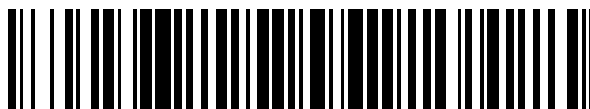


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 848**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C12P 7/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2010** **E 10196423 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019** **EP 2468877**

54 Título: **Proceso para la producción de enzimas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.03.2020

73 Titular/es:

NESTE OYJ (100.0%)
Keilaranta 21
02150 Espoo, FI

72 Inventor/es:

MALM, ANNIKA;
LAAKSO, SIMO;
PASTINEN, OSSI;
KAHELIN, HEIDI y
MUJUNEN, MIIA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 748 848 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

Proceso para la producción de enzimas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un proceso para la producción de enzimas. En particular, la presente invención se refiere a un proceso para la producción de enzimas en un proceso de aceite unicelular y la utilización de las enzimas en el mismo u otros procesos.

10

Antecedentes

Determinados microorganismos son capaces de acumular triacilglicerol intracelular, aceite unicelular, en condiciones fisiológicas adecuadas. Esta propiedad se ha utilizado para la producción de aceites unicelulares principalmente para uso especializado y productos de alto valor, tales como cosméticos y aplicaciones nutricionales. Hasta la fecha, la necesidad de aceites unicelulares para estos fines se ha satisfecho mediante procesos de producción a escala baja o moderada en los que la economía de proceso y la sostenibilidad de la producción no han desempeñado un papel importante.

15

20

En la actualidad, existe un interés creciente por el uso de materias primas no fósiles como alternativas a las fósiles como precursores del combustible para el transporte. El principal reto parece ser que la producción de aceite unicelular se debe llevar a cabo a tal gran escala que los problemas típicos de los procesos microbianos acuosos a gran escala sean evitables. De manera característica, un proceso de producción de aceite unicelular requiere una alta entrada de energía y produce grandes corrientes acuosas secundarias y residuos unicelulares. Por tanto, la tecnología actual para procesos microbianos acuosos a muy gran escala no parece económicamente factible e incluye varios problemas con respecto a cuestiones medioambientales.

25

30

Los carbohidratos son la única reserva más rica de biomasa en la tierra y, por tanto, el único sustrato realista para la producción de aceite unicelular a gran escala. Las lignocelulosas son la fuente más abundante de carbohidratos en la tierra. Sin embargo, los biomateriales lignocelulósicos u otros compuestos requieren un procesamiento extenso para ponerlos a disposición de los microorganismos como nutrientes y como fuente de aceite unicelular. De manera concomitante con el procesamiento de biomasa lignocelulósica, surgirán corrientes secundarias no fermentables, tales como lignina. Por otro lado, el proceso de producción de aceite unicelular en sí mismo produce masas celulares y corrientes secundarias, que todavía contienen una buena cantidad de nutrientes.

35

40

La reutilización de las corrientes secundarias de diversos procesos de fermentación y la mejora de la economía general de proceso se ha sugerido en algunas publicaciones en la técnica anterior. Las corrientes secundarias cuantitativamente dominantes de la producción de aceite unicelular son las aguas residuales de fermentación y los residuos celulares que quedan después de la retirada del aceite de las células. El documento US 2009/0064567 A1 desvela la producción de aceites biológicos por fermentación heterótrofa mediante el cultivo de microorganismos del reino *Stramenopile*. La publicación sugiere el reciclaje de la biomasa deslipidada o la biomasa hidrolizada a los medios usados para el cultivo del microorganismo.

45

50

Algunos microorganismos que producen aceites son capaces de sintetizar simultáneamente otras biomoléculas, tales como enzimas, por ejemplo, algunos hongos endofíticos aislados de plantas oleaginosas producen una acumulación de aceite microbiano y secretan celulasa (Peng Xiao-Wei y col. 2007. *Annals of Microbiology*, 57 (2): 239-242). El *Aspergillus oryzae* A-4 en fermentación en estado sólido es capaz de secretar celulasa durante el proceso de acumulación de lípidos, usando desechos celulósicos como sustratos de fermentación (Lin Hui y col., 2010. *Bioresource Technology*, 101 (19): 7556-7562). El *Mucor circillenioides* y el *M. racemosus* producen lipasa y lípidos de manera simultánea, aunque solo se secretan pequeñas cantidades de lipasa extracelular (Szczesna-Antczak M y l., 2006. *Enzyme and Microbial Technology*, 39 (6): 1214-1222). Sin embargo, ninguna de dichas publicaciones sugiere recuperar tanto las enzimas como el aceite microbiano.

Sumario

55

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una solución a los problemas encontrados en la técnica anterior. De manera específica, la presente invención tiene como objetivo proporcionar una solución técnicamente beneficiosa a los problemas encontrados en la producción a gran escala de aceite unicelular.

60

En particular, un objetivo de la presente invención es proporcionar una solución, que permita mejorar la economía de la producción de aceite unicelular a gran escala.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una solución, que permita reducir la carga medioambiental causada por la producción de aceite unicelular a gran escala.

65

La presente invención tiene como objetivo, en particular, resolver problemas relacionados con la fabricación de

biocombustibles para el transporte.

A fin de lograr estos objetos, la invención se caracteriza por las características que se incluyen en las reivindicaciones independientes. Otras reivindicaciones representan las realizaciones preferidas de la invención.

5 El método de acuerdo con la invención se basa en el hallazgo de que las corrientes secundarias del proceso de producción de aceite unicelular comprenden una cantidad significativa de nutrientes, que puede servir como fuente de carbono para microorganismos, por ejemplo, para microorganismos productores de aceite.

10 Actualmente, se ha hallado de manera sorprendente que las corrientes secundarias del proceso de producción de aceite unicelular comprenden también una cantidad significativa de proteínas, en particular, enzimas. Por tanto, el cultivo de microorganismos o sus fracciones se pueden usar como fuente de enzimas o como preparaciones enzimáticas o como componentes de preparaciones enzimáticas.

15 La presente invención proporciona un proceso para la producción de enzimas, que comprende que un microorganismo capaz de producir tanto aceite unicelular (lípidos) como enzimas se cultiva en condiciones adecuadas para la producción de lípidos y adecuadas para la producción de enzimas y que dicho microorganismo produce aceite unicelular (lípidos) y enzimas, en el que el agua de proceso liberada del proceso tiene una demanda biológica de oxígeno al menos el 5 % menor que un agua de proceso de un proceso unicelular sin recuperación enzimática.

20 En una realización de la invención, se recupera el cultivo de microorganismos que comprende células de microorganismos y un medio de cultivo gastado.

25 En otra realización de la invención, el sobrenadante y/o las células de microorganismos se separan del cultivo de microorganismos y se recuperan el sobrenadante y/o las células.

30 No obstante, en otra realización de la invención, la fracción de proteínas se enriquece en el cultivo de microorganismos o en el sobrenadante y se recupera la fracción de proteínas enriquecida. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la concentración de la fase acuosa (caldo de cultivo) del cultivo de microorganismos o el sobrenadante.

35 No obstante, en otro aspecto, las enzimas intracelulares producidas mediante los microorganismos se pueden recuperar de las células mediante autólisis o lisis inducida de las células. Las enzimas liberadas de las células se pueden cosechar del sobrenadante. De acuerdo con una realización preferida de la invención, las enzimas se recuperan del sobrenadante. Las enzimas excretadas en el medio de cultivo o liberadas mediante lisis celular son extracelulares y se pueden recuperar del sobrenadante.

40 De acuerdo con un aspecto adicional, el medio de cultivo es sólido o semisólido y las enzimas se introducen en una fase acuosa a partir de la que se recuperan.

En diversas realizaciones de la invención, las enzimas se recuperan del cultivo de microorganismos o sus fracciones en forma catalíticamente activa.

45 En una realización de la invención, el cultivo de microorganismos o la fase líquida que comprende enzimas catalíticamente activas se introduce en el mismo proceso biotécnico o la carga de alimentación, tal como biomasa polimérica, usada en dicho proceso se somete a tratamiento previo con dichas enzimas.

50 En otra realización de la invención, el cultivo de microorganismos o la fase líquida que comprende enzimas catalíticamente activas se introduce en otro proceso o la carga de alimentación, tal como biomasa polimérica, usada en dicho proceso se somete a tratamiento previo.

55 En un aspecto adicional, el cultivo de microorganismos o la fase líquida que comprende enzimas producidas mediante el microorganismo se introduce en un proceso biotécnico, que usa un microorganismo que no es capaz de producir enzimas, o la carga de alimentación, tal como biomasa polimérica, usada en dicho proceso se somete a tratamiento previo.

60 El mismo u otro proceso es preferentemente un proceso de producción de aceite unicelular. De acuerdo con una realización de la invención, el proceso es un proceso que usa biomasa polimérica y/o azúcares poliméricos, tales como lignocelulosa, como carga de alimentación.

65 En otra realización, una fracción enriquecida de proteínas del cultivo de microorganismos o sobrenadante se introduce en otro proceso industrial o se usa para someter a tratamiento la carga de alimentación alimentada a otro proceso industrial.

En otra realización, una fracción enriquecida de proteínas del cultivo de microorganismos o sobrenadante se

introduce en otro proceso biotécnico o se usa para someter a tratamiento la carga de alimentación, tal como biomasa polimérica y/o azúcares poliméricos alimentados al otro proceso biotécnico.

En una realización adicional de la invención, la fracción de proteínas en el cultivo de microorganismos o en el sobrenadante se enriquece, recupera y, opcionalmente, purifica, estabiliza, seca y/o formula y usa como preparación enzimática o como fuente de enzimas en diversas aplicaciones.

En un aspecto adicional, las enzimas son intracelulares y se obtienen de las células. Las enzimas intracelulares se pueden recuperar y, opcionalmente, enriquecer, purificar, aislar, estabilizar, secar y/o formular.

La principal ventaja de la producción de aceite unicelular y enzimas es que la rentabilidad de la producción de aceite unicelular y los hechos medioambientales asociados a las corrientes secundarias de proceso se tienen en cuenta en el contexto de la producción de aceite unicelular a gran escala. Asimismo, el proceso integrado da como resultado una utilización más eficaz de las biomásas poliméricas, al tiempo que reduce la demanda biológica de oxígeno de las corrientes secundarias típicas de los procesos de fermentación acuosa.

La presente invención proporciona varias ventajas económicas y medioambientales:

- El coste energético del tratamiento de materiales lignocelulósicos o materiales que comprenden otra biomasa de carbohidratos polimérica se reduce mediante el uso de enzimas del proceso de aceite unicelular en sí mismo en lugar de enzimas comerciales y tratamientos termomecánicos y químicos.
- La retirada de las proteínas enzimáticas del resto de los licores de la fermentación de producción de aceite unicelular reduce la carga de consumo de oxígeno biológico del licor de fermentación liberado de la producción de aceite unicelular.
- Después de la retirada del material celular, el licor de desechos de fermentación esencialmente libre de células es más adecuado para su reuso.
- El resto de carbono de un proceso de aceite unicelular se mejora cuando las proteínas enzimáticas, en lugar de causar carga biológica en las corrientes de proceso, se reducen o retiran de las aguas residuales de fermentación, reusadas con fines catalíticos o usadas como nutriente en el proceso de producción de aceite unicelular u otros procesos industriales o, en particular, biotécnicos.
- Las enzimas recuperadas del licor de fermentación se pueden usar para la hidrólisis de compuestos poliméricos de microorganismos o componentes de microorganismos.
- El método de acuerdo con la invención se puede implementar mediante el uso de operaciones de unidad conocidas y sometidas a ensayo y especies de microorganismos aplicables a nivel industrial.
- La invención contribuye a la utilidad económica y técnica del material lignocelulósico para la producción de aceite unicelular.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1 Esquema de proceso

Fig. 2 Xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

Fig. 3 Xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

Fig. 4 Xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

Fig. 5 Xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

Fig. 6 Glucosa liberada en ensayos de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usó 1 g de celulosa.

Fig. 7 Glucosa liberada en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usó 1 g de celulosa.

Fig. 8 Xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

Fig. 9 Xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

5 Fig. 10 Glucosa liberada en ensayos de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usó 1 g de celulosa. Se liberó algo de xilosa a partir de la hemicelulosa procedente del caldo de cultivo usado.

Fig. 11 Glucosa liberada en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usó 1 g de celulosa. Se liberó algo de xilosa a partir de la hemicelulosa procedente del caldo de cultivo usado.

10 Fig. 12 Xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

15 Fig. 13 Xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

Fig. 14 Glucosa liberada en ensayos de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usó 1 g de celulosa. Se liberó algo de xilosa a partir de la hemicelulosa procedente del caldo de cultivo usado.

20 Fig. 15 Glucosa liberada en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usó 1 g de celulosa. Se liberó algo de xilosa a partir de la hemicelulosa procedente del caldo de cultivo usado.

