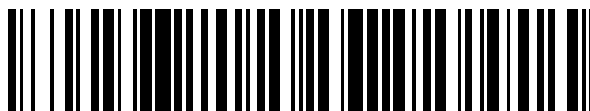


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 852 425**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

C12P 7/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2018** **E 18191590 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2020** **EP 3461902**

54 Título: **Procedimiento de hidrólisis enzimática en alimentación secuencial con adiciones del sustrato pretratado cada vez con más espacio en el tiempo**

30 Prioridad:

28.09.2017 FR 1759033

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.09.2021

73 Titular/es:

IFP ENERGIES NOUVELLES (100.0%)
1 & 4, Avenue de Bois-Préau
92852 Rueil-Malmaison Cedex, FR

72 Inventor/es:

BATTISTA, FEDERICO;
GOMEZ ALMENDROS, MÉLANIE y
ROUSSET, ROMAIN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 852 425 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 hidrólisis enzimática en alimentación secuencial con adiciones del sustrato pretratado cada vez con más espacio en el tiempo

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de hidrólisis enzimática a partir de un sustrato lignocelulósico pretratado en modo de alimentación secuencial, definido de acuerdo con las reivindicaciones, que permite la conversión de celulosa en glucosa. A continuación, la glucosa se puede utilizar en varias etapas posteriores como, por ejemplo, en una etapa de fermentación para la producción de alcoholes o para la producción de productos intermedios para la química.

Técnica anterior

El desarrollo de procedimientos económicamente viables para mejorar la biomasa lignocelulósica es un tema de gran actualidad hoy en día. La escasez de recursos fósiles y la competencia con los recursos alimentarios están llevando a la búsqueda de nuevas vías para la producción de biocombustibles y productos químicos intermedios.

Desde la década de los '70, la transformación de biomasa lignocelulósica después de la hidrólisis de los polisacáridos constituyentes en azúcares ha sido objeto de numerosos estudios.

La biomasa lignocelulósica se caracteriza por una estructura compleja formada por tres polímeros principales: celulosa, hemicelulosas y lignina, cuya proporción varía De acuerdo con la especie de biomasa lignocelulósica. Una composición típica pero no limitante es la siguiente: la celulosa está presente en una cantidad del 35 al 50%, las hemicelulosas que son polisacáridos que consisten esencialmente en pentosas y hexosas están presentes en una cantidad del 20 al 30% y las ligninas en una cantidad del 20 al 30%, del 15 al 25% en peso. La degradación de la biomasa resulta difícil debido a que los polisacáridos de la pared vegetal (celulosa y hemicelulosas) están íntimamente asociados con la lignina que le da rigidez a las paredes.

De estos tres polímeros, la celulosa es la principal fuente de azúcares porque consiste en glucosa, que se puede mejorar fácilmente.

Convencionalmente, los procedimientos para mejorar la biomasa por la ruta bioquímica incluyen varios pasos. Un primer paso es la recolección y transporte de la biomasa lignocelulósica a un centro de procesamiento de biomasa. El segundo paso es el pretratamiento o prehidrólisis de la biomasa que permite hacer accesible la celulosa a las enzimas y así producir un sustrato lignocelulósico pretratado. La tercera etapa de hidrólisis enzimática permite, mediante el uso de una solución de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas producidas por microorganismos, y denominado cóctel enzimático, la transformación de la celulosa en glucosa. Esta glucosa puede luego ser mejorada como productos intermedios, por ejemplo, como etanol durante una cuarta etapa de fermentación por, en general, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, o como una mezcla de acetona, butanol, etanol (ABE) por fermentación con la levadura *Clostridium acetobutylicum*. A continuación, un quinto paso de destilación permite concentrar las moléculas obtenidas. La glucosa también se puede utilizar como biocombustible (hidrógeno, metano).

Por tanto, una de las etapas clave es la hidrólisis enzimática. En la etapa de hidrólisis enzimática, dicho sustrato lignocelulósico pretratado debe mezclarse con una solución líquida que contiene las enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas. Siendo el objetivo obtener una alta concentración de azúcares, la etapa de hidrólisis enzimática debe realizarse a altas concentraciones de sustrato lignocelulósico pretratado, es decir, con un alto contenido de materia seca. Se ha evaluado que el procedimiento es económicamente viable, cuando se produce una concentración mínima de azúcares del 8% en peso durante la hidrólisis enzimática, lo que resulta en un contenido de materia seca de aproximadamente el 15% en peso (McIntosh, S., Zhang, Z., Palmer, J., Wong, H., Doherty, W.O.S., Vancov, T., 2016. Pilot-scale cellulosic ethanol production using eucalyptus biomass pre-treated by dilute acid and steam explosion. *Biofuels, bioproducts and biorefining* 10 (4), 346-358). Trabajar con un alto contenido de materia seca también permite reducir el volumen del reactor y, en consecuencia, reducir los costos económicos y energéticos del procedimiento (Larsen, J., Ostergaard Petersen, M., Thirup, L., Wen Li, H., Krogh Iversen, F., 2008).

