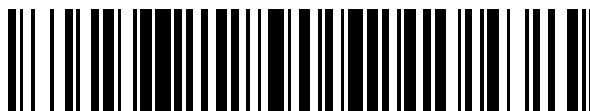


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 253**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/42** (2006.01)

**C12N 1/06** (2006.01)

**C12N 1/14** (2006.01)

**C12R 1/885** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2015 PCT/EP2015/067139**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016 WO16016182**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2015 E 15742261 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3174979**

54 Título: **Procedimiento de producción de un cóctel enzimático a partir de mosto de hongo**

30 Prioridad:

**30.07.2014 FR 1457358**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.09.2020**

73 Titular/es:

**IFP ENERGIES NOUVELLES (50.0%)**

**1 & 4 avenue de Bois-Préau**

**92500 Rueil-Malmaison, FR y**

**INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE POUR**

**L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET**

**L'ENVIRONNEMENT (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BEN CHAABANE, FADHEL;**

**JOURDIER, ETIENNE;**

**COHEN, CELINE y**

**CHAUSSEPIED, BERNARD**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 784 253 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 a partir de mosto de hongo

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

Estos últimos se producen a partir de biomasa lignocelulósica y, en lo que respecta al uso de terrenos agrícolas para la producción de biocombustibles, plantean menos problemas de competencia con los alimentos, que los procedimientos denominados de primera generación producidos a partir de caña de azúcar, maíz, trigo, remolacha...

Los diversos estudios técnicos y económicos demuestran que la reducción del coste de las celulasas es uno de los puntos clave en los procedimientos de producción biológica de etanol a partir de materias primas lignocelulósicas.

En la actualidad, las celulasas industriales se producen principalmente a partir de un hongo filamentoso, *Trichoderma reesei*, debido a su fuerte poder de secreción. En los procedimientos convencionales de producción de celulasas, estas se recuperan del sobrenadante de cultivo mediante diversas etapas de separación.

El mosto de hongo (parte sólida recuperada después de la filtración) no se reutiliza. Se considera como residuo. Además, el cóctel enzimático producido por cepas hiperproductoras de *Trichoderma reesei* es pobre en actividad  $\beta$ -glucosidasa.

En algunas patentes se han propuesto procedimientos para mejorar la cepa productora de diversas maneras: sobreexpresando el gen (tal como en la solicitud de patente EP2082054, que se refiere a la sobreexpresión de una  $\beta$ -glucosidasa), o clonando  $\beta$ -glucosidasas más eficaces que provienen de otros microorganismos (tal como en la solicitud de patente W02013115305 que describe la clonación del gen de la  $\beta$ -glucosidasa de *Aspergillus* en *Trichoderma reesei*) o incluso creando nuevos genes más eficaces a partir de diferentes genes de  $\beta$ -glucosidasa (tal como en la solicitud de patente WO 2010029259 que describe la producción de variantes de  $\beta$ -glucosidasa con actividad mejorada por L-Shuffling).

Gracias a la solicitud de patente WO 11079048 también se sabe que, en un procedimiento de SSF (hidrólisis y fermentación simultáneas), el aumento de la actividad  $\beta$ -xilosidasa tiene un efecto beneficioso sobre la hidrólisis enzimática, ya que permite reducir la dosis de las enzimas utilizadas. También permite la hidrólisis de alquilxilósidos. La invención propone un procedimiento de producción de un cóctel enzimático y una instalación adecuados para llevar a cabo el procedimiento según la invención, un cóctel que permite mejorar de manera significativa, incluso drástica, las actividades de  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilosidasa.

En efecto, de manera sorprendente, se constató que la realización del procedimiento según la invención conducía a un importante mejoramiento de la actividad específica de la  $\beta$ -glucosidasa, FPasa y  $\beta$ -xilosidasa. La actividad  $\beta$ -glucosidasa puede ser entre 3 y diez veces mayor que la medida al final de una producción de enzimas en condiciones normales; siendo la de la  $\beta$ -xilosidasa 3 veces mayor.

Por tanto, el mosto de hongo separado de las enzimas durante una etapa convencional de producción de enzimas, se reutiliza, representando este mosto el 10-20 % en masa con respecto a la masa total del cultivo.

Más concretamente, la invención se refiere a un procedimiento para aumentar el nivel de  $\beta$ -glucosidasa y/o  $\beta$ -xilosidasa en un cóctel enzimático a partir de un microorganismo celulolítico que produce celulasas y/o hemicelulasas, que comprende:

- una etapa de producción de enzimas con la obtención de un medio que contiene enzimas y un mosto de microorganismos, estando dicho mosto separado o no del líquido que contiene dichas enzimas,
- una etapa de enfriamiento de dicho mosto a una temperatura comprendida entre 4 y 20° C, que es una temperatura inferior a la temperatura de la etapa de producción de enzimas y durante un tiempo comprendido entre 12 y 90 h de manera que:
- la concentración de  $\beta$ -glucosidasa o  $\beta$ -xilosidasa del líquido obtenido en la etapa de enfriamiento es superior a la del líquido obtenido en la etapa de producción de enzimas,
- y/o
- la relación de volumen de sólido/volumen total, es inferior a dicha relación para la etapa de producción de enzimas,
- al final de la etapa de enfriamiento se obtiene un cóctel enzimático, perteneciendo el microorganismo al género *Trichoderma*.

Favorablemente, la temperatura de la etapa de enfriamiento está comprendida entre 4 y 20° C, y preferentemente, entre 4° C y 18° C.

Preferentemente, la etapa de enfriamiento se realiza a un pH comprendido entre 3,5 y 5,5, y preferentemente, mayor que 4.