Descripción de la invención

25 Un "proceso de producción de aceite unicelular" se refiere, en el presente documento, a un proceso, que comprende las etapas de formar o permitir la formación de un microorganismo sintetizador de lípidos y permitir que la masa de organismo así obtenida produzca y/o almacene (acumule) lípidos, recuperar las células de la fase líquida y extraer o recuperar los lípidos de las células. Tal como se describe en el presente documento más adelante, en diversos grupos de microorganismos, tales como entre las bacterias, las arqueobacterias, los hongos (hongos filamentosos),
30 la levadura y las algas son microorganismos productores de aceite unicelular.

Tal como se describe en el presente documento, la presente invención usa microorganismos capaces de producir tanto lípidos como enzimas. Un "microorganismo" se refiere, en algunas realizaciones de la invención, a dos o más microorganismos. En algunos aspectos, las enzimas se pueden producir mediante un microorganismo y el aceite unicelular (lípidos) mediante otro microorganismo.

La expresión "aceite unicelular" se refiere a una sustancia grasa, cuya molécula, en general, contiene, como parte, una cadena de hidrocarburo alifática, que se disuelve en disolventes orgánicos no polares, pero es poco soluble en agua. Los aceites unicelulares son un grupo esencial de moléculas grandes en las células vivas. Los aceites
40 unicelulares son, por ejemplo, los lípidos, las grasas, las ceras, los ésteres de cera, los esteroides, los terpenoides, los isoprenoides, los carotenoides, los polihidroxicarboxilatos, los ácidos nucleicos, los ácidos grasos, los alcoholes grasos, los aldehídos grasos, los ésteres de ácidos grasos, los fosfolípidos, los glicolípidos, los esfingolípidos y los acilglicerol, tales como los triacilglicerol, los diacilglicerol o los monoacilglicerol.

45 Los aceites unicelulares preferidos en la presente invención son los lípidos, las grasas, las ceras, los acilglicerol y los ácidos grasos y sus derivados, en particular, los triacilglicerol y los ésteres de cera.

En relación con la presente invención, el término "lípidos" se usa como sinónimo de aceite unicelular.

50 En un aspecto, la presente invención proporciona un proceso para la producción de enzimas, que comprende que un microorganismo capaz de producir tanto lípidos como enzimas se cultiva en condiciones adecuadas para la producción de lípidos y para la producción de enzimas en un proceso de producción de aceite unicelular. Se permite que los microorganismos produzcan lípidos y enzimas. El aceite unicelular (lípidos) se recupera de las células de microorganismos y el cultivo de microorganismos y/o medio de cultivo o una parte de este o diversas fracciones del
55 cultivo de microorganismos y/o medio de cultivo se usan como preparación enzimática o como fuente de enzimas.

En una realización de la invención, al menos parte del cultivo de microorganismos que comprende células de microorganismos y medio de cultivo gastado se usa como preparación enzimática o como fuente de enzimas.

60 En una realización de la invención, el cultivo de microorganismos o parte del mismo o el sobrenadante o parte del mismo se recircula en el proceso de aceite unicelular. De manera típica, del 10 al 90 %, preferentemente del 20 % al 80 %, en algunos aspectos, del 30 % al 70 %, en algunos aspectos, del 40 % al 60 %, en algunos aspectos, del 20 % al 50 %, del cultivo de microorganismos o del sobrenadante se recircula en el proceso, preferentemente se recircula de nuevo al proceso de producción de aceite unicelular o al tratamiento de carga de alimentación.

65 En otra realización, el sobrenadante y/o las células de microorganismos se separan del cultivo de microorganismos y

se usan como preparación enzimática o como fuente de enzimas.

El sobrenadante representa una fracción sustancialmente libre de células, que comprende el medio de cultivo gastado o el caldo de cultivo. El sobrenadante se puede denominar también "líquido de fermentación" o "fase líquida".

El sobrenadante y las células no necesitan separarse por completo. En algunos aspectos, el sobrenadante comprende del 1 % al 50 % de las células del cultivo de microorganismos original. En algunos aspectos, el sobrenadante comprende del 5 al 40 %, en algunos aspectos, del 5 al 30 %, en algunos aspectos, del 10 al 40 %, o del 20 al 30 % o del 40 al 50 % de las células del cultivo de microorganismos original.

En algunos aspectos, la fracción celular comprende del 1 % al 50 % de las células del cultivo de microorganismos original. En algunos aspectos, la fracción celular comprende del 5 al 40 %, en algunas realizaciones, del 5 al 30 %, en algunos aspectos, del 10 al 40 %, o del 20 al 30 % o del 40 al 50 % de las células del cultivo de microorganismos original.

La separación del sobrenadante y las células se puede realizar mediante cualquier método adecuado que mantenga la actividad catalítica de las enzimas.

Un método preferido para la recuperación de enzimas es un método mediante el que el cultivo de microorganismos, el sobrenadante o cualquier combinación de los mismos se puede someter a tratamiento por parte de una persona experta en la materia para lograr la recuperación de las enzimas, al tiempo que se mantiene su actividad catalítica.

Las enzimas se pueden recuperar del cultivo de microorganismos, el medio de cultivo gastado, el sobrenadante y las células de microorganismos mediante cualquier método conocido y adecuado. Se aplica lo mismo también a los métodos mediante los que las enzimas se pueden separar en fracciones con las actividades enzimáticas deseadas.

Un método mediante el que el cultivo de microorganismos o el sobrenadante o la fracción enriquecida de proteínas que comprende enzima/s catalíticamente activa/s se recuperan se puede basar en su tamaño molecular, comportamiento iónico, solubilidad en agua, solubilidad en diferentes solutos o solubilidad en solutos de mezcla que contienen un factor de tampón o un factor de superficie activa o un compuesto de superficie activa o una sal.

Las enzimas se pueden recuperar del medio de cultivo mediante diversos procedimientos, incluyendo, pero sin limitación, procedimientos, tales como centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

Si es necesario, las enzimas se pueden purificar o aislar mediante diversos procedimientos, incluyendo, pero sin limitación, cromatografía, procedimientos electroforéticos, solubilidad diferencial, SDS-PAGE o extracción.

Las enzimas se pueden estabilizar, por ejemplo, con sal, azúcar o glicerol.

Asimismo, las enzimas se pueden formular para la aplicación deseada.

Se pueden aplicar los métodos correspondientes cuando se recuperan enzimas de las células de microorganismos.

En una realización, la fracción de proteínas se recupera de las células de microorganismos. La recuperación se puede realizar mediante cualquier método adecuado que mantenga la actividad catalítica de las enzimas.

La "recuperación de lípidos" se refiere a un proceso, en el que el lípido (lípido intracelular) se recupera mediante métodos mecánicos, químicos, bioquímicos, termomecánicos o autocatalíticos o mediante una combinación de estos métodos de las células de microorganismos.

El aceite unicelular representa, de manera típica, un lípido intracelular que se ha sintetizado de manera intracelular mediante un microorganismo, los lípidos excretados mediante la célula, así como los lípidos presentes en las partes estructurales de una célula, tales como en los sistemas de membrana. En determinados casos, el aceite unicelular también puede ser extracelular, tal como excretado o liberado de las células en el medio de cultivo durante o después del cultivo.

La "masa celular residual" representa una fracción de material sólido, semisólido o de flujo, que contiene microorganismos sometidos a tratamiento para la recuperación de lípidos intracelulares y/o enzimas intracelulares.

La "masa unicelular que contiene lípidos" representa una masa unicelular formada de manera autótrofa, heterótrofa y/o mixótrofa y un micelio celular con un contenido de lípidos de al menos el 3 %, preferentemente de al menos el 10 %, preferentemente de al menos el 15 % (p/p) o más de materia seca del microorganismo.

La preparación enzimática obtenida tal como se describe en el presente documento es el cultivo de microorganismos

o el sobrenadante o la fracción enriquecida de proteínas que comprende la enzima catalíticamente activa. De manera típica, la preparación enzimática es el agua de proceso (fase acuosa, caldo de cultivo, sobrenadante) de un proceso de producción de aceite unicelular o la fracción enriquecida de proteínas de un agua de proceso (fase acuosa, caldo de cultivo, sobrenadante). El enriquecimiento se puede llevar a cabo mediante cualquier método adecuado usado para el enriquecimiento o la concentración de proteínas en una forma biológicamente activa.

En un aspecto, el medio de cultivo es sólido o semisólido y las enzimas se introducen en la fase acuosa antes de la recuperación.

El "enriquecimiento de una fracción de proteínas" se refiere en el presente documento a cualquier método que enriquezca las proteínas de cualquier fracción del proceso de producción de aceite unicelular y que mantenga la actividad catalítica de las proteínas. De manera más específica, el método comprende que la fase líquida del cultivo de microorganismos o sobrenadante de un proceso de producción de aceite unicelular se somete a tratamiento mediante al menos un método que enriquece las proteínas en la fase líquida. En alguna realización de la invención, el proceso de enriquecimiento no resulta necesario.

En algún aspecto, la fracción de proteínas se enriquece al menos el 10 %, de manera típica, al menos el 20 %, en diversas realizaciones, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, en comparación con la fase líquida original. Los ejemplos de métodos adecuados son métodos basados en las propiedades iónicas de las proteínas, el tamaño molecular, la solubilidad, las propiedades de superficie activa o las interacciones hidrófobas. Preferentemente, la recuperación de la fracción enzimática se lleva a cabo en condiciones en las que la temperatura es de 70 °C o inferior.

En una realización de la invención, la fracción de proteínas se enriquece en la fase acuosa del cultivo de microorganismos o en el sobrenadante. El enriquecimiento se puede llevar a cabo de manera simple, por ejemplo, mediante la concentración de la fase acuosa del cultivo de microorganismos o el sobrenadante.

En un aspecto, la fracción de proteínas en la fase acuosa del cultivo de microorganismos o en el sobrenadante se enriquece al menos 1 vez (1x), de manera típica, al menos 2 veces (2x), preferentemente al menos 3 veces (3x), calculado como actividad enzimática por volumen y/o actividad por proteína total. En algunos aspectos, la fracción de proteínas en la fase acuosa del cultivo de microorganismos o en el sobrenadante se enriquece al menos 5 veces, en algunos aspectos, al menos 10x, o 20x o 30x, o 40x, o 50x, o 60x, o 70x, u 80x, o 90x o 100x, calculado como actividad enzimática por volumen y/o por proteína total.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, las enzimas se recuperan del sobrenadante. Las "enzimas extracelulares" son enzimas excretadas en el medio de cultivo o liberadas mediante lisis celular de las células al medio de cultivo. Las enzimas extracelulares se pueden recuperar del sobrenadante.

Mediante la expresión "agua de proceso" liberada del proceso de aceite unicelular se entiende en el presente documento el agua liberada del proceso después de la recuperación enzimática. Parte del agua de proceso se puede circular de nuevo al proceso y parte del agua de proceso se puede circular o conducir a otro proceso y parte se puede liberar al entorno. El agua de proceso también se puede conducir a un proceso de tratamiento de aguas residuales antes de liberarse al entorno.

En un aspecto, de manera típica, del 10 % al 90 %, preferentemente del 20 % al 80 %, en algunas realizaciones, del 30 % al 70 %, en algunos aspectos, del 40 % al 60 %, en algunos aspectos, del 20 % al 50 %, del agua de proceso se recircula en el proceso, preferentemente se recircula de nuevo al proceso de producción de aceite unicelular o al tratamiento de carga de alimentación.

En un aspecto, el agua de proceso liberada del proceso contiene al menos el 5 %, al menos el 10 %, preferentemente al menos el 20 %, de manera típica, al menos el 30 %, más preferentemente al menos el 40 %, todavía más preferentemente al menos el 50 %, todavía más preferentemente al menos el 60 %, todavía más preferentemente al menos el 70 %, todavía más preferentemente al menos el 80 %, todavía más preferentemente al menos el 90 % menos de proteínas que el agua de proceso de un proceso de aceite unicelular sin recuperación enzimática.

En una realización de la invención, el agua de proceso liberada del proceso tiene al menos el 5 %, al menos el 10 %, preferentemente al menos el 20 %, de manera típica, al menos el 30 %, más preferentemente al menos el 40 %, todavía más preferentemente al menos el 50 %, todavía más preferentemente al menos el 60 %, todavía más preferentemente al menos el 70 %, todavía más preferentemente al menos el 80 %, todavía más preferentemente al menos el 90 % menos de demanda biológica de oxígeno en comparación con la demanda biológica de oxígeno de un agua de proceso de un proceso de aceite unicelular sin recuperación enzimática.

En un aspecto, las enzimas son intracelulares y se obtienen de las células de microorganismos.

En un aspecto, los residuos celulares después de la recuperación enzimática contienen al menos el 1 %, al menos el

5 %, al menos el 10 %, preferentemente al menos el 20 % menos de proteínas que los residuos celulares de un proceso de aceite unicelular sin recuperación enzimática de las células.

5 En algunos aspectos, los residuos celulares después de la recuperación enzimática contienen al menos al menos el 30 %, preferentemente al menos el 40 %, preferentemente al menos el 50 %, preferentemente al menos el 60 %, preferentemente al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % menos de proteínas que los residuos celulares de un proceso de aceite unicelular sin recuperación enzimática de las células.