El procedimiento IBUS de bioetanol lignocelulósico cercano a una realidad comercial. *Chem. Ing. Technol.* 31, 765-722).

Sin embargo, la mezcla íntima del sustrato lignocelulósico pretratado con dicha solución líquida que contiene enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas resulta difícil cuando los contenidos de materia seca son altos. De hecho, el inicio de la hidrólisis enzimática con un alto contenido de materia seca plantea en particular problemas de mezcla y homogeneización. El medio de reacción es muy pastoso y viscoso, lo que requiere una agitación específica mucho más compleja que la requerida al final de la hidrólisis cuando la mezcla de reacción se ha vuelto más líquida.

En general, la hidrólisis enzimática se puede realizar en reactores discontinuos o continuos. En un procedimiento discontinuo, o "batch" De acuerdo con la terminología inglesa, todos los componentes, incluidas las sustancias que controlan el pH, se introducen en el reactor al inicio de la hidrólisis. Durante el procedimiento de hidrólisis, no hay entrada ni salida del reactor. En un procedimiento continuo, existen flujos de entrada y salida, pero el volumen de reacción se mantiene constante.

En otra configuración de procedimiento, también llamado procedimiento con alimentación secuencial o procedimiento en modo "fed-batch" De acuerdo con la terminología inglesa, no se elimina nada del reactor durante el procedimiento, pero el sustrato se agrega gradualmente de forma secuencial en el reactor durante el período de hidrólisis. sin eliminar hidrolizado. Se ha encontrado que este tipo de alimentación de sustrato supera efectos tales como la inhibición del sustrato sobre el rendimiento del producto. A medida que avanza la reacción, la mezcla se vuelve cada vez más líquida y es posible añadir sustrato nuevo para aumentar el nivel de materia seca. Entonces es posible alcanzar concentraciones elevadas de sustrato y ventajosamente entre el 17 y el 30% en peso de materia seca.

Los procedimientos de hidrólisis enzimática con alimentación continua son conocidos en el estado de la técnica (Mondebach, A.A., Nokel, S.E., 2013. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A Review. Biomass and Bioenergy 56, 526-544).

De forma similar, la solicitud de patente US2010/330638A describe un pienso en modo "fed-batch" de la etapa de hidrólisis enzimática, indicando que las pruebas permiten determinar la cantidad de biomasa que se puede añadir a cada lote. Por tanto, es necesario realizar pruebas previas a la etapa de hidrólisis enzimática durante cada cambio de tipo de sustrato.

La solicitud WO2016/062646 describe un procedimiento para preparar un azúcar y/o un producto de fermentación a partir de material lignocelulósico que comprende varias etapas de hidrólisis enzimática, la primera de las cuales es en modo "alimentado por lotes".

La solicitud de patente US 2010/0255554 describe un procedimiento para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica en modo "fed-batch" en el que los parámetros operativos del procedimiento se ajustan controlando el volumen del reactor y/o la frecuencia de adición de la carga de biomasa lignocelulósica pretratada y opcionalmente la adición de enzimas, y el volumen y/o la concentración de azúcares producidos en el reactor. En particular, la materia prima de biomasa lignocelulósica pretratada siempre se añade con la misma frecuencia en el reactor.

El Solicitante ha desarrollado un procedimiento de hidrólisis enzimática con alimentación secuencial ("fed-batch") mejorada que permite obtener altos rendimientos de glucosa reduciendo el consumo energético del procedimiento y el tiempo de mezcla.

Más en particular, la presente invención se refiere a un procedimiento de hidrólisis enzimática en alimentación secuencial en el que al menos un sustrato lignocelulósico pretratado con agua y con enzimas se pone en contacto, con agitación, en un reactor, estando dicho procedimiento caracterizado porque la adición secuencial al reactor del sustrato lignocelulósico pretratado se realiza cada vez más espaciada en el tiempo, para obtener un contenido de materia seca final predeterminado.

Cuando el sustrato lignocelulósico pretratado, y preferiblemente también las enzimas, se inyectan en un procedimiento de hidrólisis enzimática con alimentación secuencial ("fed-batch") cada vez más espaciada en el tiempo, se observa un aumento del rendimiento de glucosa y una disminución de la energía consumo en comparación con un procedimiento de "alimentación por lotes" en el que el sustrato se agrega regularmente a lo largo del tiempo.

Además, cuando las enzimas se añaden de la misma forma, es decir, secuenciales y espaciadas en el tiempo, y preferiblemente al mismo tiempo que el sustrato, se observa un efecto sinérgico en el rendimiento de glucosa que no se aprecia cuando todos los las enzimas se añaden al inicio de la hidrólisis enzimática.

El documento de Rosgaard L. et al. 2007: "Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw", in Applied Biochemistry and Biotechnology, part A, 143(1): 27-40), describe un procedimiento para la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica, incluida la biomasa, ya sea una vez al comienzo, o dos o tres veces, con espaciamientos entre dos adiciones aumentando durante un período de 72 horas. Sin embargo, los resultados indican que la eficiencia de la operación de hidrólisis enzimática es menor con adiciones secuenciales.

