los biorreactores y a las cadenas de siembra. La gran concentración de celulasas permite reducir los costes del post-tratamiento.

5 Otra ventaja del procedimiento continuo según la invención es que necesita una baja  $k_{La}$ , de hecho, a la vez la aplicación de un bajo índice de dilución en la fase b) de producción continua y la utilización de una solución de sustrato carbonado inductor específico en dicha fase b), lo que permite mantener una baja viscosidad en el medio de reacción.

10 Descripción detallada de la invención

El procedimiento según la invención opera preferiblemente a un pH comprendido entre 3 y 6, a una temperatura comprendida entre 20 y 35 °C, a un vvm, es decir, a un índice de aireación expresado en volumen de aire, en las condiciones normales de temperatura y de presión, por volumen de medio de reacción y por minuto, comprendido 15 entre 0,3 y 1,5 min<sup>-1</sup>, preferiblemente entre 0,3 y 1 min<sup>-1</sup> y con una agitación que permite la obtención de una presión parcial de oxígeno en el medio de reacción comprendida entre el 20 % y el 60 %, y preferiblemente comprendida entre el 20 y el 40 %.

Preferentemente, el procedimiento según la invención opera a un vvm de 0.5 min<sup>-1</sup> y con una agitación que permite regular la presión parcial de oxígeno al 30 %.

Según la invención, dicho procedimiento comprende una fase a) de crecimiento de la cepa perteneciente a un hongo filamentoso, preferiblemente el hongo *Trichoderma reesei*, en presencia de al menos un sustrato carbonado de crecimiento en un reactor cerrado, llevándose a cabo dicha fase de crecimiento con una concentración de sustrato 25 carbonado de crecimiento comprendida entre 10 y 90 g/l.

Dicha cepa implementada en el procedimiento según la invención es una cepa de un hongo filamentoso perteneciente preferiblemente a los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* o *Schizophillum*, y de forma preferida, dicha cepa pertenece a la especie *Trichoderma reesei*.

La cepa utilizada perteneciente preferiblemente a la especie *Trichoderma reesei*, puede ser ventajosamente modificada para mejorar las enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas mediante procedimientos de mutación-selección, como por ejemplo, la cepa IFP CL847. Igualmente puede utilizarse una cepa mejorada mediante las técnicas de recombinación genética. Dicha cepa se cultiva en reactores agitados y aireados en unas condiciones 35 compatibles con su crecimiento y la producción de celulasas. Pueden utilizarse otras cepas de microorganismos productores de celulasas según unos procesos similares a los utilizados para *Trichoderma*.

De una forma muy preferida, la cepa utilizada es una cepa de *Trichoderma reesei* modificada mediante una mutación, una selección o una recombinación genética.

La cepa puede elegirse ventajosamente entre las cepas CL847, RutC30, MCG77 o MCG80.

El sustrato carbonado de crecimiento utilizado en dicha fase de crecimiento se elige ventajosamente entre azúcares solubles industriales, y preferiblemente entre la glucosa, la lactosa, la xilosa, los residuos obtenidos después de una fermentación etanólica de los azúcares monómeros de los hidrolizados enzimáticos del sustrato lignocelulósico y los extractos de la fracción hemicelulósica en forma de monómeros procedentes del sustrato lignocelulósico pretratado, utilizado solo o en una mezcla.

Según su naturaleza, dicho sustrato carbonado es introducido ventajosamente en el reactor antes de la esterilización de dicho reactor, o es esterilizado por separado e introducido en el reactor previamente esterilizado.

Preferentemente, la concentración del sustrato carbonado de crecimiento está comprendida entre 30 y 70 g/l.

Preferentemente, la fase a) de crecimiento se lleva a cabo durante un periodo comprendido entre 30 y 70 h, y preferiblemente entre 40 y 60 h.

Preferentemente, la fase a) de crecimiento opera a un pH de 4,8 y a una temperatura de 27 °C.

Según la invención, dicho procedimiento comprende una fase b) de producción continua de celulasas en la que al menos un sustrato carbonado inductor es introducido con un caudal de suministro al menos constante, durante un periodo al menos superior a 200 h, siendo dicho sustrato carbonado al menos una solución acuosa de un hidrolizado hemicelulósico procedente de un pretratamiento ácido de un sustrato lignocelulósico, no experimentando dicha solución acuosa de hidrolizado hemicelulósico ninguna esterilización previa ni ninguna rectificación del pH, estando dicho pH de la solución acuosa comprendido entre 0,5 y 3, manteniéndose la masa del volumen de reacción constante mediante la extracción de una fracción de dicho volumen de reacción, operando dicha fase b) a un índice de dilución comprendido entre 0,001 y 0,008 h<sup>-1</sup>.