De manera preferida, la etapa de enfriamiento se realiza en una atmósfera empobrecida en oxígeno, preferentemente en una atmósfera anaerobia.

Generalmente, se inyecta un gas neutro, por ejemplo, nitrógeno o dióxido de carbono.

El microorganismo pertenece al género *Trichoderma*, en particular a la especie *Trichoderma reesei*, y preferentemente,

se trata de la cepa CL847.

Después de la etapa de enfriamiento, el cóctel enzimático se separa del mosto y se obtiene un mosto residual.

5 Generalmente, la separación se realiza mediante al menos una centrifugación o filtración/prensado o microfiltración, opcionalmente precedida de una decantación. Las enzimas del líquido separado pueden concentrarse, por ejemplo, por ultrafiltración.

10 El microorganismo utilizado se selecciona entre hongos celulolíticos u otros microorganismos modificados. De manera preferida, el microorganismo celulolítico pertenece al género *Trichoderma* que particularmente produce celulasas y hemicelulasas adaptadas a la hidrólisis total de la celulosa y hemicelulosas.

15 Las cepas industriales utilizadas pertenecen, de manera preferente, a la especie *Trichoderma reesei*, generalmente el hongo se ha modificado para mejorar la producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas mediante procedimientos de selección y mutación (mutagénesis aleatoria), como por ejemplo la cepa IFP CL847 (patente francesa FR-B-2 555 803). El experto en la materia conoce bien estas cepas.

20 El procedimiento según la invención comprende una etapa de producción de enzimas con la obtención de un medio que contiene enzimas y un mosto de microorganismos, y con una posible separación de dicho mosto del líquido que contiene las enzimas.

25 Las cepas se cultivan en un fermentador con agitación y ventilación en condiciones compatibles con su crecimiento y con la producción de enzimas, condiciones conocidas por el experto en la materia. Para el crecimiento se introduce una fuente de carbono y para la producción de las enzimas se introduce una fuente inductora. La fuente de carbono puede ser un azúcar soluble industrial, por ejemplo glucosa, lactosa o xilosa, o un extracto de la fracción hemicelulósica en forma de monómeros de biomasa previamente tratada. La fuente de carbono inductora puede seleccionarse entre lactosa, celobiosa, soforosa, celulosa. El residuo de la hidrólisis o el material lignocelulósico pretratado también pueden utilizarse como fuente de carbono para el crecimiento del microorganismo y la inducción del sistema de expresión. Esta última fuente de carbono también puede utilizarse para las cepas genéticamente mejoradas y particularmente para las cepas recombinantes.

30 Al final de la etapa de producción de enzimas, el mosto se separa, o no, del líquido, o incluso puede separarse una parte del mosto. El mosto corresponde al hongo, a la parte sólida. El líquido contiene las enzimas. El mosto separado (en su totalidad o en parte) puede diluirse. Preferentemente el mosto separado se diluye con agua.

35 La separación podrá adaptarse particularmente en función de las actividades deseadas. La separación puede llevarse a cabo por cualquier medio conocido por el experto en la materia. Se mencionará, preferentemente, al menos una centrifugación o filtración/prensado (filtro de prensa) o microfiltración. Opcionalmente, la centrifugación va precedida de una decantación. Puede proporcionarse una etapa de concentración enzimática, por ejemplo, por ultrafiltración.

40 El procedimiento según la invención prosigue con una etapa de enfriamiento de dicho mosto (separado o no) a una temperatura inferior a la temperatura de la etapa de producción de enzimas y durante un tiempo determinado.

45 Favorablemente, la temperatura de la etapa de enfriamiento está comprendida entre 4 y 20 °C, y preferentemente, entre 4° C y 18° C.

Preferentemente, la etapa de enfriamiento se realiza a un pH comprendido entre 3,5 y 5,5, y preferentemente, mayor que 4. Este intervalo de pH se define entre el pH 3 al comienzo de la desactivación de la β-glucosidasa y el pH 6 de la posible esporulación del hongo.

50 Preferentemente, la etapa de enfriamiento se realiza en una atmósfera empobrecida en oxígeno, preferentemente en una atmósfera anaerobia. Generalmente, se inyecta un gas neutro, por ejemplo, nitrógeno o dióxido de carbono. Se ha observado un rendimiento mejorado en una atmósfera empobrecida en oxígeno, y los mejores rendimientos se obtienen en una atmósfera anaerobia. En presencia de oxígeno, el hongo puede consumir las enzimas nuevamente. Generalmente, basta con enfriar preferentemente durante 24 a 72 h, y generalmente, alrededor de 48 h.

55 Durante esta etapa de enfriamiento, se establece una reacción de autólisis del hongo presente en el mosto, autólisis generada por las enzimas. Estas están presentes bien en el líquido del mosto no separado o son las que aún están contenidas en el mosto separado y que no pueden separarse.

60 Experimentalmente se observa que, en las condiciones del procedimiento según la invención, las actividades de β-glucosidasa y β-xilosidasa aumentan de manera muy significativa y que el sedimento de biomasa disminuye.

Para optimizar el rendimiento de un cóctel enzimático, el tiempo de enfriamiento puede determinarse anteriormente en un ensayo de laboratorio. Favorablemente, el tiempo de enfriamiento se controla durante la realización del procedimiento, el avance de la reacción es seguido de toma de muestras.

65 El tiempo de enfriamiento es tal que

- la actividad  $\beta$ -glucosidasa o  $\beta$ -xilosidasa del líquido obtenido en la etapa de enfriamiento es superior a la del líquido obtenido en la etapa de producción de enzimas, y/o
- 5 - la relación de volumen de sólido/volumen total (sedimento de biomasa), es inferior a dicha relación para la etapa de producción de enzimas.