10 En un aspecto, la producción de enzimas y la producción de aceite unicelular se producen de manera simultánea o secuencial en cualquier orden. De manera típica, la producción de enzimas se inicia antes. La enzima producida degrada la biomasa polimérica en el medio de cultivo produciendo de este modo componentes para el crecimiento del microorganismo.

15 La "enzima" se refiere en el presente documento a cualquier enzima y no se limita a ninguna enzima o grupo enzimático específicos. En una realización, una enzima se refiere a una enzima que tiene un efecto sobre proteínas y carbohidratos complejos. La "enzima" se refiere preferentemente a hidrolasas (EC 3.x.x.), oxidorreductasas (EC 1.x.x.), liasas (EC 4.x.x.), isomerasas (EC 5.x.x.), transferasas (EC 2.x.x.) y ligasas (EC 6.x.x.). El primer número significa el grupo enzimático, la primera x significa el tipo de enlace y la segunda x se refiere a la reacción específica.

20 Mediante el término "enzima" se entiende en la presente invención, en particular, una enzima extracelular capaz de degradar carbohidratos, proteínas y lípidos complejos. De manera más específica, la enzima es una enzima hidrolítica que introduce agua en un grupo funcional del producto de reacción y, de este modo, degrada un enlace glicosídico, péptido, éster o éter o un enlace entre nitrógeno y carbono o nitrógeno y oxígeno. La enzima es preferentemente una celulasa, xilanasas, glucosidasas, mananasas, galactasas, arabinasas, pectinasas, proteasa, lipasa, fosfolipasa, isomerasa o esterasa. Una enzima hidrolítica se refiere en el presente documento a una enzima capaz de reaccionar hidrolíticamente, es decir, capaz de transferir grupos funcionales al agua. Preferentemente, las enzimas se seleccionan del grupo de celulasas, hemicelulasas, xilanasas, glucosidasas, galactosidasas o mananasas.

30 En algunas realizaciones, la enzima es una oxidorreductasa que cataliza las reacciones de oxidación-reducción, una liasa que cataliza la adición o retirada de grupos para formar enlaces dobles, una isomerasa que cataliza la transferencia de grupos intramoleculares o una ligasa que cataliza el ligamiento de dos sustratos a expensas de la hidrólisis de ATP.

35 La "celulasa" o "enzima celulolítica" se refiere a un grupo de enzimas producidas principalmente mediante hongos, tales como hongos filamentosos, o levaduras, bacterias, plantas de animales que catalizan la hidrólisis de la celulosa, también denominada celulólisis. Se conocen varios tipos diferentes de celulasas, que difieren estructural y mecánicamente. En general, las celulasas incluyen, basándose en el tipo de reacción catalizada, endo-celulasas, exo-celulasas, celobiasas o beta-glucosidasas, celulasas oxidativas y celulosa fosforilasas. Estas enzimas se pueden hallar con los siguientes números de EC, tales como: EC 3.2.1.4, EC 3.2.1.91, EC 3.2.1.21.

45 La "hemicelulasa" se refiere a un grupo de enzimas producidas principalmente mediante hongos, tales como hongos filamentosos, o levaduras, bacterias, plantas de animales que catalizan la hidrólisis de la hemicelulosa. Por ejemplo, las enzimas implicadas en la hidrólisis de xilano incluyen endo-xilanasas, acetil-xilanoesterasas, α -D-glucuronidasas, α -L-arabinofuranosidasas, esterasas de ácido ferúlico y β -xilosidasas. Además, las enzimas implicadas en la hidrólisis del galactoglucomanano incluyen endomananasas, acetil-mananesterasas, α -galactosidasas, β -glucosidasas, β -manosidasas. Además, las enzimas implicadas en la hidrólisis del arabinogalactano incluyen la β -galactosidasa y la endo- α -L-arabinanasa. Estas enzimas se pueden hallar con los siguientes números de EC, tales como: EC 3.2.1.8, EC 3.2.1.37, EC 3.2.1.55, EC 3.2.1.99, EC 3.2.1.139, EC 3.2.1.78, EC 3.2.1.25, EC 3.2.1.22, EC 50 3.2.1.21, EC 3.2.1.89, EC 3.1.1.72, EC 3.1.1.6, EC 3.1.1.73.

La "hemicelulosa" se refiere a un grupo de carbohidratos complejos hallados en un material lignocelulósico que, con otros carbohidratos (por ejemplo, pectinas), rodean las fibras de celulosa de las células vegetales. La composición de las hemicelulosas depende del tipo de planta. Los tipos más comunes de hemicelulosas incluyen xilano, glucoronoxilano, glucomanano, galactoglucomanano, arabinoxilano, xiloglucano y arabinogalactano.

Los nutrientes suplementados en un medio de cultivo de microorganismos se refieren a compuestos y componentes que permiten el crecimiento de un microorganismo y/o la producción de lípidos o promueven el crecimiento y la producción de lípidos. Estos incluyen, de manera típica, diversas fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, sales inorgánicas y elementos de traza. El medio de cultivo se puede suplementar con fracciones naturales o artificiales, que contienen carbohidratos, preferentemente polímeros de carbohidratos que contienen azúcar de hexosa, azúcar de pentosa, uno cualquiera o ambos de los mismos, o fracciones, que contienen celulosa, almidón, polisacárido sin almidón, quitina o lignocelulosa. La suplementación de nutrientes en el medio de cultivo no es absolutamente necesaria, pero puede ser aconsejable en determinados casos.

Las condiciones de cultivo adecuadas para la producción de lípidos se refieren a condiciones en las que la formación

y/o acumulación de lípidos tiene lugar en respuesta a la composición de un medio de cultivo, condiciones de cultivo, un factor externo o ambos.

5 Las condiciones de cultivo adecuadas para la producción de enzimas se refieren a condiciones en las que la formación y acumulación de enzimas tiene lugar en respuesta a la composición de un medio de cultivo, condiciones de cultivo, un factor externo o ambos.

10 En una realización de la invención, la producción de enzimas se inicia y/o mantiene mediante la adición de un inductor de enzimas en el cultivo de microorganismos. En general, esto da como resultado una mayor cantidad de enzimas producidas. En particular, en cultivos continuos, resulta importante mantener la cantidad de inductores en un nivel suficiente para mantener la producción de enzimas extracelulares.

Las enzimas, tal como se describen en el presente documento, pueden ser inducibles o constitutivas.

15 La inducción de enzimas (inducibilidad de enzimas) se refiere al incremento en la síntesis *de novo* de enzimas mediante la presencia de un factor inductor.

20 De acuerdo con una realización preferida de la invención, un microorganismo capaz de usar compuestos poliméricos u oligoméricos extracelulares, tales como azúcares, como su nutrición, tales como fuentes de carbono y/o energía, se cultivan en un medio de cultivo que comprende biomasa polimérica que contiene estos compuestos. Se permite que el microorganismo produzca lípidos y enzimas.

25 Un "medio de cultivo" se refiere en el presente documento a un medio usado para el cultivo de microorganismos. El medio de cultivo comprende en el presente documento, por ejemplo, biomasa polimérica que contiene compuestos al menos parcialmente poliméricos u oligoméricos, tales como azúcares poliméricos. El medio de cultivo se puede suplementar con minerales, micronutrientes, macronutrientes y agentes de tampón.

30 Una carga de alimentación preferida en algunas realizaciones de la invención es la biomasa polimérica que comprende lignocelulosa, celulosa, hemicelulosa o lignina u otros componentes del almidón de lignocelulosa, como tal o como una combinación, o biomasa sometida a tratamiento químico o físico o mediante su combinación con el fin de mejorar el acceso de las enzimas a los polímeros de azúcar. La biomasa polimérica también comprende componentes que están, de manera típica, presentes en organismos unicelulares.

35 La biomasa sometida a tratamiento previo es, por ejemplo, una biomasa que comprende azúcares de pentosa y/o hexosa o sus derivados. Las biomásas se pueden someter a tratamiento antes o después del tratamiento enzimático mediante medios químicos, físicos, termomecánicos o biológicos o mediante cualquier combinación de los mismos y se pueden usar posteriormente para la producción de aceite unicelular.

40 La "biomasa polimérica" se refiere a material orgánico natural o material orgánico sometido a tratamiento mediante diferentes métodos químicos o físicos o mediante su combinación. Mediante la expresión biomasa polimérica se entiende en el presente documento, por ejemplo, la biomasa usada como carga de alimentación en un proceso biotécnico, tal como en un proceso de aceite unicelular. La biomasa polimérica también puede ser un producto industrial o una corriente secundaria de un proceso industrial, tal como una fracción que contiene hemicelulosa o celulosa, almidón, biomasa que contiene almidón, polisacárido sin almidón, quitina, ácido poligalacturónico, pectina, 45 proteína, un microorganismo o residuo de un microorganismo.

En un aspecto, la biomasa es un microorganismo, tal como levadura, bacteria, moho o algas o un componente de los mismos o una corriente secundaria de un proceso industrial que comprende estos microorganismos.

50 De manera más específica, en la presente invención se ha hallado que el proceso de producción de aceite unicelular se puede dirigir a la producción o la producción potenciada de enzimas, por ejemplo, enzimas hidrolíticas.

55 En un aspecto, la biomasa polimérica se somete a tratamiento mediante enzimas obtenidas en el proceso y los productos comprenden carbohidratos monoméricos, diméricos, oligoméricos y/o componentes no degradados que inducen o mantienen la producción enzimática.

60 El "material lignocelulósico" o la "biomasa lignocelulósica" se refiere a la biomasa que se compone de celulosa, hemicelulosa y/o lignina o cualquier fracción de las mismas. Los materiales lignocelulósicos incluyen, pero sin limitación, plantas leñosas o plantas herbáceas no leñosas u otros materiales que contengan celulosa y/o hemicelulosa: los materiales pueden ser residuos agrícolas (tales como paja de trigo, paja de arroz, tamo, cáscaras, rastrojo de maíz, bagazo de caña de azúcar), cultivos energéticos dedicados (tales como pasto varilla, *Miscanthus*, hierba cinta, sauce, jacinto de agua), materiales o residuos de madera (incluyendo aserrín y pasta y/o residuos o fracciones de fábricas de papel, tales como hemicelulosa, licor de sulfito gastado, fibra residual y/o lodo primario), musgo o turba, microorganismos o residuos de papel municipal. También se pueden usar materiales de bajo 65 contenido de lignina, materiales tales como biomasa de macroalgas o microalgas. Además, los materiales pueden ser también fracciones de hemicelulosa o celulosa de prácticas industriales. La invención puede utilizar cualquier tipo

de fracción de celulosa. Las materias primas o determinadas fracciones, tales como hemicelulosa y/o celulosa, de materias primas de diferentes orígenes, especies vegetales o procesos industriales se pueden mezclar en conjunto y usar como materias primas para los bioprocesos de acuerdo con la invención.

- 5 La "sacarificación" se refiere a la hidrólisis de azúcares poliméricos a oligómeros y monómeros de azúcar. La sacarificación se logra, de manera típica, mediante el uso de enzimas capaces de hidrolizar azúcares poliméricos.

Los "carbohidratos" representan moléculas orgánicas, que incorporan un grupo aldehído, ácido o ceto y, además de estos, varios grupos hidroxilo. Por tanto, la gama de hidrocarburos abarca compuestos descritos mediante términos, 10 tales como monosacárido, oligosacárido, azúcar, celulosa, hemicelulosas, almidón e hidrocarburo sin almidón.

La "celulosa" es un polisacárido de cadena larga, que tiene una estructura primaria que consiste en un polímero creado mediante enlaces de β -1-4 glucosa.

- 15 El "almidón" es un polisacárido de cadena larga, que consiste principalmente en unidades de α -1-4 y α -1-6 glucosa.

El monosacárido es una unidad monomérica de carbohidratos, $(C-H_2O)_n$, que, de manera típica, consiste en 3-9 átomos de carbono y que tiene inconsistencias estereoquímicas en uno o más átomos de carbono. Estos se representan mediante hexosas, tales como glucosa, galactosa, manosa, fructosa, que tienen 6 átomos de carbono, y 20 pentosas, tales como xilosa, ribosa y arabinosa, que tienen 5 átomos de carbono.

La celulosa no se disuelve de manera típica en agua en la naturaleza. Las celulasas incluyen endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. Por ejemplo, las endoglucanasas (EC 3.2.1.4), operadas principalmente en la parte amorfa de celulosa, atacan de manera aleatoria los estancos internos de la macromolécula de celulosa. Los exo- 25 glucanasas o celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) atacan al final de la cadena de celulosa que hidroliza principalmente una unidad de celobiosa a la vez. Las exoglucanasas también son capaces de hidrolizar un polímero de celulosa cristalino. Finalmente, la hidrólisis de la celobiosa a monómeros de glucosa se realiza mediante β -glucosidasa (EC 3.2.1.21).