Dicha fase continua se lleva a cabo ventajosamente en un reactor de suministro continuo, durante la cual se extrae una fracción del volumen de reacción, de forma que la masa del volumen de reacción se mantenga constante. Dicha fase continua se denomina modo "chemostat" según la terminología anglosajona.

5 El sustrato lignocelulósico, que permite la obtención de la solución acuosa de hidrolizado hemicelulósico utilizada en la fase b) del procedimiento según la invención, es una fuente de hidratos de carbono formados principalmente por tres constituyentes: la celulosa (del 35 al 50 %), las hemicelulosas (del 20 al 30 %), que son polisacáridos constituidos esencialmente por pentosas y hexosas, y la lignina (del 15 al 25 %), que es una macromolécula de estructura compleja y de elevado peso molecular, formada por alcoholes aromáticos unidos por enlaces éter. Dicho sustrato se elige ventajosamente entre paja, madera, cultivos forestales, residuos de plantas productoras de alcohol, de azúcar y de cereales, residuos de la industria papelera y los productos de la transformación de los materiales lignocelulósicos.

15 El pretratamiento ácido experimentado por dicho sustrato lignocelulósico es implementado según los pretratamientos ácidos conocidos por el experto en la materia. Preferentemente, el pretratamiento ácido es una hidrólisis ácida, una cocción ácida o una explosión de vapor con una impregnación previa de dicho sustrato lignocelulósico con una solución acuosa de ácido sulfúrico.

20 La solución acuosa del hidrolizado hemicelulósico así obtenida presenta un pH comprendido entre 0,5 y 3, y es utilizada sin ninguna etapa de esterilización ni de rectificación del pH.

Preferentemente, dicha solución acuosa del hidrolizado hemicelulósico presenta un pH comprendido entre 0,5 y 2.

25 El sustrato carbonado inductor utilizado de la fase b) del procedimiento según la invención es ventajosamente una solución acuosa de hidrolizado hemicelulósico procedente de un pretratamiento ácido de un sustrato lignocelulósico, solo o en una mezcla con al menos otro sustrato carbonado que no haya experimentado una esterilización.

30 Preferentemente, dichos sustratos carbonados se eligen entre azúcares inductores o no inductores, de forma preferida se eligen entre la lactosa, la glucosa, la celobiosa y la xilosa, solos o en una mezcla.

Dichos sustratos se disuelven en dicha solución acuosa del hidrolizado hemicelulósico.

35 En el caso en el que el sustrato carbonado inductor sea una solución acuosa de un hidrolizado hemicelulósico procedente de un pretratamiento ácido de un sustrato lignocelulósico en una mezcla con al menos otro sustrato carbonado que haya experimentado una esterilización, dicho sustrato carbonado inductor presenta una concentración comprendida entre 200 y 600 g/l, según el grado de solubilidad de los sustratos carbonados utilizados.

40 En el caso en el que el sustrato carbonado inductor sea una solución acuosa de un hidrolizado hemicelulósico procedente de un pretratamiento ácido de un único sustrato lignocelulósico, dicho sustrato carbonado inductor presenta una concentración comprendida entre 40 y 400 g/l, después de haber sido eventualmente concentrado.

45 La utilización de dicho sustrato carbonado inductor específico procedente del pretratamiento ácido de un sustrato lignocelulósico permite la implementación de la fase b) de producción de celulasas durante un periodo más largo, preferiblemente superior a 200 h, con respecto al procedimiento de la técnica anterior.

50 Según la invención, dicho sustrato carbonado inductor es suministrado con un caudal de suministro al menos constante. Preferentemente, el caudal de suministro de dicho sustrato carbonado inductor está comprendido entre 35 y 140, y preferiblemente entre 35 y 60 mg de sustrato carbonado inductor por gramo de peso seco de cepa y por hora.

De forma preferida, el caudal de suministro se aumenta gradualmente en la fase b), de forma más preferida se aumenta gradualmente hasta ser duplicado en las primeras horas de implementación de la fase b), preferiblemente después de al menos 24 h y de forma preferida después de al menos 48 h de la implementación de la fase b).

55 Según la invención, el periodo de la fase b) de producción continua de celulasas es al menos superior a 200 h, preferiblemente al menos superior a 300 h y de forma preferida al menos superior a 400 h.

60 En la fase b), la masa del volumen de reacción se mantiene constante mediante la extracción de una fracción de dicho volumen de reacción.

Preferentemente, la extracción se lleva a cabo según los métodos de extracción conocidos por el experto en la materia, tales como, por ejemplo, gracias a un sistema de regulación y a una bomba de extracción controlable.