El sustrato utilizado para determinar la actividad  $\beta$ -glucosidasa o aril  $\beta$ -glucosidasa es el p-nitrofenil-pD-glucopiranosido (PNPG). La  $\beta$ -glucosidasa escinde dicho sustrato liberando p-nitrofenol.

10 Una unidad de actividad aril  $\beta$ -glucosidasa se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 mmol de p-nitrofenol a partir de PNPG por minuto y se expresa en UI/ml.

El sustrato utilizado para determinar la actividad  $\beta$ -xilosidasa es el p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosido según el mismo principio.

15 Estos parámetros se determinan a partir de mediciones.

Se ha observado que durante el procedimiento, la concentración de  $\beta$ -glucosidasa aumenta, alcanza un máximo y después disminuye. Al mismo tiempo, se ha observado que el sedimento de biomasa disminuye.

20 Como ejemplo, se ha observado que, en general, la cantidad de líquido que se libera es equivalente al menos al 10 %, y con mayor frecuencia, al 30-40 % del peso inicial del mosto separado y que la concentración de proteínas, medida en términos de actividades de  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilosidasa, se ha triplicado.

La determinación del tiempo de enfriamiento a partir de esta información es competencia del experto en la materia.

Después de la etapa de enfriamiento, el cóctel enzimático (parte líquida) puede o no estar separado del sólido residual, preferentemente está separado.

25 Los medios de separación son los descritos anteriormente.

Se ha podido observar, que esta separación es más difícil, más delicada, cuando el mosto no se ha separado justo al final del cultivo.

30 Asimismo, de manera muy preferida, el mosto se separa antes de la etapa de enfriamiento, preferentemente con un filtro de prensa. Preferentemente, se separa al menos un 95 % del mosto, y aún más preferentemente, el mosto se separa por completo del líquido. En este caso se entiende que "por completo" se refiere al método de separación utilizado.

35 Preferentemente, dicho cóctel enzimático de la etapa de enfriamiento se mezcla con las enzimas obtenidas en la etapa de producción de enzimas.

Dicho cóctel se mezcla total o parcialmente.

Dicho cóctel, mezclado o no, se utiliza en la hidrólisis enzimática.

40 El mosto residual puede someterse a una nueva etapa de enfriamiento, de manera opcional aunque preferentemente, seguido de una separación de un nuevo cóctel enzimático.

Las condiciones de estas etapas son las descritas anteriormente.

En este caso se indica una etapa de enfriamiento adicional, pero su número no es limitado.

45 Por tanto, la invención también se refiere a un procedimiento que aplica las etapas anteriores en el que dicho mosto residual se somete a una etapa de enfriamiento, y al final de la etapa de enfriamiento, se obtiene un cóctel enzimático, separado o no del mosto residual.

Preferentemente, dicho cóctel se separa del mosto residual de dicha etapa de enfriamiento.

50 Preferentemente, los cócteles enzimáticos obtenidos en las etapas de enfriamiento se mezclan. Preferentemente, se mezclan con enzimas obtenidas en la etapa de producción de enzimas.

De manera general, cada cóctel puede mezclarse entre sí y/o con las enzimas obtenidas en la etapa de producción de enzimas. La proporción de cada uno de los componentes de la mezcla se determina en función de la utilización de dicha mezcla.

55 Preferentemente, todos los cócteles y las enzimas se mezclan.

Al menos un cóctel, mezclado o no, se utiliza en la hidrólisis enzimática.

La invención se entenderá mejor a partir de las figuras 1 a 6. Las figuras 7 a 13 se refieren a los ejemplos.

60 La figura 1 describe el modo de realización preferida con una etapa de separación entre la etapa de producción de enzimas y la de enfriamiento. La figura 2 es una representación sin separación del mosto. En las figuras 3 y 4, se añade una etapa de enfriamiento adicional a las figuras 1 y 2 respectivamente.

La figura 5 representa una realización que combina la presencia o no de separación.

La figura 6 representa una realización preferida de la etapa de separación del mosto antes y/o después de la etapa de enfriamiento.

65 De acuerdo con la figura 1, en una etapa de producción de enzimas, se introduce (línea 1) una fuente de carbono y

una fuente inductora (zona de producción de enzimas 2), así como un microorganismo celulolítico que produce celulasas y/o hemicelulasas (línea 3) y los nutrientes necesarios (línea 4). El producto obtenido se separa (zona de separación 5) en un líquido que contiene las enzimas (línea 6) y se recupera un mosto (línea 7) que contiene el hongo y las enzimas incluidas.

5 El mosto se somete a la etapa de enfriamiento (zona de enfriamiento 8).

En una realización, el líquido se extrae de la zona de producción de enzimas (reactor) y el mosto permanece en dicha zona donde se enfría.

10 En otro modo preferido, el medio de cultivo se extrae de la zona de producción de enzimas y se separa en un medio de separación (filtración/prensado, centrifugación...), preferentemente después de decantar y extraer el líquido, para obtener el mosto. Este mosto se introduce en la zona de enfriamiento, que puede ser el reactor de la zona de producción de enzimas (en el caso de un procedimiento discontinuo) u otro reactor (en el caso de un procedimiento continuo).

15 El mosto enfriado (línea 9) se separa (zona 10) en un líquido que contiene el cóctel enzimático (línea 11) y un sólido que es el mosto residual (línea 12).

Las enzimas de flujos de las líneas 6 y 11 se mezclan y se envían (línea 13) a la zona de hidrólisis enzimática (14).

La figura 3 muestra este esquema añadiendo una etapa de enfriamiento.