Una ventaja de la presente invención es proporcionar un procedimiento de hidrólisis enzimática en el que se mejora el rendimiento de glucosa.

- Otra ventaja de la presente invención es la de proporcionar un procedimiento de hidrólisis enzimática en el que, gracias a la técnica de "fed-batch" pero espaciada en el tiempo, los problemas de mezcla y viscosidad no se observan o se observan poco. En efecto, gracias al aumento progresivo de la tasa de materia seca, la mezcla se realiza fácilmente con cada adición de sustrato, lo que permite, por un lado, reducir el consumo de energía de los agitadores y/o utilizar agitadores más simples del tipo agitador de palas inclinadas (también conocido con el nombre "Inclined Blades Impeller" De acuerdo con la terminología anglosajona) o del tipo de hélice marina (también conocido con el nombre de "Marine Impeller" De acuerdo con la terminología anglosajona).
- Además, otra ventaja de la presente invención es proporcionar un procedimiento de hidrólisis enzimática en el que la velocidad de rotación del agitador es baja, lo cual es importante para mantener la actividad enzimática (Mhlongo SI, Haan R, Viljoen-Bloom M, Zyl WH. Lignocellulosic hydrolysate inhibitors selectively inhibit/deactivate cellulase performance (2015). Enzyme and Microbial Technology, 81: 16-22).
- Además, el método De acuerdo con la invención es adecuado en el caso de que se traten simultáneamente varios sustratos de diferente naturaleza en el mismo reactor (coprocesamiento).
- Otra ventaja de la presente invención es proporcionar un procedimiento de hidrólisis enzimática que permite una monitorización y adaptación sencillas a la evolución del medio de reacción que no requiere medidas complejas.
- De acuerdo con una variante, el contenido de materia seca final es superior al 12% en peso, preferentemente entre el 18 y el 24% en peso.
- De acuerdo con una variante, la adición de las enzimas al reactor se realiza en forma secuencial y cada vez más espaciada en el tiempo.
- De acuerdo con una variante, el sustrato lignocelulósico pretratado y las enzimas se añaden al mismo tiempo al reactor.
- De acuerdo con una variante, en cada adición, el sustrato lignocelulósico pretratado se añade en una cantidad igual.
- De acuerdo con una variante, en cada adición, las enzimas se añaden en igual cantidad.
- De acuerdo con una variante, el reactor comprende un agitador y la relación de diámetro del agitador/diámetro del reactor D/T está comprendida entre 0,3 y 0,75.
- De acuerdo con una variante, el agitador es un agitador de palas inclinadas o también del tipo de hélice marina.
- De acuerdo con una variante, las enzimas se ponen en contacto a una concentración comprendida entre 0,1 y 60 mg de enzimas por gramo de celulosa.
- De acuerdo con una variante, el procedimiento opera a una temperatura entre 40 y 60 °C, a un pH entre 4 y 6, y a presión atmosférica.
- De acuerdo con una variante, Se utilizan diferentes sustratos lignocelulósicos pretratados, solos o en mezcla.
- De acuerdo con una variante, a dicho procedimiento le sigue una etapa de fermentación en presencia de un microorganismo alcohológeno.
- De acuerdo con otra variante, dicho procedimiento se lleva a cabo en presencia de un microorganismo alcohológeno
- De acuerdo con un procedimiento de sacarificación y fermentación simultáneas denominado procedimiento SSF.
- Descripción detallada de la invención
- La biomasa lignocelulósica pretratada se obtiene a partir de madera (madera dura y blanda), en bruto o tratada, subproductos agrícolas como paja, fibras vegetales, cultivos forestales, residuos vegetales productores de alcohol, azúcar y cereales, residuos de la industria del papel, biomasa marina (por ejemplo macroalgas celulósicas) o productos de transformación de materiales lignocelulósicos.
- Preferiblemente, la biomasa lignocelulósica utilizada es madera, paja de trigo, pulpa de madera, miscanto, paja de arroz o tallos de maíz.
- De acuerdo con el método de la invención, los diferentes tipos de biomasa lignocelulósica se pueden utilizar solos o en mezcla.

Los sustratos lignocelulósicos utilizados en el procedimiento de la invención se obtienen a partir de la biomasa pretratada en condiciones que permiten desestructurar la lignocelulosa modificando las propiedades físicas y fisicoquímicas del material lignocelulósico. La etapa de pretratamiento se puede llevar a cabo de acuerdo con todos los tipos de pretratamiento de biomasa lignocelulósica conocidos por los expertos en la técnica. También se puede llevar a cabo una etapa de acondicionamiento preliminar, que incluye, por ejemplo, el esmerilado o la eliminación de piedras. La etapa de pretratamiento puede ser un tratamiento térmico, químico, mecánico y/o enzimático o una combinación de estos tratamientos.