65 Preferentemente, el caudal de extracción es al menos igual al caudal de suministro de la fase b).

Según la invención, el índice de dilución, definido como la proporción entre el caudal de extracción y el volumen de reacción del reactor durante la fase b) de producción continua, está ventajosamente comprendido entre 0,001 h<sup>-1</sup> y 0,008 h<sup>-1</sup>, y de forma preferida entre 0,002 y 0,008 h<sup>-1</sup>. El índice de dilución muy preferido es de 0,004 h<sup>-1</sup>. Preferentemente, la fase b) opera a un pH comprendido entre 3 y 5,5 y a una temperatura comprendida entre 20 y 30 °C.

Una fase opcional a') de producción llevada a cabo en un reactor de suministro continuo de al menos un sustrato carbonado inductor, durante la cual no se realiza ninguna extracción del contenido del fermentador, es decir, en modo "fed batch", es implementada ventajosamente entre la fase a) y la fase b).

La implementación de dicha fase a') permite no extraer la fracción de volumen de reacción que contiene la cepa de hongo filamentosos mientras las concentraciones de proteínas producidas son todavía bajas. Dicho sustrato carbonado inductor utilizado en la fase a') es idéntico al sustrato carbonado inductor utilizado en la fase b) de producción.

Preferentemente, el caudal de suministro de dicho sustrato carbonado inductor está comprendido entre 35 y 140, y preferiblemente entre 35 y 60 mg de sustrato carbonado inductor por gramo de peso seco de cepa y por hora. Dicho caudal de suministro se mantiene constante durante todo el periodo de la fase a').

Preferentemente, la fase a') es implementada durante un periodo comprendido entre 50 y 150 h y preferiblemente entre 70 y 130 h.

Preferentemente, la fase a') opera a un pH comprendido entre 3 y 5,5 y a una temperatura comprendida entre 20 y 30 °C. El procedimiento según la presente invención permite aumentar, incluso duplicar, la productividad, así como la concentración de las celulasas y de las hemicelulasas producidas con respecto a los procedimientos de la técnica anterior, y la producción de estas celulasas de forma continua durante un periodo más largo.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: no conforme

El ejemplo 1 presenta un cultivo que utiliza las condiciones de referencia de la patente FR-B-2 881 753. El ejemplo 1 ilustra un procedimiento de producción de celulasas y de hemicelulasas que comprende una fase de crecimiento y una fase de producción en modo "fed batch" implementadas durante 167 h

La producción de celulasas y de hemicelulasas se lleva a cabo en un reactor agitado mecánicamente de 3 l. El medio mineral tiene la siguiente composición: KOH 1,66 g/l, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85 % 2 ml/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,8 g/l, MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O 0,6 g/l, CaCl<sub>2</sub> 0,6 g/l, MnSO<sub>4</sub> 3,2 mg/l, ZnSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O 2,8 mg/l, CoCl<sub>2</sub> 10 4,0 mg/l, FeSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O 10 mg/l, Corn Steep 1,2 g/l, antiespumante 0,5 ml/l.

Se lleva a cabo un precultivo líquido de la cepa de *Trichoderma reesei* CL847. El medio mineral del precultivo, es idéntico al del reactor, aparte de la adición de ftalato de potasio a 5 g/l para tamponar el pH. El crecimiento del hongo en el precultivo se lleva a cabo utilizando glucosa como sustrato carbonado, a una concentración de 30 g·l<sup>-1</sup>.

El crecimiento del inóculo dura entre 2 y 3 días y se lleva a cabo a 28 °C en un incubador agitado a la presión atmosférica.

El reactor que contiene el medio mineral es esterilizado a 120 °C durante 20 minutos, la fuente carbonada glucosa es esterilizada aparte a 120 °C durante 20 minutos, y después añadida de forma estéril al reactor, de forma que se obtenga una concentración final de 30 g/l. El reactor es sembrado con un 10 % (v/v) de dicho precultivo de la cepa de *Trichoderma reesei* CL847 en cuanto la concentración residual de glucosa del precultivo es inferior a 15 g/l.