20 El mosto residual (mosto 12) se somete a la etapa de enfriamiento adicional (zona de enfriamiento 15).

De la misma manera que antes, el mosto enviado en la etapa de enfriamiento adicional (zona 15) puede no haberse separado en la zona 10 después de la primera etapa de enfriamiento (zona 8).

El mosto enfriado (línea 16) se separa (zona 17) en un líquido que contiene el cóctel enzimático (línea 19) y un sólido que es el mosto residual (línea 18).

25 Las enzimas de flujo de la línea 19 se mezclan con las de los flujos obtenidos en la etapa de producción de enzimas (línea 6), de la primera etapa de enfriamiento (línea 11) y se envían (línea 20) a la zona de hidrólisis enzimática (14).

En la figura 2 se reconocerán las referencias de la figura 1. La etapa de separación (zona 5) después de la etapa de producción de enzimas se omite.

30 Ocurre lo mismo en la figura 4, que es la contraparte de la figura 2 y que incluye la etapa de enfriamiento adicional, las referencias relativas a esta adición se toman de la figura 3.

También se puede combinar en un esquema, la presencia de una separación y la ausencia de la otra separación. Esto se ilustra, por ejemplo, en la fig. 5. donde se observa la presencia de la separación al final de la etapa de producción de enzimas (zona 5), la ausencia de separación al final de la primera etapa de enfriamiento (zona 8) y antes de la etapa de enfriamiento adicional, y la presencia de separación después de la etapa de enfriamiento adicional (zona 17).

35 La figura 6 representa una realización preferida de la etapa de separación del mosto antes y/o después de la etapa de enfriamiento.

40 Con referencia a la figura 1, se trata de una realización de la zona 5 y/o la zona 10.

Al final de la zona de producción de enzimas 2, el medio de cultivo se separa en una etapa de decantación (zona 30), el hongo se encuentra en el lodo decantado (línea 31) y el jugo turbio obtenido (línea 32) pasa a una etapa de centrifugación (zona de centrifugación 33). Esto produce una crema (línea 34) que contiene el hongo y un jugo transparente (línea 35). Para completar la separación, el jugo transparente pasa a una etapa de microfiltración (zona 36), conteniendo el retenido (línea 37) el hongo y el permeado (línea 38) las enzimas.

45 Los diferentes flujos que contienen el hongo (lodo, crema, retenido) pueden mezclarse y constituir el mosto que se enviará a la etapa de enfriamiento o constituir el mosto residual, que se someterá o no a una nueva etapa de enfriamiento. Para concentrar las enzimas, el permeado se hace pasar a través de una etapa de ultrafiltración. Después se obtiene un concentrado de enzimas retenido (línea 40), así como un permeado (línea 41) que puede reutilizarse en el procedimiento.

50 Se observará que todas las etapas de decantación y centrifugación se pueden reemplazar por filtración/prensado (filtro/prensa).

## Ejemplos

55 Ejemplo 1: en relación a las figuras 7 a 9.

La figura 7 es una fotografía de *Trichoderma reesei* CL847 después de la separación y antes de la etapa de enfriamiento.

60 La Figura 8 muestra la evolución de la concentración de proteínas en el sobrenadante de cultivo.

La Figura 9 muestra la actividad  $\beta$ -glucosidasa medida al final de la etapa de producción y después de enfriar el hongo durante 72 horas a 4° C.

65 La producción de celulasas se efectúa en un biorreactor de 20 l (12 l útiles) que se agita mecánicamente. El medio mineral tiene la siguiente composición: KOH 1,66 g/l, H<sub>3</sub>P<sub>0</sub>4 85 % 2 ml/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>0</sub>4 2,8 g/l, MgS<sub>0</sub>4, 7 H<sub>2</sub>O 0,6 g/l, CaCL<sub>2</sub> 0,6 g/l, MnS<sub>0</sub>4 3,2 mg/l, ZnS<sub>0</sub>4, 7 H<sub>2</sub>O 2,8 mg/l, CoCl<sub>2</sub> 10 4,0 mg/l, FeS<sub>0</sub>4, 7 H<sub>2</sub>O 10 mg/l, Corn Steep [en

español licor de macerado de maíz seco] 1,2 g/l, antiespumante 0,5 ml/l.

El biorreactor que contiene el medio mineral se esteriliza a 120° C durante 20 minutos, la fuente de glucosa carbonada se esteriliza por separado a 120° C durante 20 minutos y después se añade estéril al biorreactor para tener una concentración final de 30 g/l.

El biorreactor se siembra al 10 % (v/v) con un precultivo líquido de la cepa CL847 de *Trichoderma reesei*. El medio mineral del precultivo, es idéntico al del biorreactor, con la excepción de la adición de ftalato de potasio a 5 g/l para tamponar el pH. El crecimiento del hongo en precultivo se realiza utilizando glucosa como sustrato de carbono, a una concentración de 30 g/l. El crecimiento del inóculo dura de 2 a 3 días y se efectúa a 28° C en una incubadora con agitación. La transferencia al biorreactor se realiza si la concentración de glucosa residual es inferior a 15 g/l.

El experimento de producción efectuado en un biorreactor comprende dos fases:

- una fase de crecimiento sobre sustrato de glucosa carbonada (concentración inicial = 30 g/l) a una temperatura de 27° C y un pH de 4,8 (regulado por amoníaco 5,5 M). La ventilación es de 0,5 vvm y la agitación se incrementa entre 200 y 800 rpm dependiendo de la pO<sub>2</sub> (presión de oxígeno disuelto), que se mantiene por encima del 30 %.
- una fase de producción de enzimas. Cuando el sustrato inicial del fermentador se agota, se inyecta continuamente una solución de lactosa a 250 g/l a un caudal de 35 a 45 mg por g de células y por hora hasta 164 horas. La temperatura se reduce a 25° C y el pH a 4 hasta el final del cultivo. El pH se regula mediante la adición de una solución de amoníaco 5,5 N que proporciona el nitrógeno necesario para la síntesis de proteínas excretadas. El contenido de oxígeno disuelto se mantiene por encima del 15 al 20 % debido a la acción de la ventilación y agitación.