De acuerdo con una variante preferida, la etapa de pretratamiento se elige entre un pretratamiento en condiciones ácidas como un horneado ácido o una explosión de vapor en condiciones ácidas, un pretratamiento en medios alcalinos como un pretratamiento con sulfuro de sodio (procedimiento Kraft), un procedimiento ARP (de acuerdo con la terminología anglosajona "Ammonia Recycle Percolation") o un procedimiento AFEX (de acuerdo con la terminología anglosajona "Ammonia Fiber Explosion"), un pretratamiento oxidante como un pretratamiento con ozono, peróxido de hidrógeno, oxígeno o ácido peracético, un pretratamiento sin añadir reactivos químicos como explosión de vapor sin adición de ácido o pretratamiento mediante lavado con agua muy caliente, o procedimiento organosolv.

Ventajosamente, la etapa de pretratamiento es un pretratamiento por explosión de vapor en condiciones ácidas. En condiciones óptimas, de 150 a 250 °C durante unos minutos.

La presente invención se refiere a un procedimiento de hidrólisis enzimática en alimentación secuencial en el que se pone en contacto, con agitación, un sustrato lignocelulósico pretratado con agua y con enzimas en un reactor, caracterizándose dicho procedimiento porque la adición secuencial al reactor del sustrato lignocelulósico pretratado se lleva a cabo cada vez más espaciados en el tiempo, para obtener un contenido de materia seca final predeterminado.

El contenido de materia seca final predeterminado es preferiblemente superior al 12% en peso, preferiblemente entre el 15 y el 30% en peso, y preferiblemente entre el 18 y el 24% en peso. En el resto del texto, la concentración de sustrato lignocelulósico pretratado se expresa como porcentaje en peso de materia seca. El contenido de materia seca se mide de acuerdo con la norma ASTM E1756-08 (2015) "Standard Test Method for Determination of Total Solids in Biomass".

La tasa de materia seca al inicio del procedimiento de hidrólisis, durante la primera adición del sustrato lignocelulósico pretratado, es generalmente menos del 10% en peso, preferiblemente menos del 8% en peso y en particular, preferiblemente menos del 6% en peso.

La frecuencia de adición del sustrato lignocelulósico pretratado está cada vez más espaciada. Por lo tanto, se espera que las adiciones que están "cada vez más espaciadas en el tiempo" se agreguen con una frecuencia decreciente o, en otras palabras, con una frecuencia creciente. Por tanto, el tiempo transcurrido entre la n-ésima y la n + 1ª adición es menor que el tiempo transcurrido entre la n + primera adición y la n + segunda adición, y así sucesivamente. Por ejemplo, el tiempo entre la primera y la segunda adición de sustrato es menor que el tiempo entre la segunda y la tercera adición, y así sucesivamente. A modo de ejemplo, la primera adición se puede realizar después de 1 hora, la segunda después de 3 horas, la tercera después de 6 horas, la cuarta después de 13 horas y la quinta después de 24 horas.

Para lograr el contenido de materia seca final predeterminado, generalmente se procede, y cada vez más espaciados, al menos 3 adiciones de sustrato, preferiblemente al menos 4 adiciones de sustrato, y más aún más preferido al menos 5 adiciones de sustrato.

Las cantidades añadidas durante la adición de sustrato lignocelulósico pretratado generalmente representan un aumento en el contenido de sólidos de como máximo un 5% en peso, preferiblemente entre el 2 y el 5% en peso, e incluso más preferiblemente entre el 2 y el 3% en peso. La cantidad de sustrato añadida durante una adición representa, por ejemplo, el 3% en peso del contenido de materia seca.

De acuerdo con una variante, en cada adición, el sustrato lignocelulósico pretratado se añade en una cantidad igual.

De acuerdo con una variante preferida, la adición de las enzimas al reactor se realiza en forma secuencial y cada vez más espaciada en el tiempo. Se ha observado que la adición de enzimas en modo "fed-batch" espaciado hizo posible mantener la actividad enzimática en el tiempo, a diferencia de la adición de todas las enzimas desde el inicio de la hidrólisis enzimática.

El sustrato lignocelulósico pretratado y las enzimas se pueden añadir al mismo tiempo o escalonadas en el reactor, respetando la adición secuencial cada vez más espaciada en el tiempo de cada uno de los componentes. Preferiblemente, el sustrato lignocelulósico pretratado y las enzimas se añaden al mismo tiempo al reactor.

De acuerdo con una variante, con cada adición, las enzimas se agregan en una cantidad igual.

Las cantidades añadidas durante una adición están generalmente entre 0,1 y 60 mg de enzimas por gramo de celulosa, preferiblemente entre 5 y 40 mg de enzimas por gramo de celulosa y preferiblemente entre 10 y 30 mg de enzimas por gramo de celulosa.

La hidrólisis enzimática se lleva a cabo generalmente a un pH entre 4 y 6, preferiblemente entre 4,5 y 5,8 e incluso más preferiblemente entre 4,8 y 5,5. En general, tiene lugar a una temperatura entre 40 y 60 °C, y preferiblemente entre 45 y 55 °C. Ventajosamente, funciona a presión atmosférica.