El experimento llevado a cabo 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 °C y un pH de 4,8 (regulado con amoníaco 5,5 M). La aireación es de 0,5 vvm y la agitación se aumenta a entre 200 y 800 rpm en función de la pO<sub>2</sub> (presión de oxígeno disuelto), que se regula al 30 %.
- una fase de producción de proteínas en modo "fed batch". Después de 30 horas, se inyecta una solución del sustrato carbonado lactosa a 250 g·l<sup>-1</sup> de forma continua con un caudal de 4 ml/h a 35 mg de lactosa por g de cepa de *Trichoderma reesei* CL847 y por hora, hasta 167 horas. La temperatura se reduce a 25 °C y el pH a 4 hasta el final del cultivo. El pH es regulado mediante la adición de una solución de amoníaco a 5,5 N, que aporta el nitrógeno necesario para la síntesis de las celulasas y de las hemicelulasas excretadas. El contenido en oxígeno disuelto se mantiene al 30 % por la acción de la agitación

La producción de celulasas se sigue mediante el análisis de las proteínas extracelulares mediante el método de Lowry y el patrón BSA, después de la separación del micelio mediante una filtración o una centrifugación. Las actividades celolíticas determinadas son:

- 5 - la actividad de papel de filtro (UPF: unidad de papel de filtro) que permite analizar la actividad global del conjunto enzimático de endoglucanasas y exoglucanasas
- la actividad de  $\beta$ -glucosidasa para las actividades específicas.

10 La actividad UPF se mide con papel Whatman nº 1 según el procedimiento recomendado por la comisión biotecnológica IUPAC, a una concentración inicial de  $50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; se determinó la muestra del ensayo de la solución enzimática que se va a analizar, que libera el equivalente a  $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glucosa (análisis colorimétrico) en 60 minutos.

15 El principio de la actividad de papel de filtro es determinar, mediante un análisis con ácido dinitrosalicílico (DNS), la cantidad de azúcares reducidos procedente de un papel de Whatman nº 1. El sustrato utilizado para la determinación de la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa es el p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (PNPG). Es escindido por la  $\beta$ -glucosidasa, que libera p-nitrofenol. Una unidad de actividad de  $\beta$ -glucosidasa se define como la cantidad de enzima necesaria para la producción de  $1 \mu\text{mol}$  de nitrofenol a partir de PNPG por minuto, y se expresa en IU/ml.

20 Las actividades específicas se obtienen dividiendo las actividades expresadas en IU/ml por la concentración de celulasas. Se expresan en  $\text{IU}\cdot\text{mg}^{-1}$ .

25 La productividad final se calcula teniendo en cuenta toda la masa de las celulasas y las hemicelulasas producidas durante la fase de producción (incluyendo las muestras) y dividiéndola por el periodo de la fase de producción y el volumen útil del reactor.

El término "Biomasa" caracteriza la cepa de *Trichoderma reesei* CL847.

30 El término "Proteína" se define como el cóctel enzimático obtenido que comprende las celulasas y las hemicelulasas producidas.

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

35 Biomasa g/l: 14,4  
 Proteínas g/l: 35,7  
 Productividad =  $0,21 \text{ g/l/h}$   
 UPF 22,1 IU/ml  
 $\beta$ -Glucosidasa específica:  $0,8 \text{ IU/mg}$

40 Ejemplo 2: no conforme

45 El ejemplo 2 presenta un cultivo análogo al del ejemplo 1, salvo que se sigue el modo "fed-batch" hasta más allá de 200 h con el mismo sustrato de suministro. Se constata que hay una detención en la producción de celulasas y de hemicelulasas después de 200 h. Éstas incluso comienzan a degradarse cuando la concentración se reduce desde  $37 \text{ g/l}$  hasta  $35 \text{ g/l}$ . En lo que respecta a la biomasa, ésta aumenta durante este periodo justo hasta alcanzar una concentración de  $20,9 \text{ g/l}$ . Los análisis demuestran que ha habido una carencia de azufre.

La evolución de la concentración de biomasa y de proteínas (g/l) está representada en la figura 1.

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

55 Biomasa g/l: 20,9  
 Proteínas g/l: 35,1  
 Productividad =  $0,13 \text{ g/l/h}$  (era de  $0,17 \text{ g/l/h}$  después de 216 h)  
 UPF 16,1 IU/ml  
 $\beta$ -Glucosidasa específica  $0,7 \text{ IU/mg}$

Ejemplo 3: conforme a la invención.

60 El ejemplo 3 se pone en marcha en las mismas condiciones que las del ejemplo 1, pero comprende 3 fases:

- 65 - una fase a) en modo "batch" en las mismas condiciones que las del ejemplo 1, pero con una concentración de glucosa de  $60 \text{ g/l}$ . Esta fase dura 50 h,
- una segunda fase a') en modo "fed-batch". El fedbatch se pone en marcha en el momento en el que se agota el sustrato carbonado glucosa con una solución del hidrolizado hemicelulósico procedente de una paja pretratada mediante una explosión de vapor con una impregnación previa de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en la que se ha disuelto glucosa y lactosa, para llegar a una concentración global de sustrato carbonado de  $500 \text{ g/l}$ . Esta solución no es

esterilizada, y su pH no ha aumentado, y es de 1. Se aplica un caudal de 4 ml/h (es decir, un flujo de 35 mg de azúcares por g de cepa de *Trichoderma reesei* CL847 y por hora). Esta fase dura 100 h.