Después de la producción de las enzimas, a través del método de Lowry y BSA estándar, se realiza la determinación de las proteínas extracelulares, tras separar mediante filtración el micelio o las células formadas). La concentración final de proteínas obtenida es igual a 45 g/l.

Después de esta etapa de producción, se procede a una separación del mosto de los hongos del sobrenadante de cultivo. El mosto se presó para extraer un máximo de sobrenadante (figura 7) y se pesó. Este se colocó en un recipiente cerrado a 4° C durante 72 h.

Se tomaron muestras del sobrenadante liberado después de la autólisis del hongo cada 24 h hasta las 72 h. A las 72 h se pesó el peso del líquido final. Que equivale al 30 % del peso del mosto. En la figura 8 se muestran las determinaciones de las concentraciones de las proteínas. Se aprecia que la concentración se triplica con respecto a la producción final de enzimas así como a la actividad β-glucosidasa (figura 9)

Ejemplo 2: en relación a las figuras 10 a 13.

La figura 10 muestra la actividad β-glucosidasa medida al final del cultivo y después de 72 h de autólisis del hongo a 4° C y 20° C.

La figura 11 muestra la actividad específica β-glucosidasa (UI/mg) obtenida después de las dos series de separación. La figura 12 muestra la actividad específica FPasa (UI/mg) obtenida después de las dos series de separación. La figura 13 corresponde a la identificación de enzimas en la etapa de separación.

El procedimiento se lleva a cabo en un conductor de 6 m<sup>3</sup>. El hongo *Trichoderma reesei* CL847 se cultiva en las mismas condiciones que las descritas en el ejemplo 1. Al final de la fase de producción, las enzimas se separan en 4 etapas: una etapa de decantación, una etapa de centrifugación, una etapa de microfiltración y una etapa de ultrafiltración.

Estas cuatro etapas se muestran esquemáticamente en la figura 6. Las tres primeras etapas son para eliminar el hongo y la última etapa (ultrafiltración) es para concentrar las enzimas producidas.

Todas las fracciones de hongos recuperadas (lodo de decantación, crema centrífuga y retenido de microfiltración), se colocan en el biorreactor enfriado a 8° C durante 72 h y se diluyen con agua hasta un volumen final igual a 4m<sup>3</sup>. El mosto se somete a una segunda serie de separación: centrifugación, microfiltración y ultrafiltración.

La cantidad de enzimas recuperadas al final de la segunda serie de separación es similar a la obtenida al final de la primera, es decir, aproximadamente 70 kg de proteínas después de la primera serie de separación y 64 kg en la segunda serie de separación. Por el contrario, es interesante observar que la actividad β-glucosidasa (figura 11) y la actividad FPasa (figura 12) específicas del cóctel enzimático obtenido es un 20 % más alto después de la etapa de enfriamiento (autólisis del hongo). Por consiguiente, el cóctel enzimático recuperado es mucho más eficiente.

Se realizaron electroforesis bidimensionales para detectar ver si hubo un cambio significativo en la composición del cóctel enzimático durante las etapas de separación. A partir de muestras previamente desaladas en FPLC [siglas del inglés *fast protein liquid chromatography*, cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad], con depósitos de 200 mg en el gel 2D y tinción con azul Comassie, las proteínas se separaron según su masa molecular y su punto isoeléctrico. En la figura 13 se muestran los genes escaneados, correspondiendo la figura 13a a la crema y la figura 13b al jugo transparente.

5 Las enzimas principales se identificaron durante la etapa de centrifugación en el jugo transparente y en la crema. Se observa una diferencia notable en los perfiles de los geles. Las cremas de centrifugación revelan  $\beta$ -xilosidasas. Esta actividad se midió en pnp-xilosa para su confirmación y se descubrió una actividad específica aproximadamente 3 veces superior en las cremas con respecto al cóctel enzimático obtenido al final de la producción (1,2 UI/mg en las cremas y 0,4 UI/mg en la muestra final del fermentador).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para aumentar el nivel de  $\beta$ -glucosidasa y/o  $\beta$ -xilosidasa en un cóctel de enzimas de un microorganismo celulolítico que produce celulasas y/o hemicelulasas, que comprende:
- una etapa de producción de enzimas con la obtención de un medio que contiene enzimas y un mosto de microorganismos, estando dicho mosto separado o no del líquido que contiene dichas enzimas,
  - una etapa de enfriamiento dicho mosto a una temperatura comprendida entre 4 y 20° C, que es una temperatura inferior a la temperatura de la etapa de producción de enzimas y durante un tiempo comprendido entre 12 y 90 h de manera que:
- 10
- la concentración de  $\beta$ -glucosidasa o  $\beta$ -xilosidasa del líquido obtenido en la etapa de enfriamiento es superior a la del líquido obtenido en la etapa de producción de enzimas,
  - y/o
  - la relación de volumen de sólido/volumen total, es inferior a dicha relación para la etapa de producción de enzimas,
- 15
- al final de la etapa de enfriamiento se obtiene un cóctel enzimático,
- 20 perteneciendo el microorganismo al género *Trichoderma*.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el tiempo de la etapa de enfriamiento está comprendido entre 24 y 72 h.
- 25 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que, al final de la etapa de producción de enzimas, el mosto se separa del líquido.
4. Procedimiento según la reivindicación anterior, en el que dicho mosto se separa y se diluye con agua.
- 30 5. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que, al final de la fase de producción de enzimas, el mosto no está separado del líquido.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que, después de la etapa de enfriamiento, el cóctel enzimático se separa del mosto y se obtiene un mosto residual.
- 35 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 3 o 4 y 6, en el que la separación tiene lugar mediante al menos una centrifugación o filtración/prensado o microfiltración, opcionalmente precedida de una decantación.
8. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que las enzimas del líquido separado pueden concentrarse, por ejemplo, por ultrafiltración.
- 40 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de enfriamiento se realiza a un pH comprendido entre 3,5 y 5,5.
- 45 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de enfriamiento se realiza en una atmósfera empobrecida en oxígeno, preferentemente en una atmósfera anaerobia.
11. Procedimiento según la reivindicación anterior, en el que se inyecta un gas neutro, por ejemplo, dióxido de carbono o nitrógeno.
- 50 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el microorganismo pertenece al género *Trichoderma reesei*, y se trata, preferentemente, de la cepa CL847.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho mosto residual se somete a una etapa de enfriamiento, y al final de la etapa de enfriamiento, se obtiene un cóctel enzimático, separado o no del mosto residual, y preferentemente dicho cóctel se separa del mosto residual de dicha etapa de enfriamiento.
- 55 14. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que los cócteles enzimáticos obtenidos del mosto se mezclan.
- 60 15. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que al menos un cóctel enzimático se mezcla con el líquido separado que contiene las enzimas y que se obtiene en la etapa de producción de enzimas.