30 Las enzimas capaces de hidrolizar hemicelulosa son, por ejemplo, las endoxilanasas, las endoarabinasas y las endomananasas. Las hemicelulasas que atacan los oligómeros después de la operación de las endohemicelulasas son, por ejemplo, la β -xilosidasa, la β -arabinosidasa, la β -manosidasa y la β -glucosidasa. Los enlaces secundarios residuales en los oligómeros se pueden descomponer mediante enzimas, tales como α -glucuronidasa, α -arabinodasa y α -D-galactosidasa. Los constituyentes de acetilo se pueden retirar mediante esterasas.

35 Adicionalmente, la hidrólisis enzimática de la lignina requiere la actividad de enzimas oxidativas, tales como lignina peroxidasa (LiP EC 1.11.1.14), peroxidasa dependiente de manganeso (MnP EC 1.11.1.13) y lacasa (EC 1.10.3.2). La estructura química y la unión de la lignina a la celulosa y la hemicelulosa son más importantes que la cantidad de lignina.

40 Las corrientes secundarias o fracciones de corrientes secundarias representan cualquier solución acuosa o sobrenadante que se libera de la producción de células, la producción de enzimas, la producción de aceite unicelular, la recuperación de células o la extracción de aceite, la recuperación de enzimas intracelulares y una mezcla de extracción posterior de lípidos de células variablemente rotas e intactas, es decir, una masa celular 45 residual o suspensión celular o masa celular.

El proceso de producción de aceite unicelular, tal como se describe en el presente documento, puede ser un proceso continuo, discontinuo o de alimentación por lotes o cualquier otro conjunto de procesos destinado a la producción de aceite unicelular.

50 El proceso de producción de aceite unicelular se puede llevar a cabo también en reactores, en los que la cantidad de agua libre es baja o en los que la producción se lleva a cabo sobre una superficie sólida o semisólida. La masa celular u otra biomasa que no se disuelva en agua se pueden extraer con soluciones acuosas con el fin de obtener enzimas en forma soluble.

55 Las enzimas se pueden recuperar del cultivo de microorganismos, el sobrenadante y las células de microorganismos mediante cualquier método conocido y adecuado o mediante cualquier método adecuado desarrollado en el futuro. Se aplica lo mismo también a los métodos mediante los que las enzimas se pueden separar en fracciones con las actividades enzimáticas deseadas.

60 Un método mediante el que el cultivo de microorganismos o el sobrenadante o la fracción enriquecida de proteínas que comprende enzima/s catalíticamente activa/s se recuperan mediante medios basados en su tamaño molecular, comportamiento iónico, solubilidad en agua, solubilidad en diferentes solutos o solubilidad en solutos de mezcla que contienen un factor de tampón o un factor de superficie activa o un compuesto de superficie activa o una sal.

65 El microorganismo capaz de producir lípidos se refiere en esta descripción a un microorganismo, tal como una

bacteria, una arqueobacteria, un alga o un hongo, de manera típica, un hongo filamentoso o una levadura, capaz de producir lípidos.

5 El "microorganismo oleaginoso" se refiere en el presente documento, de manera típica, a microorganismos que acumulan al menos el 15 % (p/p) de su biomasa como lípidos cuando se cultivan en condiciones de cultivo adecuadas u óptimas.

10 Un "microorganismo capaz de producir tanto lípidos como enzimas" es, de manera típica, un hongo, en particular, un hongo filamentoso (moho) o una levadura, una microalga o una bacteria. Los mohos productores de lípidos, los mohos dimórficos y los hongos filamentosos comprenden, por ejemplo, aquellos de los géneros *Absidia*, *Aspergillus*, *Blakeslea*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Claviceps*, *Clodosporidium*, *Cunninghamella*, *Emericella*, *Entomophthora*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Glomus*, *Humicola*, *Mucor*, *Mortierella*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Puccia*, *Pythium*, *Rhizopus*, *Saprolegnia*, *Trichoderma*, *Ustilago* y *Zygorhynchus*, tales como los mohos del género *Absidia spinosa*, *Aspergillus*, por ejemplo, *A. fischeri*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. sojae* y *A. terreus*, *Blakeslea trispora*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporidium herbarum*, *Claviceps purpurea*, los mohos del género *Cunninghamella*, por ejemplo, *C. echinulata*, *C. japonica* y *C. elegans*, *Entomophthora coronata*, *Fusarium bulbigenum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium* sp., *Gibberella fujikuroi*, *Glomus caledonius*, *Humicola lanuginosa*, *Humicola grisea*, los mohos del género *Mucor*, por ejemplo, *M. circinelloides*, *M. plumbeus* y *M. rouxii*, los mohos del género *Mortierella*, por ejemplo, *M. isabellina*, *M. alpina* y *M. ramanniana*, los mohos del género *Penicillium*, por ejemplo, *P. javanicum*, *P. lilacinum*, *P. spinulosum* y *P. soppii*, *Paecilomyces lilacinus*, *Puccia coronata*, *Pythium ultimum*, *Pythium irregulare*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Ustilago zaeae*, *Ustilago maydis*, *Zygorhynchus moelleri*, así como *Malbranchea pulchella*, *Myrothecium* sp., *Sclerotium bataticola*, *Pellicularia practicola*, *Sphacelotheca reiliana*, *Tyloposporidium ehrenbergii*, *Achyla americana*, *Lepista nuda*, *Tilletia controversa*, *Cronartium fusiform*.

25 Resulta beneficioso en la invención el uso de mohos de los filos *Zycomycota* o *Ascomycota*. Resulta particularmente beneficioso el uso de mohos de los géneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* o *Mortierella*.

30 En otro aspecto, las bacterias de los géneros, pero sin limitación, tales como *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Rhodococcus* o *Bacillus*, se pueden usar.

35 No obstante, en otros aspectos, se pueden usar las levaduras de los géneros, , *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Apiotrichum*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Rhodospiridium*, *Candida*, *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Trichosporon*, *Torulopsis*, *Waltomyces*, *Endomyces*, *Galactomyces*, *Pichia* o *Cryptococcus*, tales como *Cryptococcus albidus*, *C. terricolus*, *Trichosporon cutaneum*, *Lipomyces starkeyi*, *L. lipofera*, *Rhodospiridium toruloides*, *Candida curvata*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *Candida* sp. 107, *Lipomyces* sp. 33, *Rhodotorula gracilis*, *Trichosporon pullulans* o *T. fermentans*, pero sin limitación a estos géneros. Los microorganismos preferidos pertenecen a hongos, más preferentemente a los géneros seleccionados del grupo de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Rhizopus* y *Humicola*, o de levadura *Cryptococcus*. Lo más preferentemente, el microorganismo pertenece al género *Aspergillus*. También se pueden usar microorganismos oleaginosos que se modifiquen genéticamente para poder utilizar azúcares poliméricos en hemicelulosa. Adicionalmente, también son adecuados los organismos capaces de utilizar azúcares poliméricos en celulosa o hemicelulosa que se modifican genéticamente para mejorar la producción de lípidos.

45 En un aspecto, la preparación enzimática se introduce en un proceso biotécnico, que usa un microorganismo que no es capaz de producir enzimas hidrolíticas. En otro aspecto, la biomasa usada en dicho proceso se somete a tratamiento previo con la preparación enzimática, que es preferentemente el sobrenadante o la fracción de proteínas que comprende enzima/s hidrolítica/s catalíticamente activa/s. El proceso biotécnico usa, de manera típica, un microorganismo, tal como levadura, bacterias, algas, arqueobacterias, hongo filamentoso (moho) o un componente de los mismos.

50 Después de la retirada de proteínas biológicamente activas, el licor de fermentación se introduce en otro proceso biotécnico o se recicla de nuevo al mismo proceso, o este se puede liberar al entorno o conducir a un proceso de tratamiento de aguas residuales. El licor de fermentación se puede usar como tal o someterse a tratamiento microbiológico, químico y/o físico antes de su uso o antes de su liberación al entorno.

60 De acuerdo con una realización preferida de la invención, el agua de proceso, la biomasa residual y las enzimas se recirculan dentro del proceso de tal manera que la biomasa residual se somete a tratamiento previo con las enzimas recuperadas y la biomasa resultante y el agua de proceso se introducen en el mismo proceso de producción de aceite unicelular o uno posterior.

65 Tal como se describe en el presente documento, el agua sustancialmente libre de proteínas producida mediante el proceso de la invención se introduce en otros procesos o aplicaciones o en el entorno. Antes de otros usos, otros componentes, tales como la materia orgánica, las sales inorgánicas o los componentes no basados en proteínas se pueden retirar o reducir en el agua.

En un aspecto, la biomasa polimérica o los azúcares poliméricos se someten a tratamiento con las enzimas recuperadas tal como se describe en el presente documento de tal manera que el producto de degradación enzimática de la biomasa comprende carbohidratos fermentables y preferentemente también carbohidratos oligoméricos, que cuando se introducen en un nuevo proceso de fermentación causan y mantienen la producción de enzimas extracelulares.

Las fracciones enzimáticas o enzimas recuperadas en la invención se pueden usar para hidrolizar lignocelulosa a subfracciones, tales como fracciones de celulosa, hemicelulosa o lignina.

En la presente invención, los lípidos, las proteínas, en particular, las enzimas hidrolíticas, se recuperan en la invención.

En un aspecto, la presente invención proporciona también una preparación enzimática obtenida mediante el proceso de acuerdo con diversas realizaciones de la invención. La preparación enzimática comprende, de manera típica, la fracción de proteínas en la fase acuosa del cultivo de microorganismos o en el sobrenadante y se enriquece al menos 1 vez (1x), preferentemente al menos 2 veces (2x), más preferentemente al menos 3 veces (3x), calculado como actividad enzimática por volumen y/o por proteína total seca.

En algún aspecto, la preparación enzimática se puede enriquecer del cultivo de microorganismos o del sobrenadante al menos 5 veces, en algunas realizaciones, al menos 10x, o 20x o 30x, o 40x, o 50x, o 60x, o 70x, u 80x, o 90x o 100x, calculado como actividad enzimática por volumen y/o por proteína total. En un aspecto, la presente invención también proporciona el uso de las enzimas o la preparación enzimática producida de acuerdo con diversas realizaciones de la invención en otro proceso industrial o en el mismo proceso de producción de aceite unicelular u otro o para el tratamiento de la biomasa polimérica usada como carga de alimentación en dichos procesos.

En un aspecto, la presente invención proporciona también el uso de los lípidos producidos de acuerdo con diversas realizaciones de la invención o como componente de biocombustible o como material de partida para la producción de biocombustible.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, los lípidos producidos tal como se describe en el presente documento se usan como biodiésel o diésel renovable, gasolina o combustible a chorro.

Producción de biocombustibles a partir de lípidos

El "biocombustible" se refiere a combustible sólido, líquido o gaseoso derivado principalmente de biomasa o biorresiduos y es diferente de los combustibles fósiles, que se derivan de los restos orgánicos de plantas y animales prehistóricos.

De acuerdo con la directiva de la UE 2003/30/EU, el "biodiésel" se refiere a un éster de metilo producido a partir de aceite vegetal o aceite animal, de calidad diésel para usarse como biocombustible. De manera más amplia, el biodiésel se refiere a los ésteres de alquilo de cadena larga, tales como ésteres de propilo, metilo o etilo, procedentes de aceites vegetales o aceites animales de calidad diésel. El biodiésel también se puede producir a partir de lípidos de microorganismos, por lo que los lípidos de microorganismos se pueden originar a partir de una bacteria, un hongo (una levadura o un moho), un alga u otro microorganismo.

El "diésel renovable" se refiere a un combustible que se produce mediante un tratamiento con hidrógeno de los lípidos de origen animal, vegetal o de microorganismo o sus mezclas, por lo que los lípidos de microorganismos se pueden originar a partir de una bacteria, un hongo (una levadura o un moho), un alga u otro microorganismo. El diésel renovable también se puede producir a partir de ceras derivadas de la biomasa mediante gasificación y síntesis de Fischer-Tropsch. Opcionalmente, además del tratamiento con hidrógeno, se pueden realizar isomerizaciones u otras etapas de procesamiento. El proceso del diésel renovable también se puede usar para producir combustible a chorro y/o gasolina. La producción de diésel renovable se ha descrito en las publicaciones de patente EP 1396531, EP1398364, EP 1741767 y EP1741768.

El biodiésel o el diésel renovable se pueden mezclar con combustibles fósiles. Los aditivos adecuados, tales como conservantes y antioxidantes, se pueden añadir al producto de combustible.

El "lubricante" se refiere a una sustancia, tal como grasa, lípido o aceite, que reduce la fricción cuando se aplica como recubrimiento de superficie a las partes móviles. Otras dos funciones principales de un lubricante son la retirada de calor y la disolución de impurezas. Las aplicaciones de los lubricantes incluyen, pero sin limitación, usos en motores de combustión interna como aceites de motor, aditivos en combustibles, en dispositivos impulsados por aceite, tales como bombas y equipos hidráulicos, o en diferentes tipos de cojinetes. De manera típica, los lubricantes contienen el 75-100 % de aceite de base y el resto son aditivos. Los aditivos adecuados son, por ejemplo, detergentes, estabilizantes de almacenamiento, antioxidantes, inhibidores de la corrosión, reductores de la turbidez, desemulsionantes, agentes antiespumantes, codisolventes y aditivos de lubricidad (véase, por ejemplo, el documento US 7.691.792). El aceite de base para lubricante se puede originar de aceite mineral, aceite vegetal,

aceite animal o de una bacteria, hongos (una levadura o un moho), un alga u otro microorganismo. El aceite de base también se puede originar de ceras derivadas de la biomasa mediante gasificación y síntesis de Fischer-Tropsch. El índice de viscosidad se usa para caracterizar el aceite de base. De manera típica, se prefiere un alto índice de viscosidad.

