

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 671**

51 Int. Cl.:

C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.11.2012 PCT/FR2012/000489**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13087998**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2012 E 12813901 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 2791328**

54 Título: **Procedimiento de producción de un cóctel enzimático usando residuos sólidos de un procedimiento de conversión bioquímica de materiales lignocelulósicos**

30 Prioridad:

14.12.2011 FR 1103857

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

24.06.2019

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

ES 2 717 671 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de un cóctel enzimático usando residuos sólidos de un procedimiento de conversión bioquímica de materiales lignocelulósicos

5 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.

10 Técnica anterior

Desde la década de 1970 la transformación de materiales lignocelulósicos en etanol, tras la hidrólisis de los polisacáridos constitutivos en azúcares fermentables, ha sido objeto de numerosos trabajos. Se pueden citar, por ejemplo, los trabajos de referencia de Laboratorio Nacional de Energía Renovable ("Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol", Humbird et al., NREL/ TP-5100-57764, mayo 2011).

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

25 La madera, la paja, las raspas de maíz son los materiales lignocelulósicos más empleados, aunque se pueden usar también otros recursos, cultivos forestales particulares, residuos de plantas alcoholígenas, azucareras y de cereales, productos y residuos de la industria papelera y productos de transformación de materiales celulósicos y lignocelulósicos. Están constituidos en su mayoría por aproximadamente de un 35 a un 50 % de celulosa, de un 20 a un 30 % de hemicelulosa y de un 15 a un 25 % de lignina.

30 El procedimiento de transformación de los materiales lignocelulósicos en etanol comprende una etapa de pretratamiento físico-químico, seguida de una etapa de hidrólisis enzimática o química, de una etapa de fermentación etanólica de los azúcares liberados, pudiendo llevar a cabo la fermentación etanólica y la hidrólisis enzimática de forma simultánea, y de una etapa de recuperación del etanol.

35 El material pretratado se hidroliza por vía ácida o por vía enzimática empleando enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas.

40 La vía ácida, efectuada usando un ácido fuerte, en particular ácido sulfúrico, es eficaz pero requiere grandes cantidades de productos químicos (ácido y después base para la neutralización). La hidrólisis enzimática no presenta este inconveniente; esta se efectúa además en condiciones suaves y es eficaz. En cambio, el coste de las enzimas sigue siendo muy elevado, representando del 30 al 50 % del coste de transformación del material lignocelulósico en etanol. Por ello, se han realizado muchos trabajos para reducir este coste: la optimización de la producción de enzimas en primer lugar, seleccionando las cepas hiperproductoras y mejorando los procedimientos de producción de dichas enzimas, disminuyendo la cantidad de enzimas en hidrólisis después, optimizando la fase de pretratamiento o mejorando la actividad específica de estas enzimas.

50 Sin embargo, la disminución de la cantidad de enzimas puede llevar a la no conversión de una fracción importante de la celulosa, conduciendo a la producción de una gran cantidad de residuo sólido a la salida de la etapa de hidrólisis enzimática y/o de fermentación. El mismo efecto se observa si la hidrólisis enzimática se lleva a cabo con un alto contenido de materia seca, siendo la materia seca de una muestra, expresada en porcentaje en peso, la proporción de la masa de la muestra obtenida tras secado a 105 °C durante 24 horas con respecto a la masa inicial de la muestra. Este residuo sólido, por tanto, debe ser tratado de nuevo, convencionalmente mediante combustión para producir vapor y electricidad, o mediante metanización para producir un biogás.

55 Durante la última década los principales trabajos se han dedicado a comprender los mecanismos de acción de las celulasas y de expresión de las enzimas a fin de excretar el cóctel enzimático más apropiado para la hidrólisis de los sustratos lignocelulósicos modificando las cepas con las herramientas de la biología molecular.

60 El cóctel enzimático es una mezcla de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas. Las enzimas del cóctel enzimático contienen tres grandes tipos de actividades: las endoglucanasas, las exoglucanasas y las celobiasas, denominándose también estas últimas β -glucosidasas.