- una fase b) de producción continua de celulasas y de hemicelulasas se pone en marcha a continuación. El caudal de suministro se mantiene constante a 4 ml/h durante todo el experimento. El reactor se mantiene con un peso constante mediante la extracción continua del mosto gracias a un sistema de regulación y a una bomba de extracción controlable. El índice de dilución es de 0,002 h<sup>-1</sup>.

Hemos producido de forma continua a partir de 400 h una solución enzimática que tiene una concentración superior a 100 g/l y una productividad superior a 0,2 g/l/h. Esto permite, por lo tanto, triplicar la concentración de proteínas y tener una productividad superior a la del ejemplo 1 (+20 %).

La evolución de la concentración de biomasa y de proteínas (g/l) con el tiempo para el ejemplo 3, en el que la fase continua se pone en marcha después de 150 h con un caudal de 4 ml/h, está representada en la figura 2.

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

Biomasa g/l: 36,7  
 Proteínas g/l: 107,2  
 Productividad final = 0,26 g/l/h  
 UPF 76,8 IU/ml  
 β-Glucosidasa específica 1,2 IU/mg

#### Ejemplo 4: conforme

El ejemplo 4 es análogo al ejemplo 3 salvo porque la fase b) de producción continua se pone en marcha directamente después de la fase a) de crecimiento en modo "batch", y porque el caudal de suministro del sustrato carbonado inductor en la fase b) de producción continua se aumenta gradualmente desde 4 ml/h hasta 8 ml/h, es decir, aumenta en 1 ml cada 12 h después del lanzamiento de dicha fase b). El sustrato carbonado inductor utilizado es el mismo que el del ejemplo 3, es decir, una solución de hidrolizado hemicelulósico procedente de una paja pretratada mediante una explosión de vapor con una impregnación previa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en la que se ha disuelto glucosa y lactosa. Esta solución no ha sido esterilizada, y su pH no ha aumentado, y es de 1. Las condiciones operativas utilizadas en las fases a) y b) son idénticas a las utilizadas en el ejemplo 3. Con respecto al aumento en el caudal de suministro del sustrato carbonado inductor, el índice de dilución es de 0,004 h<sup>-1</sup>. La masa del volumen de reacción se mantiene constante.

La productividad final del experimento es de 0,39 g·l<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>. Prácticamente se ha duplicado con respecto al ejemplo 1.

Esto permite reducir los costes de inversión. La concentración final de proteínas prácticamente se ha triplicado. Esto permite reducir los costes del post-tratamiento, particularmente, dado el caso, la concentración de las proteínas producidas. El cultivo no necesita una k<sub>L</sub>a elevada (aproximadamente 75 h<sup>-1</sup>) gracias al bajo índice de dilución aplicado, que permite así tener unos bajos costes operativos relacionados con la agitación y la aireación.

La evolución de la productividad (rp) de las celulasas y de las concentraciones de las cepas de *T. reesei* y de las celulasas para el ejemplo 4, en el que la fase continua es lanzada después de 150 h y el caudal de fed-batch se aumenta desde 4 hasta 8 ml/h, está representada en la figura 3.

Las determinaciones analíticas sobre el mosto final proporcionan los siguientes resultados

Biomasa g/l: 58,1  
 Proteínas g/l: 102,9  
 Productividad final = 0,39 g/l/h  
 UPF 77,6 IU/ml  
 β-Glucosidasa específica: 1,3 IU/mg

La productividad prácticamente se ha duplicado con respecto al ejemplo 1, y la concentración de proteínas prácticamente se ha triplicado. Dicha concentración se mantiene durante más de 300 h

#### Ejemplo 5: no conforme

El ejemplo 5 permite mostrar el efecto de la no esterilización de la solución del hidrolizado hemicelulósico procedente de una paja pretratada mediante una explosión de vapor con una impregnación previa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre los rendimientos del procedimiento.

El ejemplo 5 es lanzado en las mismas condiciones que las del ejemplo 4, salvo porque la solución de hidrolizado es esterilizada antes de su utilización. La concentración de dicha solución es de 250 g/l. El cultivo dio lugar a una

elevada acumulación de la cepa de *T. reesei* y a una baja a producción de celulasas. La demanda de oxígeno es muy importante al final del cultivo, con una  $k_{LA}$  necesaria superior a  $170 \text{ h}^{-1}$ .