La hidrólisis enzimática se realiza mediante enzimas producidas por un microorganismo. La solución enzimática agregada contiene enzimas que descomponen la celulosa en azúcares. Microorganismos, tales como hongos pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* o *Schizophyllum*, o bacterias anaerobias pertenecientes, por ejemplo, al género *Clostridium*, producen estas enzimas, que contienen en particular celulasas adecuadas para la hidrólisis extensiva de celulosa. Muy preferiblemente, las enzimas celulolíticas de la etapa d) son producidas por el microorganismo *Trichoderma reesei*.

De acuerdo con la invención, la duración del contacto durante la hidrólisis enzimática está comprendida entre 5 y 200 horas, preferentemente entre 2 y 100 horas y preferentemente entre 1 y 50 horas.

Dicho procedimiento según la presente invención puede seguirse midiendo a lo largo del tiempo el valor de una de las características reológicas del medio de reacción que se eligen ventajosamente entre la viscosidad del medio de reacción, el par del eje del sistema, la agitación y la potencia eléctrica consumida por el motor. La potencia eléctrica consumida por el motor se anota P_{elec} .

Durante el procedimiento de acuerdo con la invención, es decir, durante la licuefacción, la viscosidad del medio de reacción, el par del eje del sistema de agitación y la potencia eléctrica consumida por el motor son características de control reológico del sustrato lignocelulósico producido que tiene varias ventajas. De hecho, dichas características, viscosidad, par y potencia, están interrelacionadas. La potencia eléctrica consumida por el motor P_{elec} está ligada a la potencia mecánica P_{mec} que acciona el eje del agitador.

La potencia eléctrica consumida por el motor es un parámetro convencionalmente medido y monitorizado en instalaciones piloto o industriales.

Las siguientes fórmulas definen las relaciones entre los diferentes parámetros:

$P_{mec} = f(P_{elec})$, siendo f una característica de diseño del motor y dada por el fabricante del motor.

$P_{mec} = 2\pi N \cdot C$ en el que:

N es la velocidad de agitación en revoluciones por segundo,
 C es el par en N.m,
 y P_{mec} es la potencia en vatios.

En agitación tenemos la siguiente relación:

$$P_{mec} = \rho N_p N^3 D^5$$

ρ es la densidad del medio de reacción en $kg \cdot m^{-3}$

D es el diámetro del agitador en m,

N_p es una característica del agitador de acuerdo con la geometría del tanque y el régimen de flujo.

En régimen de flujo laminar, tenemos la siguiente relación:

$$N_p = A/Re, \text{ por lo tanto, } P_{mec} = \rho A N^3 D^5 / Re$$

siendo A una constante del sistema de agitación y Re el número de Reynolds y

siendo $\overline{\mu}$ la viscosidad dinámica media medida en Pascal segundos (Pa.s) del medio de reacción con

$$\overline{\mu} = P_{mec} / (A N^2 D^3) = 2\pi C / (A D^3 N)$$

Si la viscosidad y el par del eje del sistema de agitación son medidas de fácil acceso a pequeña escala, la potencia eléctrica consumida por el motor P_{elec} es la cantidad más fácilmente medible a escala industrial.

Muy preferiblemente, dicho método de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque se realiza una medición en el tiempo de la potencia eléctrica consumida por el motor.

Dicho procedimiento de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo ventajosamente en un reactor, preferiblemente en forma cilíndrica, que tiene una relación altura/diámetro ventajosamente entre 1 y 3.

Gracias al modo de "fed-batch" cada vez más espaciado, el efecto de la viscosidad es menos importante en el medio de reacción. Convencionalmente, el agitador elegido debe poder tratar flujos laminares. Entonces son necesarios amplios agitadores, incluso raspando la pared del reactor con velocidades de rotación moderadas y ejerciendo una acción de amasado y amasado. En el procedimiento según la invención, se pueden utilizar agitadores más sencillos, del tipo de agitadores de palas inclinadas o del tipo de hélice marina.

En particular, es posible utilizar agitadores con un diámetro menor en el método según la invención. De acuerdo con una variante, la relación D/T diámetro del agitador/diámetro del reactor se encuentra comprendida ventajosamente entre 0,3 y 0,75, y preferentemente entre 0,4 y 0,65.

Asimismo, la velocidad de rotación puede ser menor que en el sistema convencional. La velocidad de rotación es generalmente menor de 100 rpm (rotaciones por minuto), preferiblemente menor de 80 rpm.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el procedimiento de hidrólisis enzimática según la invención puede ir seguido de una etapa de fermentación alcohólica por un microorganismo alcohológeno para producir un efluente fermentado que contiene alcohol.

La hidrólisis enzimática y la fermentación alcohólica también se pueden realizar simultáneamente. En este caso se habla de un procedimiento "SSF" (de acuerdo con el término anglosajón "Simultaneous Saccharification and Fermentation"). La hidrólisis enzimática y la fermentación alcohólica también se pueden implementar de acuerdo con otras disposiciones conocidas por los expertos en la técnica, como el procedimiento "PSSF" ("Presaccharification followed by Simultaneous Saccharification and Fermentation" de acuerdo con el término anglosajón) o nuevamente el "HHF" procedimiento ("Hybrid Hydrolysis and Fermentation", de acuerdo con el término anglosajón).