65 El microorganismo más utilizado para la producción del cóctel enzimático es el hongo *Trichoderma reesei*. Las cepas silvestres tienen la facultad de excretar, en presencia de un sustrato inductor como la celulosa por ejemplo, el cóctel enzimático considerado como el más adecuado para la hidrólisis de la celulosa. Otras proteínas que poseen propiedades indispensables para la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos son producidas también por el

Trichoderma reesei, como las xilanasas por ejemplo. La presencia de un sustrato inductor es indispensable para la expresión de las enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas. La naturaleza del sustrato carbonado inductor tiene una gran influencia en la composición del cóctel enzimático. Es el caso de la xilosa que, asociada a un sustrato carbonado inductor como la celulosa o la lactosa, permite mejorar significativamente la actividad denominada xilanasas.

La lactosa, en un procedimiento de producción industrial de cóctel enzimático, sigue siendo uno de los sustratos más adecuados; su coste, sin embargo, varía de manera importante y representa aproximadamente de uno a dos tercios del precio de coste de las enzimas. En el caso del uso de la lactosa como fuente de carbono, el procedimiento de producción del cóctel enzimático depende de una fuente de carbono externa. Por ello, el uso de sustratos carbonados obtenidos del procedimiento de conversión bioquímica de materiales lignocelulósicos es una vía de progreso importante si la fuente de carbono inductora está fácilmente disponible.

La solicitud de patente EP1690944 A1 enseña el uso de la fase acuosa obtenida tras la fermentación alcohólica y la separación del etanol como fuente de carbono inductora y de crecimiento para el cultivo del microorganismo celulolítico y la producción de enzimas. El residuo obtenido en la parte inferior de la columna de destilación se denomina "vinazas". Este se filtra y la parte soluble se usa para la producción de celulasas.

La solicitud de patente WO09026716 A1 describe la producción de un cóctel enzimático a partir del *Trichoderma reesei* partiendo de un sustrato carbonado que contiene azúcares inductores de la producción de celulasas. Esta solicitud enseña que un 3 % en peso de los azúcares inductores es suficiente para inducir la producción de celulasas. Los azúcares inductores descritos son mono-, di-, y oligosacáridos producidos eventualmente por la hidrólisis de la celulosa.

La solicitud de patente WO11028554 en seña el uso de una biomasa que se ha sometido a un tratamiento ácido para el cultivo de un microbio que permite la producción de celulasas, así como el uso del residuo sólido obtenido de la hidrólisis de las hemicelulosas. A este residuo sólido se le ha eliminado previamente su fracción de lignina en una etapa de extracción de lignina. El residuo sólido deslignificado se usa desde la etapa de crecimiento del microorganismo, lo que conlleva dificultades de operación, ya que la viscosidad del medio es elevada hasta que se inicia la producción de enzimas.

Se sabe que la lignina, y en particular los compuestos fenólicos de que está compuesta, tiene un efecto inhibitorio sobre las enzimas (véase por ejemplo « Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds », Tejirian y Xu, *Enzyme and Microbial Technology* Vol. 48 (3) págs. 239-247, marzo 2011).

La patente US3972775 enseña la producción de un microorganismo celulolítico y de enzimas a partir de jugos azucarados obtenidos del hidrolizado y de un inductor celulósico (por ejemplo, de la carga celulósica triturada). La carga y el inductor celulósico son materiales de desecho celulósicos, que no contienen, por tanto, lignina.

La patente GB1489145 enseña el cultivo del microorganismo celulolítico y la producción de enzimas a partir de residuos de celulosa, habiendo obtenido estos últimos de materiales celulósicos puros o de materiales de desecho celulósicos. No proceden directamente, por tanto, del procedimiento de conversión del material lignocelulósico.

El artículo de Prachand Shrestha et al. en el *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, n.º 10, páginas 4156-4161 describe un procedimiento de producción de un cóctel enzimático a partir de *Trichoderma reesei* con fibras de maíz procedentes de una esterilización como sustrato.

Un objeto de la invención es proponer una fuente de carbono inductora fácilmente disponible, que permita producir un cóctel enzimático con actividades adecuadas para la hidrólisis del material lignocelulósico. Esta invención permite, por otro lado, la reutilización interna de coproductos no reciclables a etanol.

Sumario e interés de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de un cóctel enzimático por un microorganismo celulolítico caracterizado por que usa un residuo sólido de la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos que han sido sometidos a una etapa de pretratamiento y opcionalmente un residuo sólido de la fermentación etanólica de hidrolizados enzimáticos de dichos materiales.