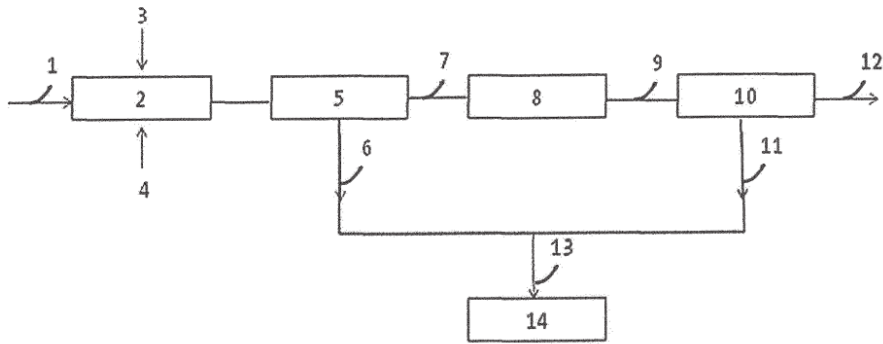


FIG. 1

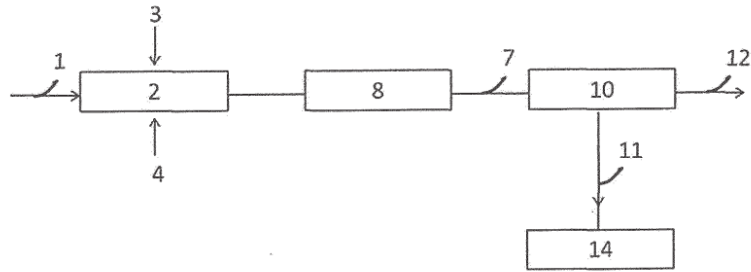


FIG. 2

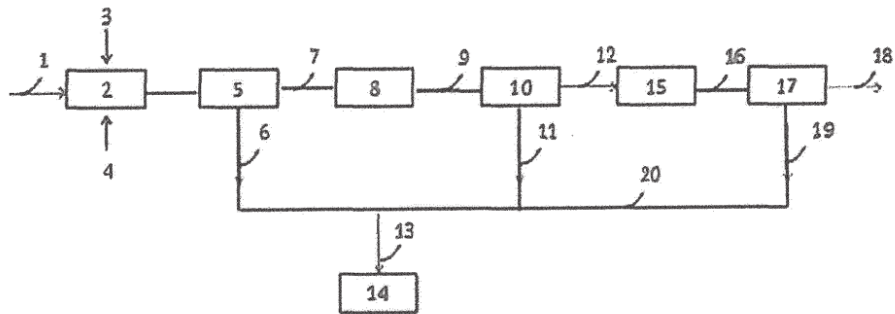


FIG. 3

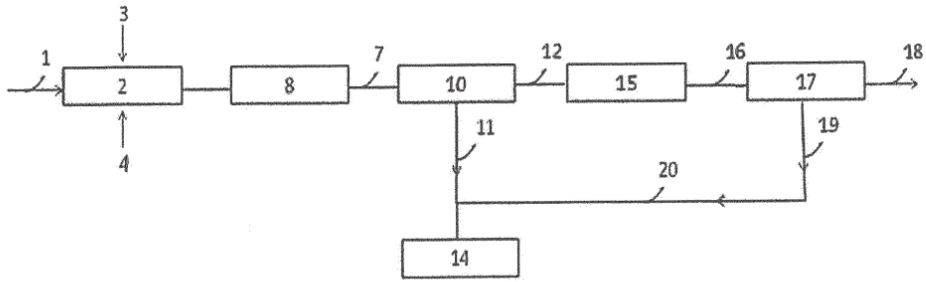


FIG. 4

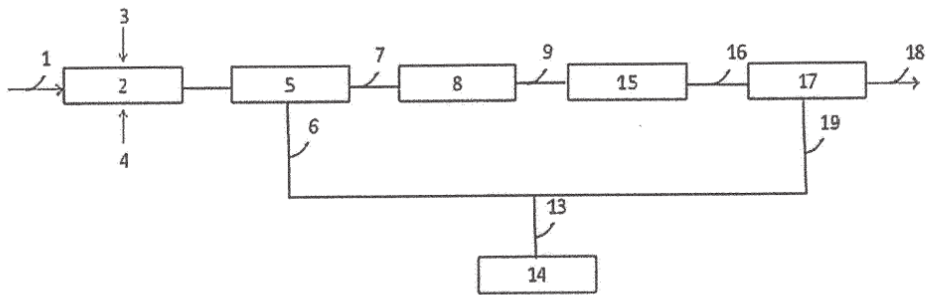