Los azúcares obtenidos por hidrólisis enzimática pueden fermentarse en alcoholes como etanol, 1,3-propanodiol, isopropanol, 1-butanol, isobutanol o 1,4-butanodiol, solos o mezclados. Preferiblemente, la fermentación alcohólica produce etanol.

La fermentación alcohólica está asegurada por levaduras u otros microorganismos alcohológenos. Para los propósitos de la presente invención, la expresión "fermentación alcohólica" denota un procedimiento para la fermentación de azúcares en alcohol(es) usando solo microorganismos. Los microorganismos alcohológenos utilizados durante la etapa de fermentación alcohólica de las hexosas se eligen preferiblemente entre levaduras y bacterias, eventualmente modificadas de manera genética.

Cuando el microorganismo alcohólico es una levadura, *Saccharomyces cerevisiae* es el más eficaz. También es posible elegir levaduras como *Schizosaccharomyces pombe* o *Saccharomyces uvarum* o *diastaticus*. También son de interés más levaduras termófilas, como *Kluyveromyces fragilis* (ahora a menudo denominada *K. marxianus*), en particular cuando la hidrólisis enzimática y la fermentación alcohólica se llevan a cabo simultáneamente (procedimiento SSF).

También se puede utilizar un organismo modificado genéticamente como, por ejemplo, una levadura del tipo *Saccharomyces cerevisiae* como TMB 3400 (Ohgren et al, J. of Biotech 126, 488-498, 2006).

Cuando el microorganismo alcohológeno sea una bacteria, se preferirá *Zymomonas mobilis*, que tiene una ruta de asimilación eficiente para la producción de etanol, o bacterias anaerobias del género *Clostridium*, como, por ejemplo, *Clostridium acetobutylicum* para la producción de mezclas de alcoholes y disolventes como acetona-butanol-etanol (ABE) o isopropanol-butanol-etanol (IBE), o también *Escherichia coli* para la producción de isobutanol, por ejemplo.

La fermentación alcohólica se realiza preferentemente a una temperatura entre 30 °C y 40 °C, y un pH entre 3 y 6,5.

Las levaduras, y preferentemente *Saccharomyces cerevisiae*, son los microorganismos empleados de forma muy preferente. Tienen mayor robustez y seguridad, y no requieren esterilidad para la conducción del procedimiento y las instalaciones.

Las levaduras del género *Saccharomyces* son capaces de fermentar las únicas hexosas (principalmente glucosa y manosa). Estas levaduras optimizan el uso de hexosas en etanol y permiten obtener buenos rendimientos de conversión.

Cuando la hidrólisis enzimática y la fermentación alcohólica se llevan a cabo en una misma operación (procedimiento SSF), la temperatura está preferiblemente entre 30 y 45 °C, y el pH entre 4 y 6 para favorecer el comportamiento de la levadura.

- 5 El siguiente ejemplo de funcionamiento ilustra el método según la invención.

EJEMPLOS

- 10 Se llevó a cabo un procedimiento de hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada con alto contenido de materia seca (MS) mediante alimentación secuencial (fed-batch) en forma cada vez más espaciada. A diferencia de las estrategias convencionales de lotes alimentados, donde las adiciones son regulares en el tiempo, esta nueva estrategia consiste en aumentar secuencialmente el contenido de materia seca con adiciones cada vez más espaciadas en el tiempo. Las Figuras 1a y 2a muestran adiciones de acuerdo con la técnica de alimentación discontinua convencional, mientras que las Figuras 1b y 2b muestran adiciones de acuerdo con la técnica de alimentación discontinua cada vez más espaciadas en el tiempo. Las Figuras 2 son ampliaciones de las figuras 1 en la escala de tiempo.

- 20 Todo el contenido de agua (1,3 kg) y una primera adición de sustrato de paja de trigo pretratado (250 g), suficiente para llegar a una concentración del 5% en peso de materia seca, se cargan en el reactor al inicio del ensayo. Luego, se producen cinco adiciones iguales de 170 g de sustratos lignocelulósicos después de 1, 3, 6, 13 y 24 horas para llegar al 20% en peso de materia seca (Figuras 1b y 2b). La adición de enzimas se realizó de la misma forma. Con esta estrategia, es posible una licuefacción gradual de las partículas de los sustratos, sin superar el valor crítico de viscosidad que no permitía una mezcla adecuada con agitadores de palas inclinadas o incluso del tipo de hélice marina.