Una ventaja de la invención es la reducción, incluso la supresión, de la adición de sustrato carbonado de origen externo al procedimiento de conversión bioquímica de materiales lignocelulósicos. Otra ventaja es la reutilización de los residuos sólidos de dicho procedimiento de conversión bioquímica para la producción de un cóctel enzimático. Esta reutilización permite reducir la cantidad de efluentes producidos que deben ser tratados de nuevo antes de su vertido o almacenamiento.

Puesto que dichos residuos sólidos que contienen celulosa y lignina se reutilizan para la producción de un cóctel enzimático, el coste de dicho cóctel disminuye. Por otro lado, ya que dichos residuos encuentran una vía de

reutilización gracias al procedimiento de acuerdo con la invención, se puede llevar cabo una hidrólisis parcial en la etapa de hidrólisis enzimática, obtenida reduciendo la cantidad de cóctel enzimático usado en dicha etapa de hidrólisis. Este último efecto lleva por lo general a una reducción del coste del procedimiento de conversión bioquímica del material lignocelulósico.

5 La invención será más ventajosa cuando los materiales lignocelulósicos tratados son refractarios a la hidrólisis enzimática (chopo o *Miscanthus*, por ejemplo).

10 Una ventaja complementaria del procedimiento de acuerdo con la invención es la producción de un cóctel enzimático particularmente adecuado para la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico pretratado convertido en el procedimiento de conversión bioquímica. Dichos residuos, aunque presentan un contenido elevado de lignina, de forma sorprendente tienen un efecto inductor que permite la producción de dicho cóctel enzimático.

15 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de un cóctel enzimático con un microorganismo celulolítico que comprende dos etapas:

- 20 - una etapa a) de crecimiento de dicho microorganismo en presencia de al menos un sustrato carbonado de crecimiento en un reactor cerrado, efectuándose dicha etapa de crecimiento con una concentración de sustrato carbonado de crecimiento comprendida entre 10 y 90 g/l.
- 25 - una etapa b) de producción del cóctel enzimático en la que se alimenta al menos un sustrato carbonado inductor, siendo dicho sustrato carbonado inductor al menos un residuo sólido obtenido de la etapa de hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos que han sido sometidos a una etapa de pretratamiento, la parte de lignina en la parte sólida de dicho residuo sólido es de un 45 a un 80 % en peso, representando la parte sólida del residuo sólido entre un 10 y un 40 % de dicho residuo, con opcionalmente al menos un residuo sólido obtenido de la etapa de fermentación etanólica de hidrolizados enzimáticos, efectuándose dicha etapa de producción con una concentración de sustrato carbonado comprendida entre 150 y 400 g/l.

30 Dicho procedimiento de producción de un cóctel enzimático se lleva a cabo en cultivo de inmersión. Por cultivo de inmersión se entiende un cultivo en medio líquido.

35 Los microorganismos usados en el procedimiento de producción de un cóctel enzimático de acuerdo con la invención 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 los procedimientos de mutación-selección como, por ejemplo, la cepa IFP CL847 (patente francesa FR-B-2 555 803). Las cepas mejoradas mediante las técnicas de recombinación genética se pueden usar también. Estas cepas se cultivan en reactores agitados y aireados en condiciones compatibles con su crecimiento y la producción de enzimas.

45 El sustrato carbonado de crecimiento de dicho microorganismo usado en dicha etapa a) de crecimiento del procedimiento de acuerdo con la invención se selecciona ventajosamente entre los azúcares solubles industriales y, preferentemente, entre la glucosa, la lactosa, la xilosa, los residuos líquidos obtenidos tras la fermentación etanólica de los azúcares monoméricos de hidrolizados enzimáticos de materiales lignocelulósicos y los extractos de la fracción hemicelulósica en forma de monómeros procedentes del sustrato lignocelulósico pretratado, usado solo o mezclado. Según su naturaleza, dicho sustrato carbonado de crecimiento se introduce en el reactor cerrado antes de la esterilización o se esteriliza por separado y se introduce en el reactor cerrado tras la esterilización de este último.