5 El rendimiento de la producción de proteína con respecto al sustrato carbonado es inferior a  $0,1 \text{ g/g}$ , mientras que es de  $0,3 \text{ g/g}$  para los ejemplos 1 hasta 4.

Las determinaciones analíticas sobre el mosto final proporcionan los siguientes resultados

10 Biomasa:  $\text{g/l}$ : 99,8  
 Proteínas:  $\text{g/l}$ : 24,2  
 UPF: 14,5 IU/ml  
 $\beta$ -Glucosidasa específica: 1,1 IU/mg

#### 15 Ejemplo 6: no conforme

El ejemplo 6 muestra el inconveniente de la implementación de la fase continua con un elevado índice de dilución, que conduce a un medio viscoso y a problemas de taponamientos en la bomba de extracción a causa de la morfología del hongo cuando está en la fase de crecimiento. La  $k_{LA}$ , y por lo tanto, el coste operativo unido a la agitación y la aireación del medio, son elevados.

20 El ejemplo 6 se lleva a cabo en las mismas condiciones que las del ejemplo 4, con una primera fase a) de crecimiento en modo "batch" que dura 50 h, y una fase b) de producción continua de celulasas y de hemicelulasas.

25 La solución suministrada a la fase de producción es una solución de hidrolizado hemicelulósico que no ha sido esterilizada en la que se ha disuelto lactosa a  $250 \text{ g/l}$ . El caudal de suministro del sustrato carbonado inductor es de  $13 \text{ ml/h}$ , lo que se corresponde con  $54 \text{ mg}$  de azúcares por  $\text{g}$  de cepa de *Trichoderma reesei* CL847 y por hora. La masa del volumen de reacción se mantiene constante y el índice de dilución aplicado es de  $0,025 \text{ h}^{-1}$ . La realización del experimento ha sido muy difícil, con unos taponamientos repetidos de la bomba de extracción, siendo el medio muy viscoso cuando el hongo está en crecimiento. Se ha producido una elevada producción de hongo y la consigna de  $pO_2$  no ha podido mantenerse por encima del  $0 \%$ . No ha podido alcanzarse el estado estacionario. La  $k_{LA}$  del biorreactor no ha sido suficiente para proporcionar el oxígeno necesario que permite consumir todo el azúcar del suministro. Han podido medirse unas  $k_{LA}$  de  $700 \text{ h}^{-1}$  en agua con este reactor.

#### 35 Ejemplo 7: no conforme

El ejemplo 7 se lleva a cabo en las mismas condiciones que las del ejemplo 3, salvo por la diferencia de que la fase en modo "batch" se lleva a cabo con una concentración de glucosa de  $65 \text{ g/l}$ . La fase a') en modo "fed-batch" y la fase b) de producción en modo continuo se llevan a cabo en las mismas condiciones, con la diferencia de que la solución suministrada en las fases a') y b) es una solución de lactosa a  $250 \text{ g/l}$  acidificada mediante la adición de ácido sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de forma que dicha solución tenía un pH de 1,5. Las evoluciones de las concentraciones de biomasa celular y de proteínas se presentan en la figura 4. Igualmente en la figura 4 se representa la evolución de las concentraciones de sulfatos y de iones amonio, que no son limitantes. El experimento no permite obtener una concentración de proteínas superior a  $50 \text{ g/l}$ . La concentración de proteínas se estabiliza a  $50 \text{ g/l}$  después de 400 horas.

45 Los resultados obtenidos demuestran la importancia de la utilización de una solución de hidrolizados hemicelulósicos en la fase de producción continua, y que los rendimientos obtenidos no son debidos al aumento en la carencia de azufre y de nitrógeno.

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

Biomasa:  $\text{g/l}$ : 23  
 Proteínas:  $\text{g/l}$ : 48,3  
 UPF: 31,2  
 55  $\beta$ -Glucosidasa específica: 1,1

#### Ejemplo 8: no conforme

60 El ejemplo 8 se lleva a cabo en las mismas condiciones que las del ejemplo 3, salvo por la diferencia de que la solución de hidrolizado hemicelulósico procedente de una paja pretratada mediante una explosión de vapor con una impregnación previa de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en la que se ha disuelto glucosa y lactosa, no es esterilizada, sino que experimenta una rectificación de su pH mediante la adición de NaOH. Su pH se eleva hasta 4. La producción de proteínas se detiene después de 160 h y permanece estable a una concentración próxima a  $20 \text{ g/l}$ .