FIG. 5

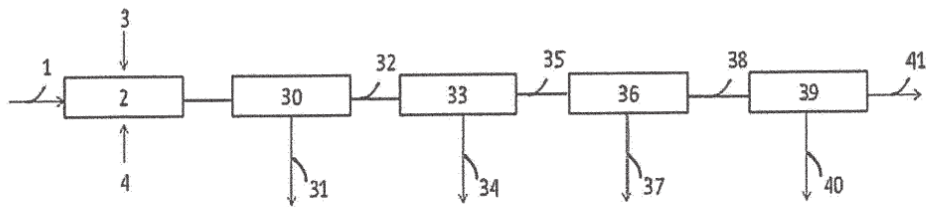


FIG. 6

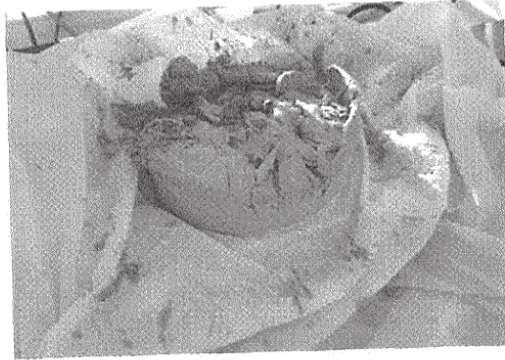


FIG. 7

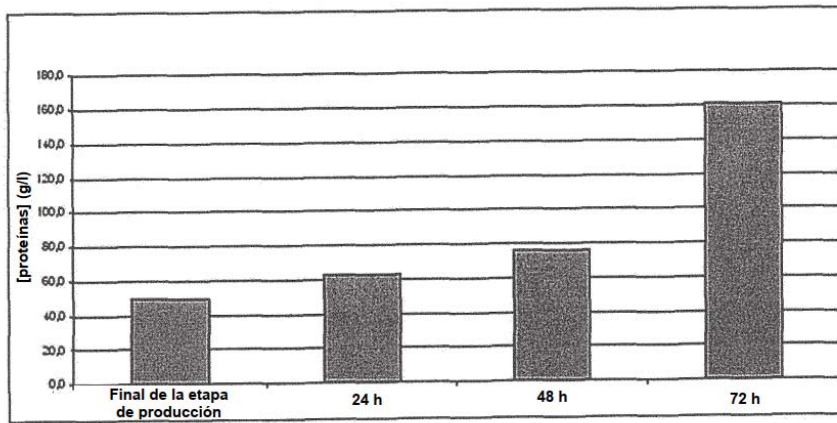


FIG. 8

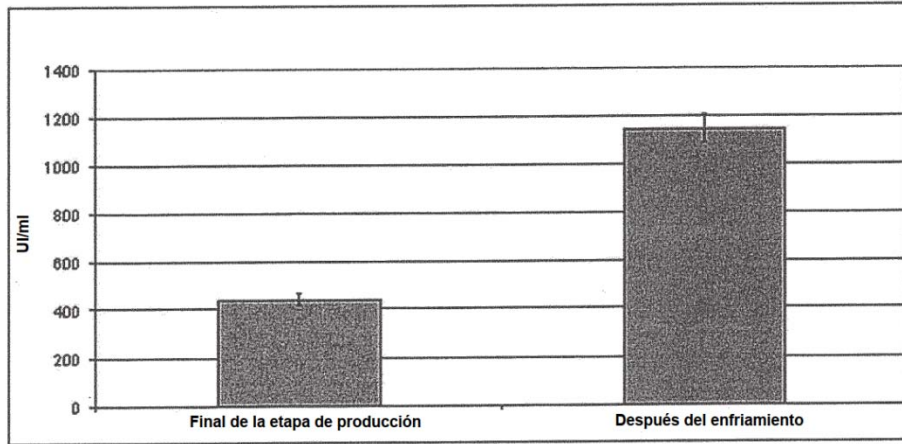


FIG. 9

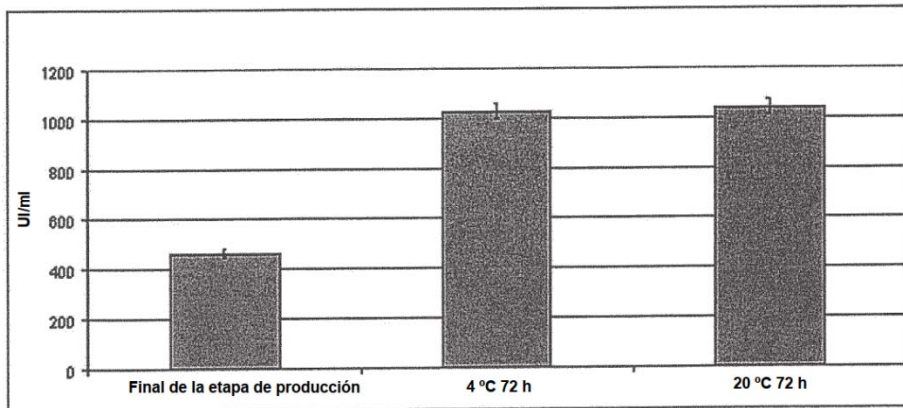