50 De acuerdo con la invención, dicho sustrato carbonado de crecimiento se usa en dicha etapa a) de crecimiento con una concentración inicial comprendida entre 10 y 90 g de sustrato carbonado por litro de volumen de reacción.

55 Preferentemente, dicha etapa a) de crecimiento se efectúa durante un periodo comprendido entre 30 y 70 h, preferentemente entre 30 y 40 h.

Preferentemente, dicha etapa a) de crecimiento se efectúa a un pH de 4,8 y a una temperatura de 27 °C.

60 De acuerdo con la invención, dicho sustrato carbonado inductor usado en dicha etapa b) de producción es ventajosamente al menos un residuo sólido obtenido de la etapa de hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos que han sido sometidos a una etapa de pretratamiento y/o al menos un residuo sólido obtenido de la etapa de fermentación etanólica de hidrolizados enzimáticos.

65 Dicho residuo sólido se obtiene preferentemente tras una hidrólisis enzimática parcial, es decir, cuando esta última se efectúa con un alto contenido de materia seca (MS) y/o una baja cantidad de cóctel enzimático. Por alto contenido de MS se entiende un contenido superior al 20 % en peso de MS. Por una baja cantidad de cóctel

enzimático, se entiende una cantidad inferior a 10 mg de cóctel enzimático por g de celulosa en el material lignocelulósico que ha sido sometido a una etapa de pretratamiento. Por hidrólisis parcial, se entiende que solo se ha hidrolizado de un 20 a un 70 % en peso de la celulosa de entrada a la etapa de hidrólisis.

5 Dicho residuo sólido se separa ventajosamente del efluente de la etapa de hidrólisis enzimática y, cuando se usa, del efluente de la etapa de fermentación etanólica. La separación se efectúa ventajosamente mediante filtración, centrifugación o cualquier otro método conocido por el experto en la técnica que permite la separación de una fase sólida y una fase líquida.

10 Dicho residuo sólido se obtiene, por tanto, directamente del procedimiento de conversión bioquímica de materiales lignocelulósicos.

Dicho residuo sólido comprende una parte sólida y una parte líquida. En función del método de separación usado, la parte sólida del residuo sólido representa entre un 10 y un 40 % del peso del residuo sólido. Dicha parte sólida está constituida por lignina, compuestos minerales y celulosa no hidrolizada. La parte de celulosa en dicha parte sólida es de un 10 a un 50 % en peso. La parte de lignina en dicha parte sólida es de un 45 a un 80 % en peso. La parte de compuestos minerales en dicha parte sólida es de un 1 a un 15 % en peso. La parte líquida de dicho residuo sólido contiene xilosa (no fermentada por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*) que es inductora de la producción de xilanasas.

20 Preferentemente, dicho sustrato carbonado inductor se usa mezclado con al menos otro sustrato carbonado.

Preferentemente, dicho otro sustrato carbonado se selecciona entre azúcares inductores o no inductores, preferentemente se selecciona entre la lactosa, la glucosa, el hidrolizado celulósico, el hidrolizado hemicelulósico, la celobiosa y la xilosa, usado solo o mezclado. Más preferentemente, dicho sustrato carbonado se selecciona entre azúcares no inductores, más preferentemente entre la glucosa, el hidrolizado celulósico y el hidrolizado hemicelulósico.

30 Esta mezcla se denomina sustrato carbonado de producción. Dicho sustrato carbonado de producción contiene al menos un 5 % en peso de celulosa.

El sustrato carbonado de producción se prepara a una concentración de 150 a 400 g de sustrato carbonado por litro de sustrato carbonado de producción. El caudal específico de alimentación de sustrato carbonado de producción de la etapa b) de producción está comprendido ventajosamente entre 35 y 65 mg de sustrato carbonado por gramo de microorganismo y por hora, preferentemente de 35 a 45 mg de sustrato carbonado por gramo de microorganismo y por hora.

Dicho residuo sólido se obtiene de la etapa de hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos que han sido sometidos a una etapa de pretratamiento. Opcionalmente, se añade un residuo sólido obtenido de la etapa de fermentación etanólica de hidrolizados enzimáticos.