65

## ES 2 641 254 T3

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

5 Biomasa: g/l: 25,1  
Proteínas: g/l: 19,8  
UPF: 15,8 IU/ml  
 $\beta$ -Glucosidasa específica: 1,2 IU/mg

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de celulasas y hemicelulasas por una cepa perteneciente a un hongo filamentoso, en un biorreactor agitado y aireado, que comprende al menos dos fases:
- 5
- una fase a) de crecimiento de dicha cepa en presencia de al menos un sustrato carbonado de crecimiento en un reactor cerrado, llevándose a cabo dicha fase de crecimiento con una concentración de sustrato carbonado de crecimiento comprendida entre 10 y 90 g/l
  - una fase b) de producción continua de celulasas en la que se suministra al menos un sustrato carbonado inductor con un caudal de suministro al menos constante durante un periodo al menos superior a 200 h, siendo dicho sustrato carbonado inductor al menos una solución acuosa de un hidrolizado hemicelulósico procedente de un pretratamiento ácido de un sustrato lignocelulósico, no experimentando dicha solución acuosa del hidrolizado hemicelulósico ninguna esterilización previa ni ninguna rectificación del pH, estando dicho pH de la solución acuosa comprendido entre 0,5 y 3, manteniéndose la masa del volumen de reacción constante mediante la extracción de una fracción de dicho volumen de reacción, operando dicha fase b) a un índice de dilución comprendido entre 0,001 y 0,008 h<sup>-1</sup>,
- 10
- en el que el sustrato carbonado inductor utilizado en la fase b) es una solución acuosa de un hidrolizado hemicelulósico procedente de un pretratamiento ácido de un sustrato lignocelulósico en una mezcla con al menos otro sustrato carbonado elegido entre azúcares inductores o no inductores, en el que el caudal de suministro de dicho sustrato carbonado inductor está comprendido entre 35 y 140 mg de sustrato carbonado inductor por gramo de peso seco de cepa y por hora.
- 20
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha cepa es una cepa de *Trichoderma reesei* modificada mediante una mutación, una selección o una recombinación genética.
- 25
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el sustrato carbonado de crecimiento utilizado en dicha fase de crecimiento se elige entre la glucosa, la lactosa, la xilosa, los residuos obtenidos después de una fermentación etanólica de azúcares monómeros de los hidrolizados enzimáticos del sustrato lignocelulósico y los extractos de la fracción hemicelulósica en forma de monómeros procedentes del sustrato lignocelulósico pretratado, utilizado solo o en una mezcla.
- 30
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el pretratamiento ácido es una hidrólisis ácida, una cocción ácida o una explosión de vapor con una impregnación previa de dicho sustrato lignocelulósico con una solución acuosa de ácido sulfúrico.
- 35
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el periodo de la fase b) de producción continua de celulasas es al menos superior a 300 h.
- 40
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el periodo de la fase b) de producción continua de celulasas es al menos superior a 400 h.
- 45
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el caudal de suministro se aumenta gradualmente en la fase b).
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha fase b) opera a un índice de dilución comprendido entre 0,002 y 0,008 h<sup>-1</sup>.
- 50
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que se implementa una fase opcional a') de crecimiento y de producción llevada a cabo en un reactor de suministro continuo de al menos un sustrato carbonado inductor, durante la cual no se efectúa ninguna extracción del contenido del fermentador, entre la fase a) y la fase b).
- 55
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicho sustrato carbonado inductor utilizado en la fase a') es idéntico al sustrato carbonado inductor utilizado en la fase b) de producción.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 o 10, en el que la fase a') es implementada durante un periodo comprendido entre 50 y 150 h.