Los lípidos producidos de acuerdo con el método descrito en la presente invención se pueden usar como carga de alimentación para la producción de biodiésel, diésel renovable, combustible a chorro o gasolina. El biodiésel consiste en ésteres de metilo de ácidos grasos y se produce, de manera típica, mediante transesterificación. En la transesterificación, los acilglicerol se convierten en ésteres de alquilo (metilo, etilo o propilo) de ácidos grasos de cadena larga. El diésel renovable se refiere al combustible que se produce mediante el tratamiento con hidrógeno (desoxigenación, hidrogenación o hidroprocesamiento del hidrógeno) de los lípidos. En el tratamiento con hidrógeno, los acilglicerol se convierten en los alcanos correspondientes (parafinas). Los alcanos (parafinas) se pueden modificar adicionalmente mediante isomerización o mediante otras alternativas de proceso. El proceso del diésel renovable también se puede usar para producir combustible a chorro y/o gasolina. Además, el craqueo de los lípidos se puede realizar para producir biocombustibles. Adicionalmente, los lípidos se pueden usar como biocombustibles directamente en determinadas aplicaciones.

Los lípidos producidos con el método se pueden usar como aceites de base para lubricantes (aceites lubricantes) o como material de partida para la producción de aceites de base para lubricantes.

El término "acilglicerol" se refiere a un éster de glicerol y ácidos grasos. Los acilglicerol se producen de manera natural como grasas y aceites grasos. Los ejemplos de acilglicerol incluyen triacilglicerol (TAG, triglicéridos), diacilglicerol (diglicéridos) y monoacilglicerol (monoglicéridos).

Recuperación de aceite

Los microorganismos que contienen lípidos se pueden separar del medio de cultivo mediante cualquier método conocido, tal como el uso de técnicas de filtración o decantación. Como alternativa, la centrifugación con centrifugadoras comerciales a escala industrial de gran capacidad de volumen se puede usar para separar los productos deseados.

En diversas realizaciones de la invención, el aceite, o los precursores del aceite, se puede recuperar de la biomasa celular o del caldo de cultivo usando cualquier método conocido en la técnica o desarrollado en el futuro. Tales métodos incluyen, pero sin limitación, la extracción con disolventes orgánicos. En diversas realizaciones de la invención, las células de microorganismos se pueden disociar para facilitar la separación del aceite y otros componentes. Se puede usar cualquier método conocido para la disociación celular, tal como ultrasonidos, choque osmótico, fuerza de cizalla mecánica, prensa en frío, choque térmico, autólisis catalizada por enzimas o autodirigida.

El residuo celular extraído de aceite se puede usar para la producción de energía, por ejemplo, quemado o sometido a tratamiento con un proceso de digestión anaerobia o utilizado como alimento para animales. El residuo celular extraído de aceite, o una fracción del residuo celular, también se puede reciclar de nuevo a los bioprocesos para usarse como fuente de nutrientes.

Además de la recuperación de lípidos y enzimas, también resulta posible recuperar otros componentes económicamente utilizables o componentes de las corrientes secundarias del proceso de aceite unicelular o

El proceso de la invención se presenta en la Figura 1.

La biomasa polimérica se puede someter a tratamiento previo mecánico, termomecánico, químico o mediante una combinación de estos métodos.

El material sometido a tratamiento se introduce en el tratamiento enzimático. Las enzimas se originan al menos parcialmente de las fracciones, de manera típica, del agua de proceso de un proceso de producción de aceite unicelular. El tratamiento enzimático va seguido, opcionalmente, de un tratamiento físico o químico o combinaciones de los mismos. Estos tratamientos y los tratamientos enzimáticos se pueden repetir una o más veces.

La biomasa sometida a tratamiento se introduce en un proceso de producción de aceite unicelular que permite que el microorganismo produzca lípidos.

Las células y la fase sólida se separan de la fase líquida (sobrenadante). Los componentes macromoleculares se recuperan de la fase líquida mediante el uso de métodos que mantienen una cantidad sustancial de la actividad enzimática. Los componentes enzimáticamente activos se pueden introducir para someter a tratamiento la biomasa usada en el proceso de producción de aceite unicelular o se pueden introducir en el proceso de producción de aceite unicelular. Opcionalmente, las preparaciones enzimáticas se pueden preparar a partir de los componentes enzimáticamente activos y las preparaciones enzimáticas así obtenidas se pueden comercializar o usar en otros procesos. El agua liberada se introduce, opcionalmente, en el proceso de aceite unicelular o para otro uso o se puede liberar del sistema.

La fracción de sustancia sólida que se libera del proceso de producción de aceite unicelular se somete a tratamiento para separar y recuperar los componentes deseados, en particular, los lípidos, en algunas realizaciones, también las enzimas.

5 Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplos

10 Las actividades enzimáticas en el caldo de cultivo gastado de cultivos de hongos filamentosos productores de grasa se determinaron mediante ensayos de hidrólisis con celulosa pura y xilano como sustratos.

Métodos

15 Definición de azúcar:

Con el fin de definir la concentración de azúcar de una solución, la solución se convirtió en una dilución adecuada que se filtró a través de 0,2 µm antes de un análisis de HPLC.

20 La columna usada en la definición de azúcar fue el intercambiador de iones Shodex Sugar SP 0810 en forma de plomo (en fase estacionaria). Las dimensiones de la columna fueron de 8,0 mm (DI) x 300 mm. El eluyente fue agua (caudal de 0,6 ml/min) y la temperatura de la columna fue de 60 °C. El detector fue un Shimadzu RID 10A de IR y la bomba fue una A6 y el automuestreador fue un Shimadzu SIL 20A. El procesamiento de los resultados se realizó con el soporte lógico Class-VP.

25 Análisis de ácidos grasos:

La composición de ácidos grasos de las muestras se determinó como en el método descrito por Suutari y col. (1990). Los lípidos en las muestras se hidrolizaron primero hasta dar ácidos grasos libres, que se saponificaron hasta dar sales de sodio de los mismos y, posteriormente, se metilaron hasta dar ésteres de metilo. Los ésteres de metilo de ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía de gases.

30

Análisis de concentración de proteínas:

35 La concentración de proteínas de los caldos de cultivo se analizó después de la filtración del caldo a través de papel de filtro Whatman3. La concentración de proteínas se analizó de acuerdo con la prueba de proteínas Bio-Rad (basada en el método de Bradford).

Ensayos de hidrólisis:

40 El caldo de cultivo gastado se filtró a través de papel de filtro Whatman3 antes del ensayo de hidrólisis.

La actividad de xilanasa se determinó de la siguiente manera. Se usó un matraz Erlenmeyer de 100 ml como recipiente de reacción. Este se llenó con 20 ml de solución de xilano de madera de abedul al 1 % (Sigma) en tampón de fosfato (0,02 M, pH 5) como sustrato, 10 ml de caldo de cultivo filtrado y 20 ml de tampón de fosfato (0,02 M, pH 5). La reacción de hidrólisis se realizó en un baño de agua agitado (140 rpm) a 50 °C. Se tomaron muestras de 1 ml del recipiente de reacción directamente después de la adición del caldo de cultivo y después de 1, 3, 5, 21/23 horas. La reacción de hidrólisis se detuvo en la muestra de 1 ml mediante la disminución del pH mediante la adición de 50 µl de ácido sulfúrico 1,33 M. Las muestras se sometieron a tratamiento para la retirada de sal y azúcar polimérica para adaptarse al análisis de HPLC. Los azúcares liberados se analizaron mediante HPLC (véase la definición de Azúcar) con manitol como patrón.

La actividad de celulasa se determinó con 1 g de papel de filtro Whatman como sustrato de celulosa en lugar de xilano. El volumen de reacción fue de 50 ml que contenía 1 g de papel de filtro Whatman en círculos de igual tamaño (aproximadamente 5 mm de diámetro) como sustrato, 10 ml de caldo de cultivo filtrado y 40 ml de tampón de fosfato (0,02 M, pH 5). El experimento se realizó de otra manera, tal como con xilano.

55

Cepas de microorganismos:

60 Los microorganismos productores de lípidos, en general, están disponibles a través de una pluralidad de colecciones de cepas, tales como ATCC, DSM, etc. Se analizan diversas realizaciones de la invención en los siguientes ejemplos mediante el uso de cepas de microorganismos de la siguiente manera. *Aspergillus oryzae* DSM 1861, *Aspergillus oryzae* DSM 1864 y *Aspergillus terreus* DSM 1958.

65

Ejemplo 1

Este ejemplo muestra la actividad enzimática formada en el caldo de cultivo durante el cultivo de *Aspergillus oryzae* con material basado en hemicelulosa como fuente de carbono para la producción de lípidos.

Se cultivó *Aspergillus oryzae* en cultivos en matraces con xilano de abedul purificado (Sigma) y hemicelulosas de abeto y abedul extraídas con extracción con agua caliente a presión como fuente de carbono. Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de medio de cultivo. La base del medio de cultivo contenía, por litro de agua, 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de K_2HPO_4 , 1 g de KH_2PO_4 y 0,2 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y se suplementó con fuente de carbono, extracto de levadura y, opcionalmente, material de soporte. Los medios de cultivo se inocularon con una suspensión de esporas de hongos al 1 % (v/v) y los cultivos se incubaron a una temperatura de 28 °C.

En el caso del xilano purificado, la base del medio se suplementó con, por litro, 40 g de xilano de abedul purificado (Sigma) y 1 g de extracto de levadura. Los cultivos duplicados se incubaron en un agitador orbital (160 rpm) durante 6 días.

En el caso de la hemicelulosa de abeto y abedul, la base del medio se suplementó con, por litro, 44 g de hemicelulosa de abeto o abedul secada producida mediante la extracción con agua caliente, 0,5 g de extracto de levadura y 2 g de celulosa para dar soporte mecánico al micelio fúngico. Los cultivos triplicados se incubaron en un agitador orbital (180 rpm) durante 7 días.

Después de la incubación, el caldo de cultivo se filtró a través de papel de filtro Whatman 3. La concentración de proteínas y las actividades enzimáticas se determinaron a partir del filtrado. El retenido se lavó con agua destilada y se secó. La concentración de biomasa y el contenido de lípidos se determinaron a partir de las muestras secadas.

En el xilano de abedul purificado después de 6 días de cultivo, el hongo *A. oryzae* produjo 16 g/l de biomasa (peso seco) y la biomasa contenía el 10,5 % de lípidos/peso seco. El *Aspergillus oryzae* cultivado en hemicelulosa de abedul extraída con agua produjo 14 g/l de biomasa seca durante 7 días de incubación. La biomasa que contenía micelio fúngico, hemicelulosa residual y celulosa contenía el 8,9 % de lípidos/peso seco, lo que equivale a 1,26 lípidos por litro de medio de cultivo. En la producción de lípidos, tanto la hemicelulosa como el xilano de abedul fueron mejores que la hemicelulosa de abeto, ya que en la hemicelulosa de abeto se produjeron 8,7 g/l de biomasa seca que contenía el 3,7 % de lípidos/peso seco.

La concentración de proteínas de los caldos de cultivo fue de 0,06 y 0,02 mg/ml para los cultivos de hemicelulosa de abeto y abedul y de 0,05 mg/ml para el cultivo de xilano de abedul.

La xilosa liberada del ensayo de hidrólisis de xilano en función del tiempo por mililitro de caldo de cultivo y por miligramo de proteína en la reacción se presenta en las Figuras 2 y 3. La Figura 2 muestra la xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul. La Figura 3 muestra la xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

Un mililitro de caldo de cultivo del cultivo de hemicelulosa de abeto liberó 1,2 mg de xilosa en 21 h y 20,1 mg/mg de proteína. Un mililitro de caldo de cultivo del cultivo de hemicelulosa de abedul liberó 5,2 mg de xilosa en 21 h y 234,6 mg/mg de proteína. Un mililitro de caldo de cultivo del cultivo de xilano de abedul liberó 5,0 mg de xilosa en 23 h y 101,4 mg/mg de proteína.

Los caldos de cultivo de los cultivos de *Aspergillus oryzae* con fuente de carbono de hemicelulosa o xilano mostraron una actividad significativa de xilanasa. Los caldos de cultivo no tenían ninguna actividad de celulasas detectable, ya que no se detectó glucosa libre en el ensayo de hidrólisis de celulosa.

Ejemplo 2

Este ejemplo muestra la actividad enzimática formada en el caldo de cultivo durante el cultivo de *Aspergillus oryzae* con material basado en celulosa como fuente de carbono para la producción de lípidos.