45 La etapa de pretratamiento del material lignocelulósico permite mejorar la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática de la fracción celulósica. Preferentemente, la etapa de pretratamiento es una etapa de pretratamiento ácido, preferentemente una hidrólisis ácida, una digestión ácida o una explosión de vapor con impregnación previa de dicho material con una solución acuosa de ácido sulfúrico. Preferentemente, la etapa de pretratamiento es la explosión de vapor.

A la salida de la etapa de pretratamiento, se puede separar ventajosamente un residuo sólido de una fracción líquida que contiene azúcares, denominada hidrolizado hemicelulósico mediante una separación líquido/sólido. Dicho residuo también se puede usar ventajosamente en la etapa b) de producción del cóctel enzimático de acuerdo con la invención como sustrato carbonado inductor. El sustrato carbonado inductor usado en la etapa b) de producción se puede separar, por tanto, de forma ventajosa a la salida de la etapa de pretratamiento de un material lignocelulósico.

55 Preferentemente, dicha etapa b) de producción se efectúa durante un periodo al menos superior a 30 h, preferentemente al menos superior a 100 h.

Preferentemente, dicha etapa b) de producción se efectúa a un pH comprendido entre 3 y 5,5 y a una temperatura comprendida entre 20 y 30 °C.

60 Dicha etapa b) de producción se puede llevar a cabo según los modos de "fed-batch" (cultivo discontinuo) y "chemostat" (quimioestado) de acuerdo con la terminología inglesa, conocidos por el experto en la técnica.

En una realización preferente, el material lignocelulósico pretratado se hidroliza en una etapa de hidrólisis enzimática. El efluente de esta etapa se trata después en una etapa de fermentación etanólica de los azúcares monoméricos de los hidrolizados enzimáticos. Estos tratamientos se pueden efectuar en el mismo equipo, o en

equipos diferentes. El residuo sólido se separa después de la etapa de hidrólisis enzimática y/o después de la etapa de fermentación etanólica.

5 En otra realización preferente, la etapa de fermentación y al menos una parte de la etapa de hidrólisis se efectúan simultáneamente. Esto se lleva a cabo, por ejemplo, añadiendo las levaduras etanólicas durante la etapa de hidrólisis. El residuo sólido se separa a la salida de la etapa de fermentación.

10 La etapa de hidrólisis se inicia con la adición del cóctel enzimático. La cantidad ventajosamente utilizada es de 1 a 60 mg de cóctel enzimático por gramo de celulosa en el material lignocelulósico que ha sido sometido a una etapa de pretratamiento, preferentemente de 5 a 35 mg de cóctel enzimático por gramo de celulosa en dicho material y, más preferentemente, de 5 a 20 mg de cóctel enzimático por gramo de celulosa en dicho material. Dicha etapa de hidrólisis se lleva a cabo con una cantidad de un 10 % a un 40 % en peso de MS, preferentemente de un 15 % a un 25 % en peso de MS.

15 Los ejemplos que siguen ilustran la invención sin limitar su alcance.

Ejemplo 1: Producción de un cóctel enzimático sobre glucosa (no de acuerdo con la invención)

20 La producción de un cóctel enzimático se efectúa en un reactor agitado mecánicamente. El medio mineral (denominado 4N) 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, licor de maíz 1,2 g/l, antiespumante 0,5 ml/l.

25 Precultivo líquido

El crecimiento del microorganismo (la cepa de *Trichoderma reesei* CL847) en precultivo se efectúa empleando la glucosa como sustrato carbonado de crecimiento, con una concentración de 30 g/l. El medio mineral del precultivo es el medio 4N al que se le ha añadido 5 g/l de ftalato potásico a fin de tamponar el pH. El crecimiento del inóculo dura 3 días y se efectúa a 30 °C en un incubador agitado. La transferencia al reactor se realiza si la concentración residual de glucosa es inferior a 15 g/l.

Etapa de crecimiento

35 El reactor que contiene el medio 4N se esteriliza a 120 °C durante 20 minutos. El sustrato carbonado de crecimiento de glucosa se esteriliza aparte a 120 °C durante 20 minutos y después se añade en condiciones estériles al reactor a fin de tener una concentración de 30 g/l. El reactor se inocula a un 10 % (v/v) con el precultivo líquido de la cepa de *Trichoderma reesei* CL847. Las condiciones de operación son una temperatura de 27 °C y un pH de 4,8 (ajustado con amoníaco 5,5 M). La aireación es de 0,5 vvm y la agitación se aumenta a una velocidad entre 200 y 800 r.p.m. en función de la pO₂ (presión de oxígeno disuelto), que se mantiene en un 30 %.