Figura 1

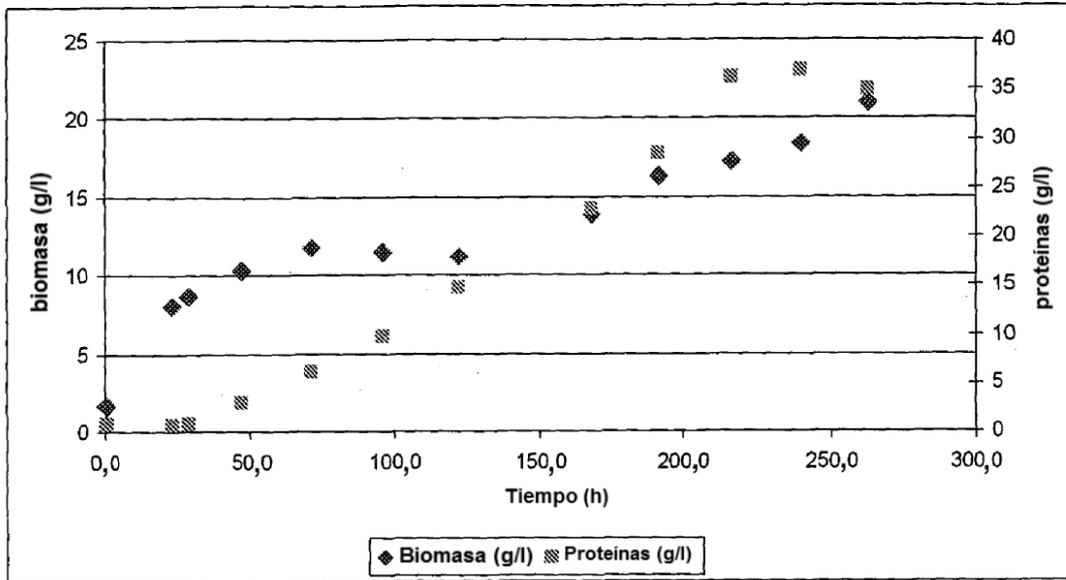


Figura 2

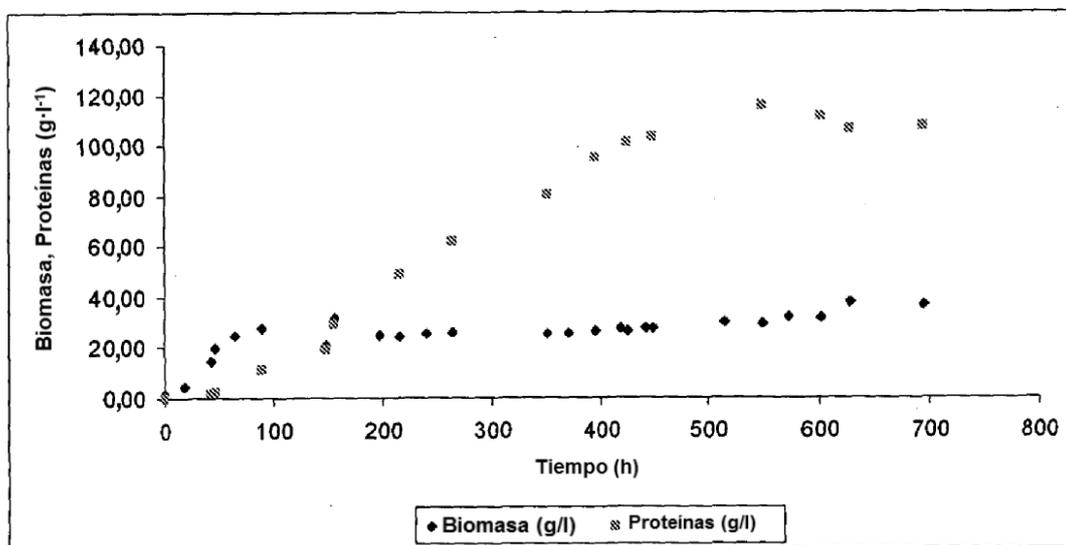


Figura 3

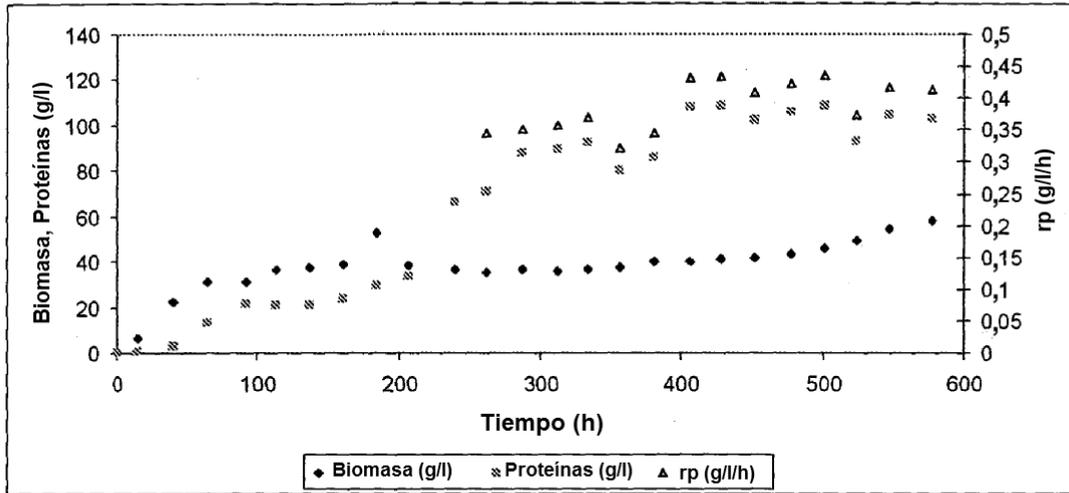


Figura 4