- 25 El método según la invención permite conseguir un rendimiento de glucosa del 80 al 85%, con un bajo consumo energético de entre 35-40 kJ en 48 h de hidrólisis enzimática. En particular, el consumo de energía obtenido por el procedimiento de acuerdo con la invención en 48 h fue el mismo que el obtenido en solo 5 h por otras estrategias de fed-batch. En efecto, se observa que la glucosa tiene un aumento exponencial en las primeras 24 horas de la prueba, donde hay una intensa actividad de conversión de celulosa por celulasa. Posteriormente, el crecimiento es más lento: en las primeras horas se registró un aumento de 50 a 90 g de glucosa por cada kJ consumido en la mezcla; después de 24 horas fue de 10-15 g/kJ y después de 48 horas disminuyó en menos de 10 g/kJ.

- 35 Asimismo, la velocidad de rotación del sistema de mezcla es lenta (aproximadamente 80 rev/min). Las enzimas son proteínas de estructura molecular, estabilizadas por fuerzas débiles. Esta mala estabilización implica que las proteínas se ven afectadas por diferentes parámetros. El estrés mecánico es un factor que puede reducir la actividad enzimática.

- 40 La estrategia de adiciones secuenciales cada vez más espaciadas en el tiempo también se puede adoptar para las enzimas. La Figura 3 muestra la diferencia entre una adición de la cantidad total de enzimas al inicio de la prueba (ZE, Figura 3) y adiciones secuenciales, concomitantemente con las adiciones secuenciales de los sustratos (GE, Figura 3).

- 45 La Figura 3 muestra que el crecimiento de glucosa es muy rápido si la cantidad de enzimas (52,8 g) se suministra en su totalidad al inicio de la hidrólisis enzimática. Sin embargo, esto implica una producción demasiado rápida de glucosa en el medio de reacción, lo que provoca la inhibición de las enzimas y, en consecuencia, la producción de glucosa. Por el contrario, la adición gradual de enzimas (8,8 g por cada adición, cada vez más espaciadas en el tiempo) permite reemplazar las enzimas inhibidas y obtener una mayor producción de glucosa al final del procedimiento (Figura 3).

50

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de hidrólisis enzimática en alimentación secuencial en el que al menos un sustrato lignocelulósico pretratado con agua y con enzimas se pone en contacto, con agitación, en un reactor, caracterizado dicho procedimiento porque la adición secuencial en el reactor del sustrato lignocelulósico pretratado se lleva a cabo cada vez más espaciada en el tiempo, para obtener un contenido final predeterminado de materia seca comprendido entre el 18 y el 30% en peso.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el contenido de materia seca final está comprendido entre el 18 y el 24% en peso.
3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se procede a al menos 4 adiciones espaciadas de sustrato lignocelulósico pretratado, y preferiblemente al menos 5 adiciones.
4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la cantidad de sustrato lignocelulósico añadida durante una adición representa entre el 2 y el 3% en peso de materia seca.
5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que la adición de las enzimas al reactor se realiza en forma secuencial y cada vez más espaciada en el tiempo.
6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que el sustrato lignocelulósico pretratado y las enzimas se añaden al mismo tiempo al reactor.
7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que, en cada adición, el sustrato lignocelulósico pretratado se añade en una cantidad igual.
8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que en cada adición, las enzimas se añaden en una cantidad igual.
9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que el reactor comprende un agitador y la relación de diámetro del agitador/diámetro del reactor D/T está comprendida entre 0,3 y 0,75.
10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que el agitador es un agitador de palas inclinadas o del tipo de hélice marina.
11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el reactor comprende un agitador accionado por un motor y porque se realiza una medición en el tiempo de la potencia eléctrica consumida por el motor.
12. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el reactor comprende un agitador accionado por un motor y porque la velocidad de rotación del agitador es inferior a 100 rpm, preferiblemente inferior a 80 rpm.
13. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que las enzimas se ponen en contacto a una concentración comprendida entre 0,1 y 60 mg de enzimas por gramo de celulosa.
14. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que el procedimiento opera a una temperatura comprendida entre 40 y 60 °C, a un pH comprendido entre 4 y 6, y a presión atmosférica.
15. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que se utilizan diversos sustratos lignocelulósicos pretratados, solos o en mezcla.
16. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho procedimiento va seguido de una etapa de fermentación en presencia de un microorganismo alcohológeno.
17. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, donde dicho procedimiento se lleva a cabo en presencia de un microorganismo alcohológeno según un procedimiento de sacarificación y fermentación simultáneas.