40 Etapa de producción

45 Cuando se ha agotado el sustrato carbonado de crecimiento del reactor, se inyecta el sustrato carbonado de producción de glucosa a 250 g/l de forma continua con un caudal de 35 mg por g de microorganismo y por hora hasta 164 horas. Las condiciones de operación son una temperatura de 25 °C y un pH de 4 (ajustado con amoníaco 5,5 M, aportando también este último el nitrógeno necesario para la síntesis de las proteínas excretadas). El contenido de oxígeno disuelto se mantiene al 30 % ajustando la agitación.

50 La producción del cóctel enzimático es controlada por el análisis de las proteínas extracelulares mediante el método de Lowry y el estándar BSA, tras la separación del micelio mediante filtración o centrifugación.

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

• Biomasa (g/l)	15,2
• Proteínas (g/l)	2,9
• q _p (mg/g/h)	1,2

55 siendo q_p la velocidad específica de producción del cóctel enzimático.

Ejemplo 2: Producción de enzimas sobre lactosa (no de acuerdo con la invención)

60 La producción del cóctel enzimático se efectúa en las mismas condiciones que en el Ejemplo 1. El sustrato carbonado de crecimiento y de producción es lactosa pura. La lactosa es un inductor importante de la producción del cóctel enzimático.

ES 2 717 671 T3

Después de 30 horas de crecimiento, una vez agotado el sustrato carbonado de crecimiento, se inyecta la solución de cultivo discontinuo a 250 g/l de forma continua con un caudal de 35 mg por g de microorganismo y por hora hasta 164 horas.

5 Las determinaciones analíticas sobre el mosto final dan los siguientes resultados:

• Biomasa (g/l)	13,5
• Proteínas (g/l)	37,8
• q_p (mg/g/h)	17

La inducción de la producción del cóctel enzimático por la lactosa se puede observar claramente (concentración de proteínas y q_p elevada).

10

Ejemplo 3: Efecto inductor del residuo sólido y de diferentes sustratos carbonados

El estudio del efecto inductor de diferentes sustratos carbonados se efectúa en matraces a partir de un mismo precultivo. Se efectúa por duplicado y los sustratos carbonados de producción empleados son: La glucosa (represor de la producción del cóctel enzimático), la lactosa (inductor), la celulosa (inductor), el residuo sólido de hidrolizado con dos concentraciones diferentes. El residuo sólido se obtiene a partir de una hidrólisis parcial (70 %) de una paja de trigo pretratada mediante explosión de vapor en condiciones ácidas. Este residuo se ha lavado y comprimido a un 30 % de MS. Su composición es la siguiente: 19 % de celulosa, 59 % de lignina, 2,9 % de hemicelulosas, 0,6 % de acetilos, 11 % de cenizas, 7,5 % nd (no determinado).

15

20

El crecimiento del hongo *T.reesei* en precultivo se realiza sobre glucosa, a una concentración de 10 g/l. El crecimiento del inóculo dura 3 días y se efectúa a 30 °C en un incubador Infors con agitación (150 r.p.m.) en dos matraces Fernbach con un volumen útil de 350 ml. Los dos matraces se mezclan al final del precultivo. La concentración residual de glucosa es de 0,3 g/l.

25

La composición de los matraces de detalla en la tabla 1. Estos se esterilizan antes de la inoculación:

Composición de los matraces	Control		residuo sólido (1 g)		residuo sólido (4 g)		glucosa		lactosa		celulosa	
	Matraz 0	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3	Matraz 4	Matraz 5	Matraz 6	Matraz 7	Matraz 8	Matraz 9	Matraz 10	
Medio salino 4N (ml)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Ftalato potásico (g)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Extracto de levadura (g)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Materias obtenidas de la hidrólisis H10 (g)	0	1	1	4	4	0	0	0	0	0	0	0
Glucosa, 200 g/l (ml)	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0
Lactosa 200 g/l (ml)	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0
Celulosa: Nutrafiber (g)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
Agua (ml)	25	25	25	25	25	20	20	20	20	25	25	25
Inoculación (ml)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