Se cultivó *Aspergillus oryzae* para la producción de lípidos en diferentes materiales de lignocelulosa basados en celulosa. La base del medio de cultivo contenía, por litro de agua, 40 g de material lignocelulósico como fuente de carbono, 0,5 g de extracto de levadura, 1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de K_2HPO_4 , 1 g de KH_2PO_4 y 0,2 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y se suplementó con fuente de nitrógeno y metales de traza.

Los Experimentos 1-4 se realizaron como cultivos en matraces. En los Experimentos 1-3, la base del medio se suplementó con 3 g de NaNO_3 y 0,02 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por litro y, en el Experimento 4, la base del medio se suplementó con 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por litro. Los cultivos paralelos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50-100 ml de medio de cultivo. Los medios de cultivo se inocularon con una suspensión de esporas

de *Aspergillus oryzae* al 1 % (v/v). Los cultivos se incubaron a una temperatura de 28 °C en un agitador orbital (160 rpm) durante 6 días.

Los Experimentos 5-6 se realizaron como fermentaciones de biorreactor.

5 En el Experimento 5, la base del medio de cultivo se suplementó con 1,46 g de peptona, 0,00015 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0001 g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0,00625 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ por litro. La fuente de carbono fue celulosa que se añadió al cultivo para dar una concentración final de 50 g/l. El medio de cultivo se inoculó con 50 ml de suspensión de *Aspergillus oryzae* precultivado 48 h. La fermentación se realizó en 1 l de volumen de medio de cultivo a una temperatura de 28 °C con una aireación de 0,8 l/min y una agitación a 350-450 rpm. El pH del cultivo fue 5,7 y se ajustó con NaOH 3 M durante el cultivo. Las actividades enzimáticas se determinaron después de 188 h de incubación.

15 En el Experimento 6, la base del medio de cultivo se suplementó con 6,5 g de peptona, 0,00015 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0001 g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0,00625 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ por litro de base de medio de cultivo. La fuente de carbono fue celulosa que se añadió al cultivo para dar una concentración final de 55 g/l. En la inoculación, la suspensión de esporas se preparó mediante la aplicación de un total de 24 ml de agua estéril sobre dos cultivos de placa de Petri de *A. oryzae* PDA de formación de esporas. Las esporas se suspendieron con un difusor y se inoculó 1 l de medio de cultivo con la suspensión. La fermentación se realizó a una temperatura de 28 °C con una aireación de 0,6 l/min y una agitación de 350-450 rpm. El pH del cultivo fue 5,7 y se ajustó con NaOH 3 M durante el cultivo. Las actividades enzimáticas se determinaron después de 233 h de incubación.

Los caldos de cultivo se separaron y la concentración de proteínas y la actividad de xilanasas y celulasas se analizaron tal como se ha descrito anteriormente.

25 Tabla 1. La fuente de nitrógeno y carbono, el volumen de cultivo, así como la concentración de proteínas determinada y las actividades enzimáticas determinadas.

Experimento	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	Volumen de cultivo (ml)	Conc. de proteínas (mg/ml)	Actividad de celulasa	Actividad de xilanasas
1	Pañuelos de papel para manos ¹ , triturados con un triturador pulverizador Fritsch	NaNO_3	50	0,19	No	Sí
2	SolkaFloc (celulosa purificada)	NaNO_3	100	0,11	Sí	Sí
3	Celulosa ² , molida y tamizada, 0,2 mm	NaNO_3	100	0,06	Sí	Sí
4	Harina de abedul (triturada con un turborotor)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	100	0,18	Sí	Sí
5	Celulosa ² , mismo tratamiento que en el Exp. 3	Peptona	1.000	0,49 ³	No	Sí
6	Celulosa ² , mismo tratamiento que en el Exp. 3	Peptona/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.000	0,11	No	Sí
¹ Materia prima de fibra: fibra reciclada ² Pasta de sulfato de abedul, descolorida, hemicelulosa aproximadamente al 10 %. ³ Caldo concentrado tres veces mediante ultrafiltración (filtro de 10.000 Da en una celda de ultrafiltración agitada Amicon Ultra 8200 de Millipore)						

En el experimento 6, se midió que el contenido de lípidos era del 4 %.

30 El azúcar liberado durante los ensayos de hidrólisis como miligramo por mililitro de caldo de cultivo y miligramo por miligramo de proteína en función del tiempo se presenta en 4-7. La Figura 4 muestra la xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul. La Figura 5 muestra la xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul. La Figura 6 muestra la glucosa liberada en los ensayos de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usó 1 g de celulosa. La Figura 7 muestra la glucosa liberada en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usó 1 g de celulosa.

40 Todos los seis caldos de cultivo sometidos a ensayo procedentes de cultivos mostraron una actividad significativa de xilanasas. Solo tres de los seis caldos de cultivo mostraron signos de actividad de celulasas, lo que indicaba una capacidad débil para producir estas enzimas en condiciones específicas.

Este ejemplo muestra que el *Aspergillus oryzae* puede producir enzimas lignocelulolíticas en el caldo de cultivo. El ejemplo muestra que el *A. oryzae* tiene una actividad de degradación de tanto de xilano como de celulosa.

Ejemplo 3

Este ejemplo muestra la actividad enzimática formada en el caldo de cultivo durante el cultivo de *Aspergillus terreus* con material basado en hemicelulosa como fuente de carbono para la producción de lípidos.

Se cultivó *Aspergillus terreus* para la producción de lípidos en una hemicelulosa de paja de trigo como sustrato de carbono en un volumen de 2 litros en un biorreactor. El medio de cultivo compuesto de 50 ml de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y sulfato de amonio (Difco) se suspendió en solución madre 10 x en 2 l de agua y se suplementó con, por litro: 1,0 g de extracto de levadura, 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de K_2HPO_4 , 1 g de KH_2PO_4 , 0,2 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 2 g de celulosa. El medio de cultivo se inoculó con 150 ml de cultivo de *A. terreus* precultivado 24 h. La fermentación se realizó a una temperatura de 35 °C con una aireación de 3,0 l/min y una agitación de 200-430 rpm. El pH del cultivo fue 5,7 y se ajustó con NaOH 3 M durante el cultivo. Durante el cultivo, la solución de hemicelulosa se alimentó al fermentador. Las actividades enzimáticas se determinaron después de 165 h de incubación.

El caldo de cultivo se separó y se concentró parcialmente mediante ultrafiltración en una celda de ultrafiltración con agitación Amicon con un filtro de 10.000 Da (Millipore). La concentración de proteínas y lípidos y la actividad de xilanasas y celulasas se analizaron tal como se ha descrito anteriormente.

El contenido de lípidos en la biomasa que contenía micelio fúngico, hemicelulosa residual y celulosa fue del 15 % por peso seco. La concentración de proteínas fue de 0,72 mg/ml en el caldo de cultivo no concentrado y de 2,15 mg/ml en el caldo concentrado.

El azúcar liberado durante los ensayos de hidrólisis como miligramo por mililitro de caldo de cultivo y miligramo por miligramo de proteína en función del tiempo se presenta en las Figuras 8 a 11.

La Figura 8 muestra la xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul. La Figura 9 muestra la xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul. La Figura 10 muestra la glucosa liberada en los ensayos de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usó 1 g de celulosa. Se liberó algo de xilosa a partir de la hemicelulosa procedente del caldo de cultivo usado. La Figura 11 muestra la glucosa liberada en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usó 1 g de celulosa. Se liberó algo de xilosa a partir de la hemicelulosa procedente del caldo de cultivo usado.

Este ejemplo indica que el *Aspergillus terreus* puede producir tanto lípidos intracelulares como enzimas hidrolíticas extracelulares en el caldo de cultivo. El ejemplo muestra que el *A. terreus* produce y excreta en el medio de cultivo enzimas que tienen actividad de degradación tanto de xilano como de celulosa. Estas enzimas se pueden separar, concentrar y usar en la hidrólisis de material lignocelulósico.

Ejemplo 4

Este ejemplo muestra la actividad enzimática formada en el caldo de cultivo durante el cultivo de *Aspergillus oryzae* con material basado en hemicelulosa como fuente de carbono para la producción de lípidos.

Se cultivó *Aspergillus oryzae* para la producción de lípidos en una hemicelulosa de paja de trigo como sustrato de carbono en un volumen de 2 litros en un biorreactor. El medio de cultivo compuesto de 50 ml de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y sulfato de amonio (Difco) se suspendió en solución madre 10 x en 2 l de agua y se suplementó con, por litro: 1,0 g de extracto de levadura, 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de K_2HPO_4 , 1 g de KH_2PO_4 y 0,2 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

El medio de cultivo se inoculó con 200 ml de cultivo de *A. oryzae* precultivado 72 h. La fermentación se realizó en un volumen de medio de cultivo de 2 l a una temperatura de 30 °C con una aireación de 3,0 l/min y una agitación de 200-410 rpm. El pH del cultivo fue 5,7 y se ajustó con NaOH 3 M durante el cultivo. Durante el cultivo, la solución de hemicelulosa se alimentó al fermentador. Las actividades enzimáticas se determinaron después de 144 h de incubación.

El caldo de cultivo se separó y la concentración de proteínas y la actividad de xilanasas y celulasas se analizaron tal como se ha descrito anteriormente. El contenido de lípidos en la biomasa que contenía micelio fúngico y hemicelulosa residual era del 21 % por peso seco. La concentración de proteínas fue de 0,61 mg/ml en el caldo de cultivo no concentrado y de 1,65 mg/ml en el caldo concentrado.

El azúcar liberado durante los ensayos de hidrólisis como miligramo por mililitro de caldo de cultivo y miligramo por miligramo de proteína en función del tiempo se presenta en las Figuras 12 a 15. La Figura 12 muestra la xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul. La Figura 13 muestra la xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se

usaron 200 mg de xilano de madera de abedul. La Figura 14 muestra la glucosa liberada en los ensayos de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usó 1 g de celulosa. Se liberó algo de xilosa a partir de la hemicelulosa procedente del caldo de cultivo usado. La Figura 15 muestra la glucosa liberada en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usó 1 g de celulosa. Se liberó algo de xilosa a partir de la hemicelulosa procedente del caldo de cultivo usado.

Este ejemplo muestra que el *Aspergillus oryzae* puede producir lípidos y, como producto secundario, un caldo de cultivo con actividades hidrolíticas que se pueda usar en la hidrólisis de material de lignocelulosa.

10

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la producción de enzimas, que comprende

- 5 - cultivar un microorganismo capaz de producir tanto aceite unicelular como enzimas extracelulares en condiciones adecuadas para la producción de aceite unicelular y la producción de enzimas extracelulares en un proceso de producción de aceite unicelular y producir aceite unicelular y enzimas mediante dichos microorganismos;
- 10 - obtener un cultivo de microorganismos que comprenda aceite unicelular y enzimas extracelulares y recuperar al menos parte de la fracción enriquecida de proteínas del sobrenadante, para su uso como preparación enzimática o como fuente de enzimas, y
- 15 - recuperar el aceite unicelular de las células del microorganismos,
- en donde el agua de proceso liberada del proceso tiene una demanda biológica de oxígeno al menos el 5 % menor que un agua de proceso de un proceso unicelular sin recuperación enzimática.
- 20 2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cultivo de microorganismos o parte del mismo o el sobrenadante o parte del mismo se recircula/n en el proceso.
3. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el agua de proceso liberada del proceso comprende al menos el 5 % menos de proteínas que el agua de proceso de un proceso de aceite unicelular sin recuperación enzimática.
- 25 4. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el proceso comprende al menos el 10 % menos de proteínas que el agua de proceso de un proceso de aceite unicelular sin recuperación enzimática.
- 30 5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se concentra la fase acuosa del cultivo de microorganismos o el sobrenadante.
6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la producción enzimática se inicia y/o se mantiene mediante la adición de un inductor de enzimas en el cultivo de microorganismos o la producción enzimática se produce de manera constitutiva.
- 35 7. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el microorganismo se cultiva en un medio que comprende biomasa polimérica.
- 40 8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el microorganismo se cultiva en un medio que comprende lignocelulosa o fracciones de la misma como fuente de carbono.
9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que las enzimas comprenden hidrolasas, oxidorreductasas, liasas, isomerazas, transferasas o ligasas o cualquier mezcla de las mismas.
- 45 10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la enzima hidroliza enlaces glicosídicos.
- 50 11. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el microorganismo es un hongo o una levadura.
12. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el microorganismo pertenece a un género seleccionado del grupo de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Rhizopus* y *Humicola* o la levadura que pertenece a *Cryptococcus*.
- 55 13. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que las enzimas producidas se usan en el mismo u otro proceso industrial.
- 60 14. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que los lípidos producidos en el proceso se usan como biocombustible, componente de biocombustible o como material de partida para la producción de biocombustible.
15. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el biocombustible es biodiésel o diésel renovable, gasolina y/o combustible para aviones.