FIG. 10

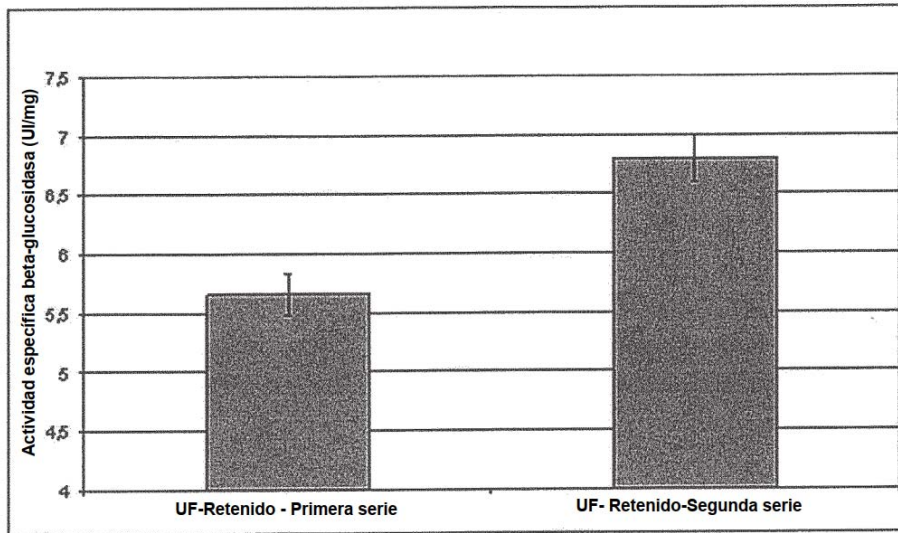


FIG. 11

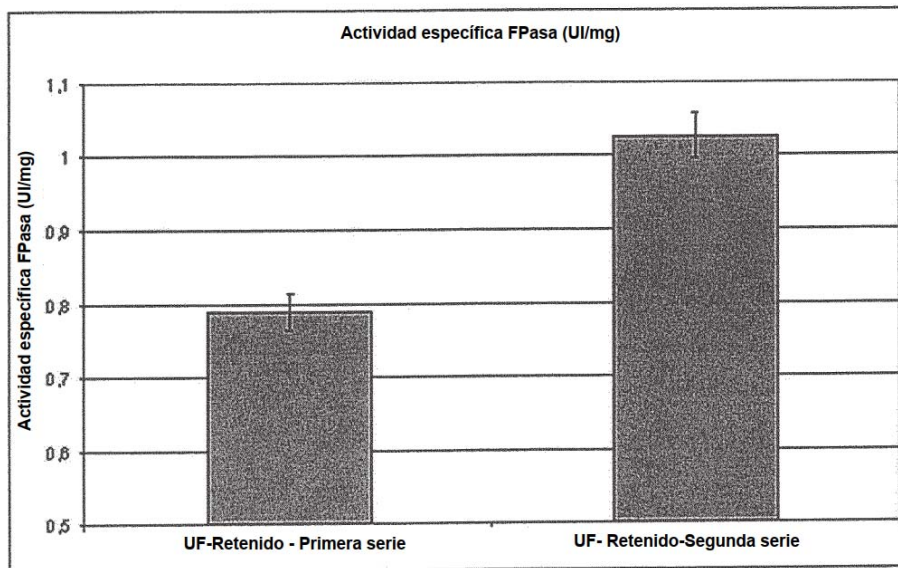


FIG. 12

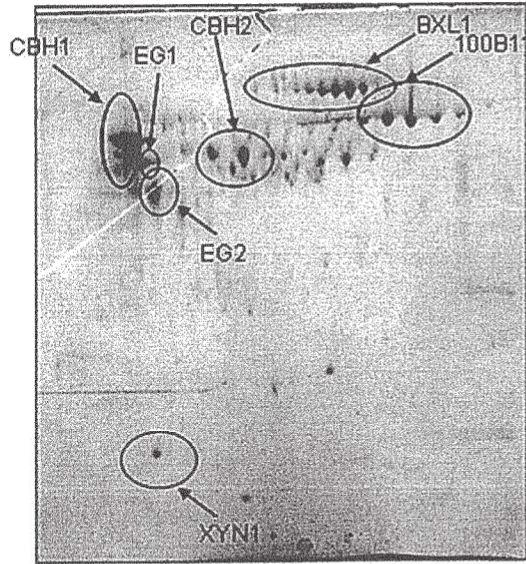


Figura 13a

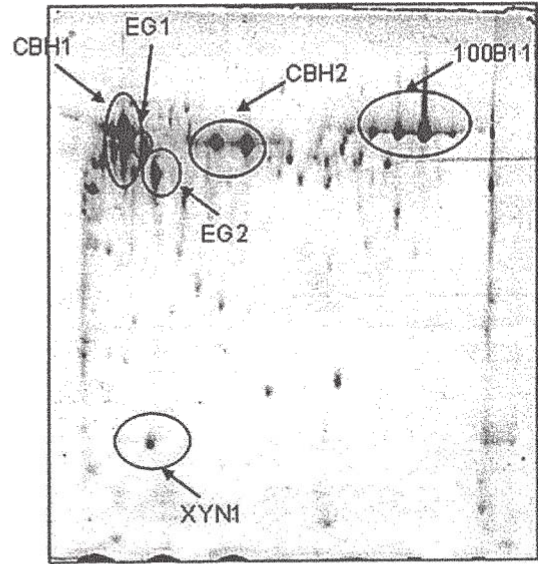


Figura 13b