ES 2 717 671 T3

Los matraces se incuban en un incubador Infors a 30 °C y con agitación (150 r.p.m.). Las determinaciones analíticas sobre el mosto final (después de 94 h) dan los siguientes resultados:

	Concentración de proteínas	qp (mg/g/h)
Matraz 0	1,02	0,10
Matraz 1	1,95	3,92
Matraz 2	2,09	4,52
Matraz 3	2,52	6,31
Matraz 4	2,39	5,75
Matraz 5	0,97	-0,12
Matraz 6	0,97	-0,13
Matraz 7	3,02	8,35
Matraz 8	2,81	7,51
Matraz 9	2,47	6,10
Matraz 10	2,43	5,90

- 5 El control y los matraces que usan la glucosa tienen una concentración de 1 g/l que corresponde probablemente a la concentración del extracto de levadura. La qp media de estos matraces es de aproximadamente 0. El matraz con la lactosa alcanza una concentración de proteínas de 3 g/l. La concentración de proteínas con la celulosa y 4 g del residuo sólido es de 2,5 g/l. Esta es de 2 g/l con 1 g del residuo sólido. Este experimento demuestra la inducción por el residuo sólido de la producción del cóctel enzimático, a un nivel comparable al de la celulosa sola, y esto a pesar de la presencia de lignina.
- 10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de un cóctel enzimático con un microorganismo celulolítico que comprende dos etapas:
- 5
- una etapa a) de crecimiento de dicho microorganismo en presencia de al menos un sustrato carbonado de crecimiento en un reactor cerrado, efectuándose dicha etapa de crecimiento con una concentración de sustrato carbonado de crecimiento comprendida entre 10 y 90 g/l
 - una etapa b) de producción del cóctel enzimático en la que se alimenta al menos un sustrato carbonado inductor, siendo dicho sustrato carbonado inductor al menos un residuo sólido obtenido de la etapa de hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos que han sido sometidos a una etapa de pretratamiento, la parte de lignina en la parte sólida de dicho residuo sólido es de un 45 a un 80 % en peso, representando la parte sólida del residuo sólido entre un 10 y un 40 % de dicho residuo, efectuándose dicha etapa de producción con una concentración de sustrato carbonado de producción comprendida entre 150 y 400 g/l.
- 10
- 15
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicho residuo sólido se obtiene tras una hidrólisis enzimática parcial y se hidroliza de un 20 a un 70 % en peso de la celulosa de entrada a la etapa de hidrólisis.
- 20
3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 2 en el que la parte de celulosa en la parte sólida del residuo sólido es de un 10-50 % en peso, representando la parte sólida del residuo sólido entre un 10 y un 40 % de dicho residuo.
- 25
4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 en el que dicho residuo sólido se separa del efluente de la etapa de hidrólisis enzimática.
- 30
5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4 en el que dicho sustrato carbonado inductor se usa mezclado con al menos un sustrato carbonado diferente seleccionado entre azúcares inductores o no inductores.
- 35
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 en el que dicho sustrato carbonado diferente se selecciona entre la lactosa, la glucosa, el hidrolizado celulósico, el hidrolizado hemicelulósico, la celobiosa y la xilosa, usado solo o mezclado.
- 40
7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6 en el que dicho sustrato carbonado de producción contiene al menos un 5 % en peso de celulosa.
- 45
8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7 en el que el caudal específico de alimentación de sustrato carbonado de producción usado en dicha etapa b) de producción está comprendido entre 35 y 65 mg de sustrato carbonado por gramo de microorganismo y por hora.
- 50
9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 en el que dicha etapa de hidrólisis se inicia con de 1 a 60 mg de cóctel enzimático por gramo de celulosa en el material lignocelulósico que ha sido sometido a una etapa de pretratamiento.
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 en el que dicha etapa de hidrólisis se lleva a cabo con una cantidad de un 10 % a un 40 % en peso de MS.
11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 en el que el microorganismo celulolítico se selecciona entre las cepas de hongos que pertenecen a los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* o *Schizophyllum*.
12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 en el que el microorganismo celulolítico pertenece a la especie *Trichoderma reesei*.