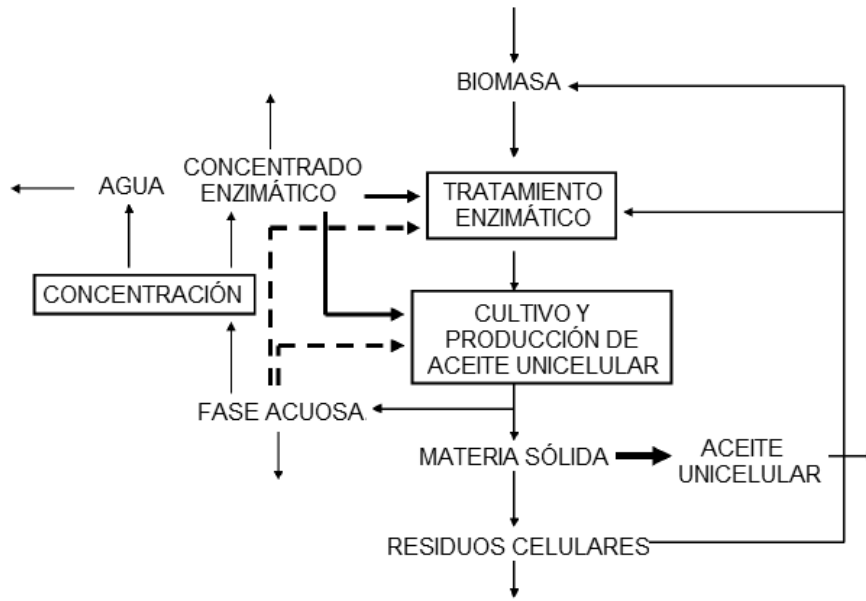


Fig. 1

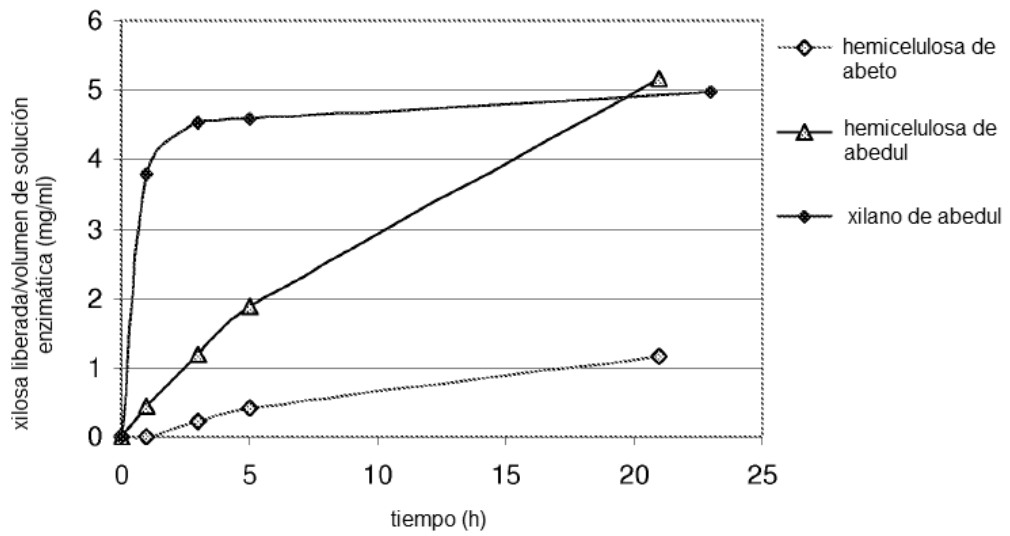


Fig. 2

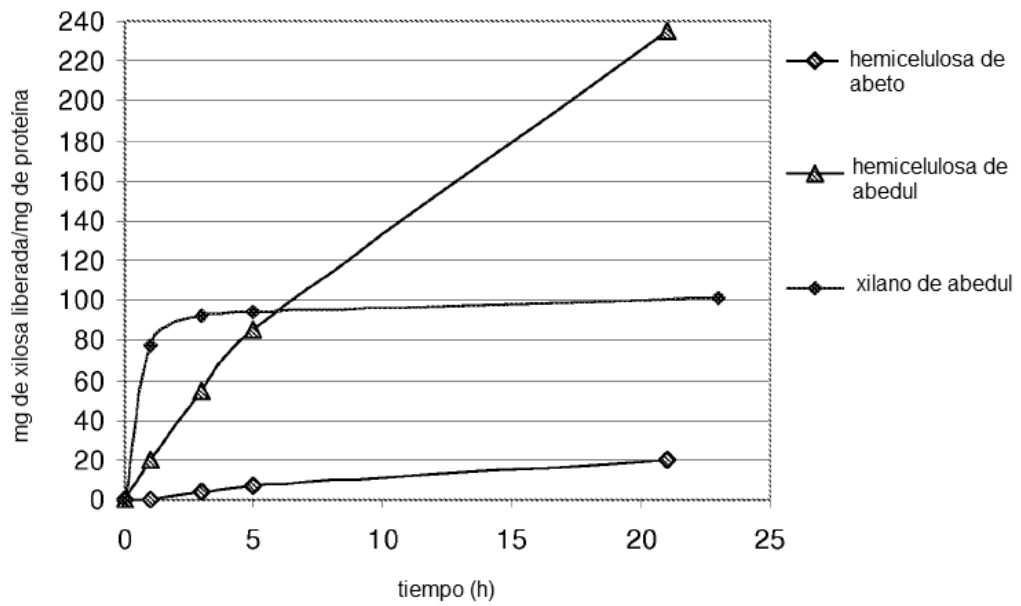


Fig. 3

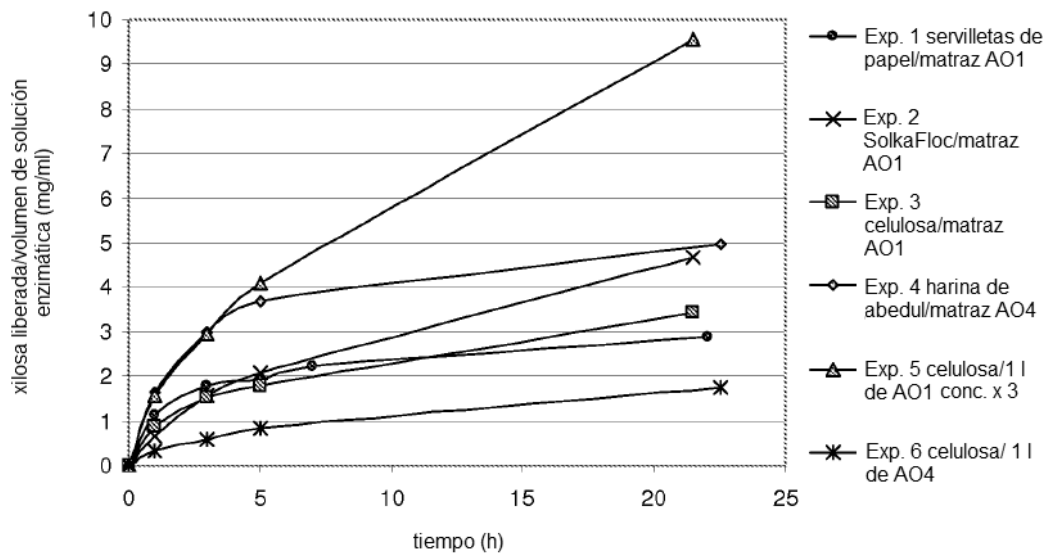


Fig. 4

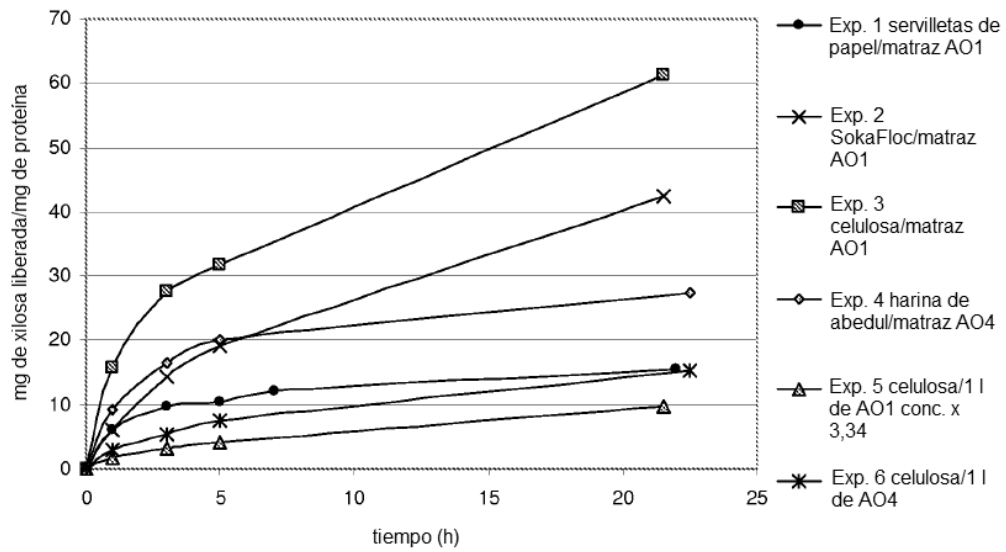


Fig. 5

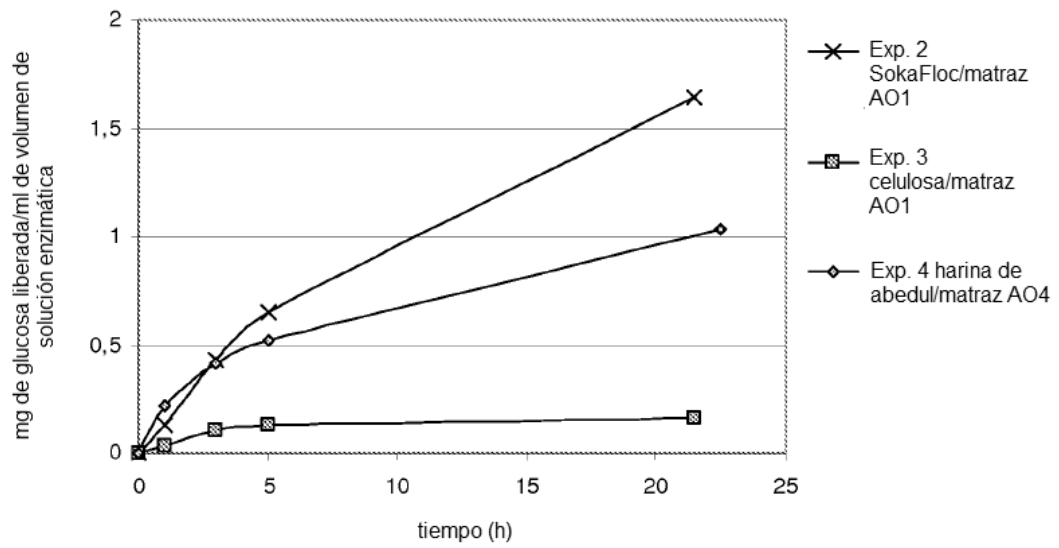


Fig. 6

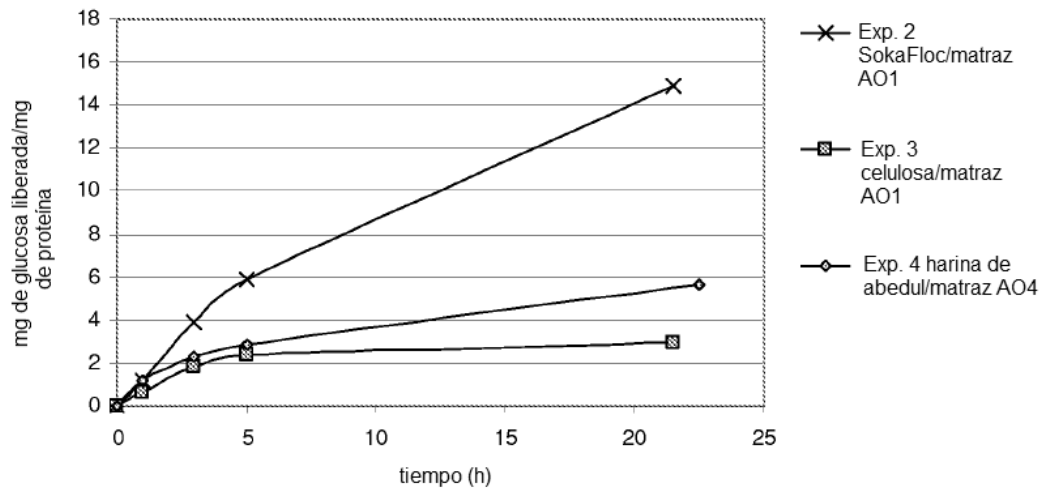


Fig. 7

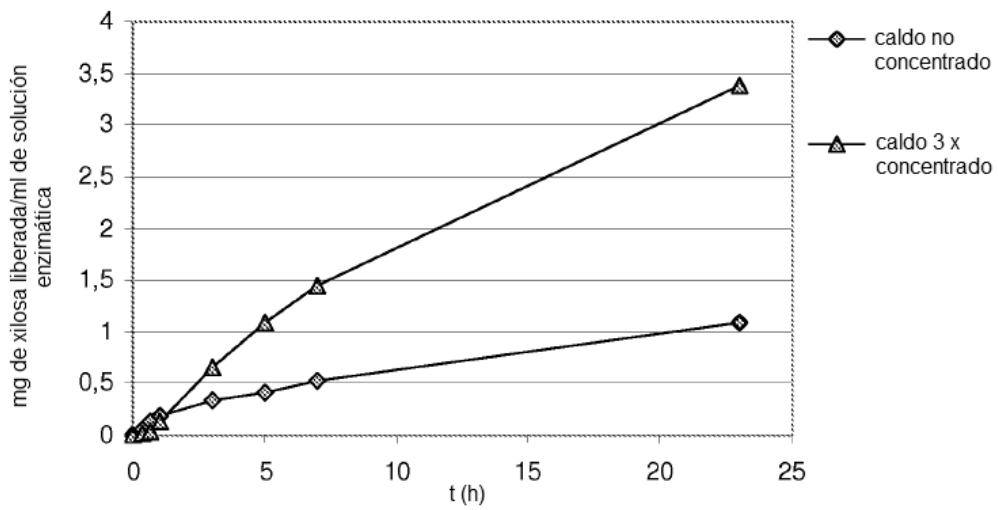


Fig. 8

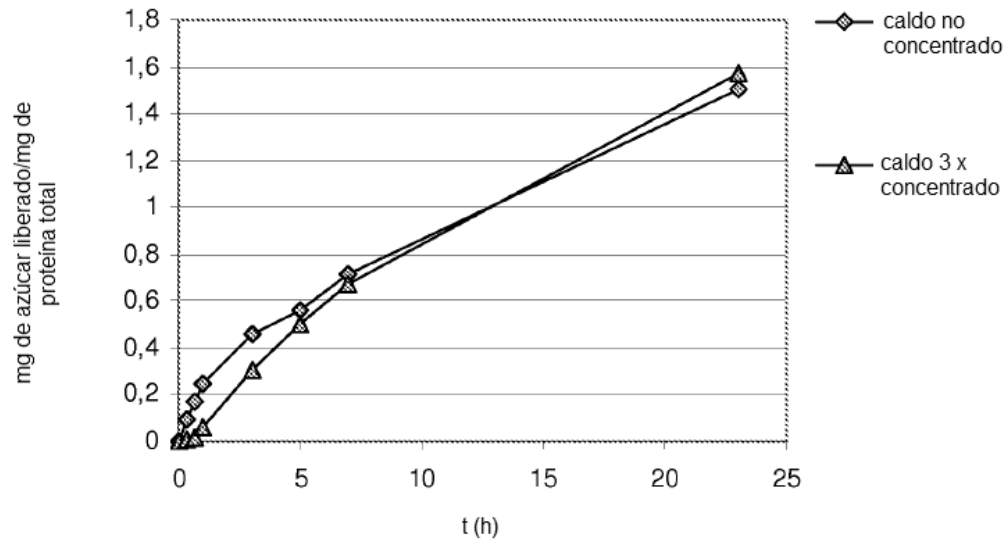


Fig. 9

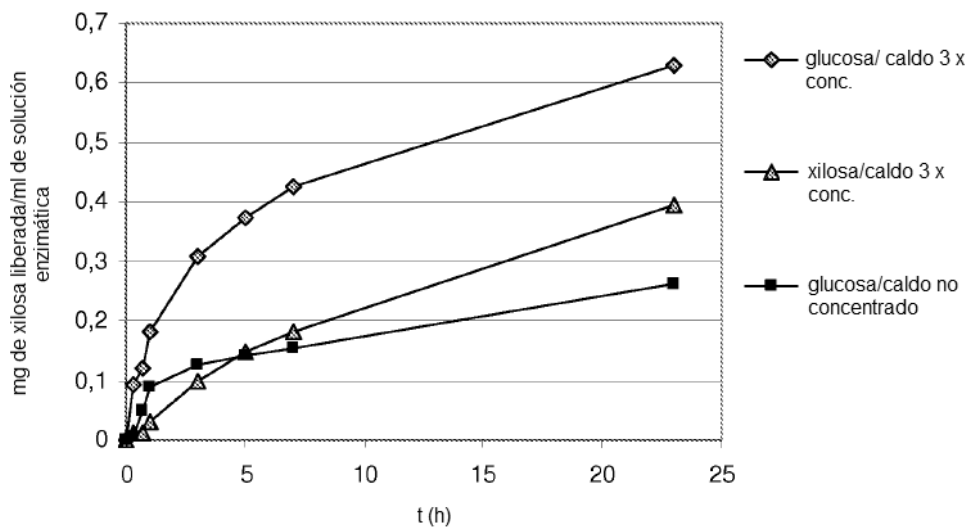


Fig. 10

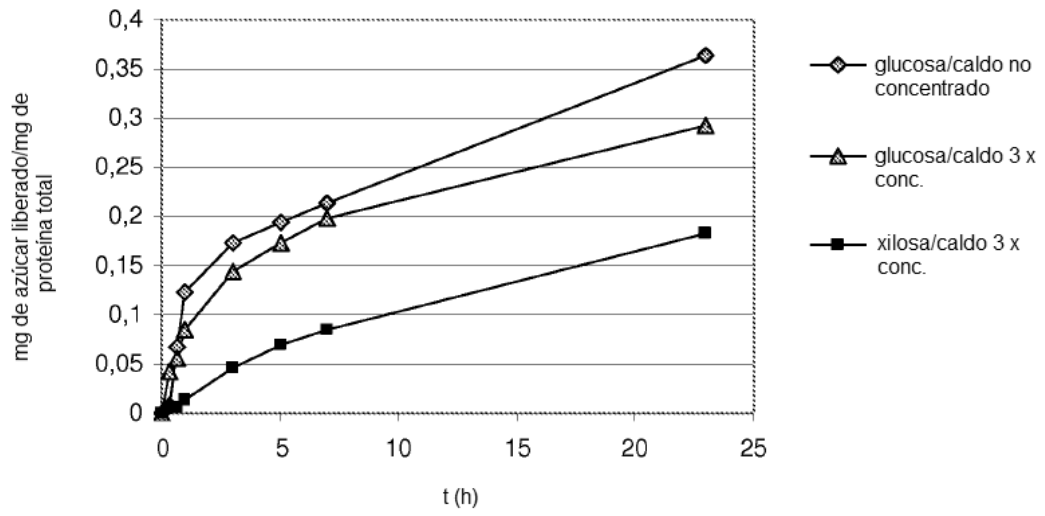


Fig. 11

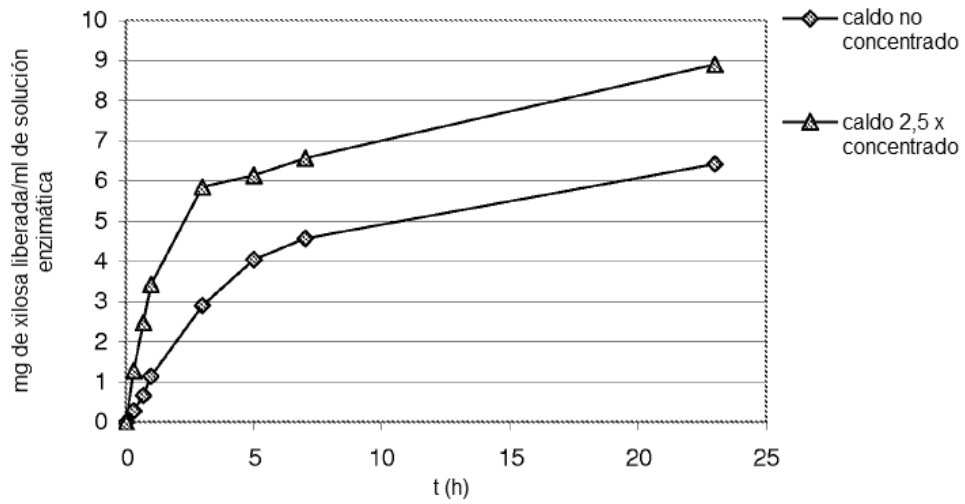


Fig. 12

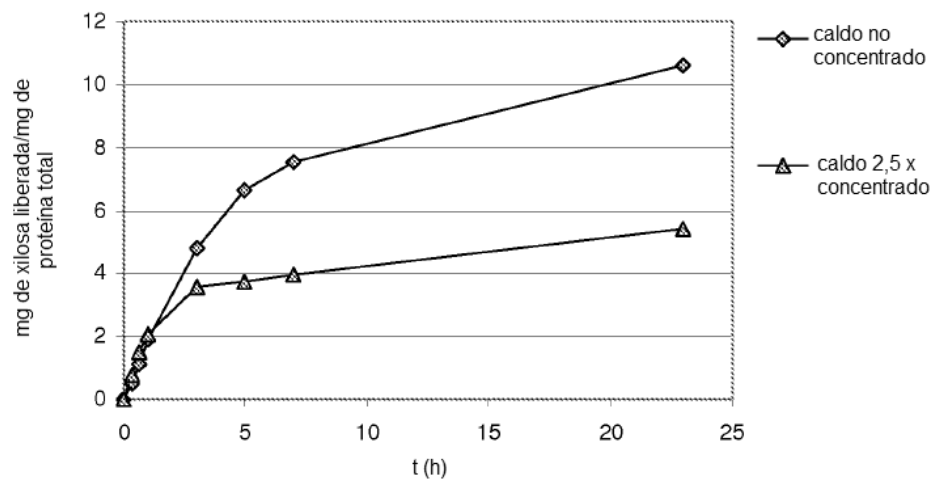


Fig. 13

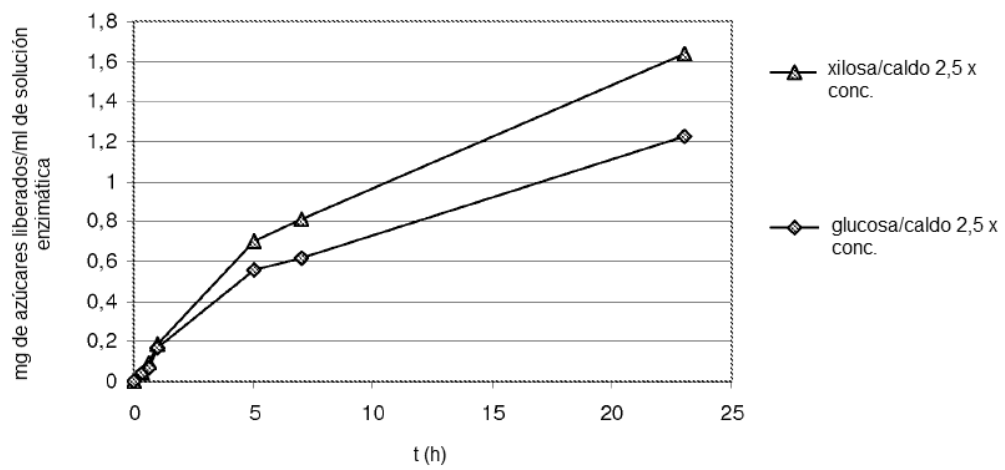


Fig. 14

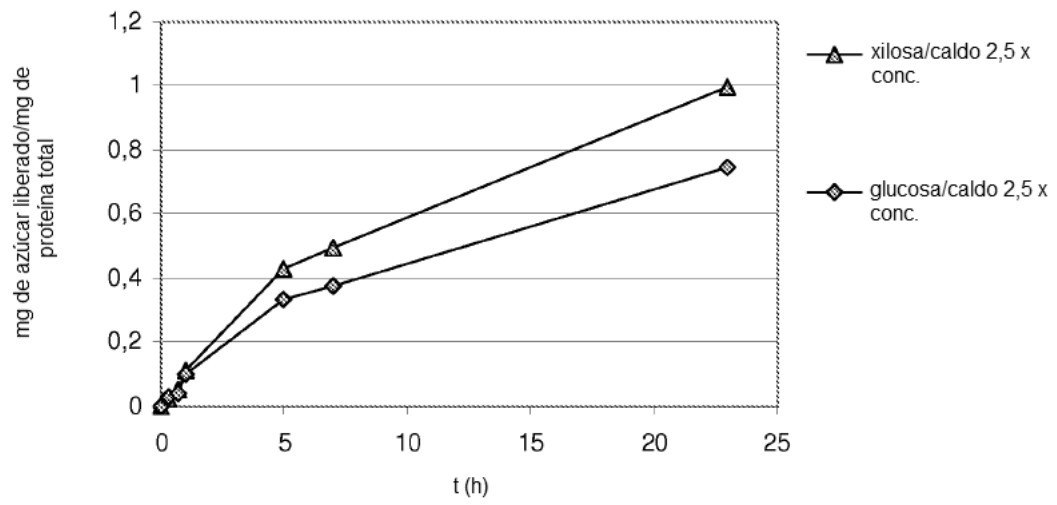


Fig. 15