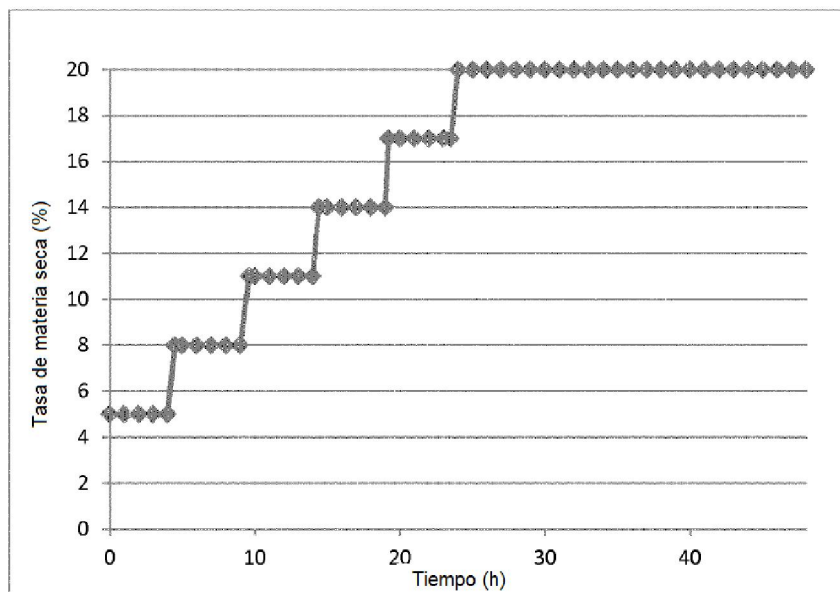


Figura 1a

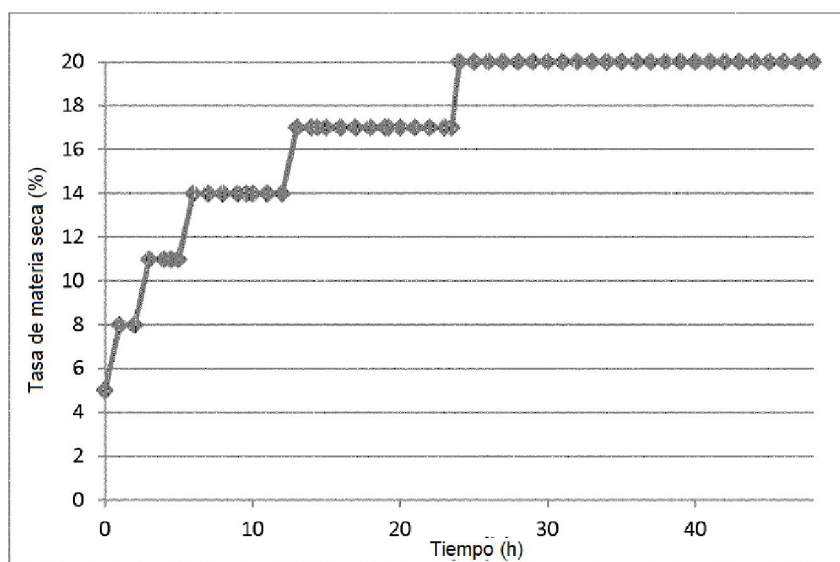


Figura 1b

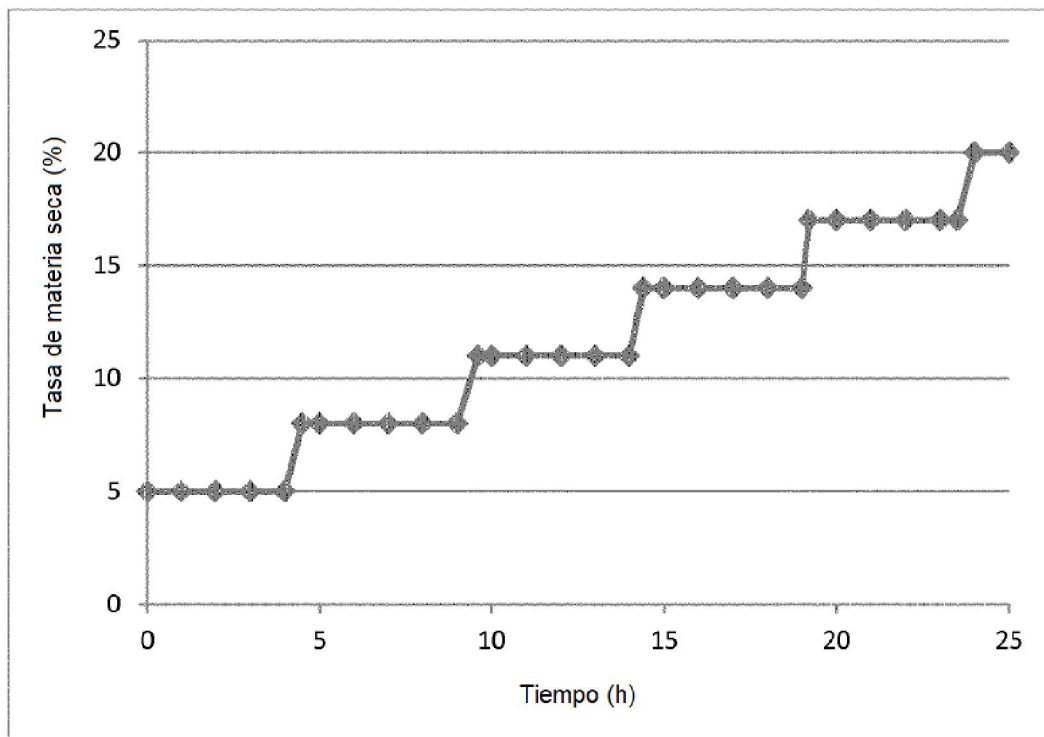


Figura 2a

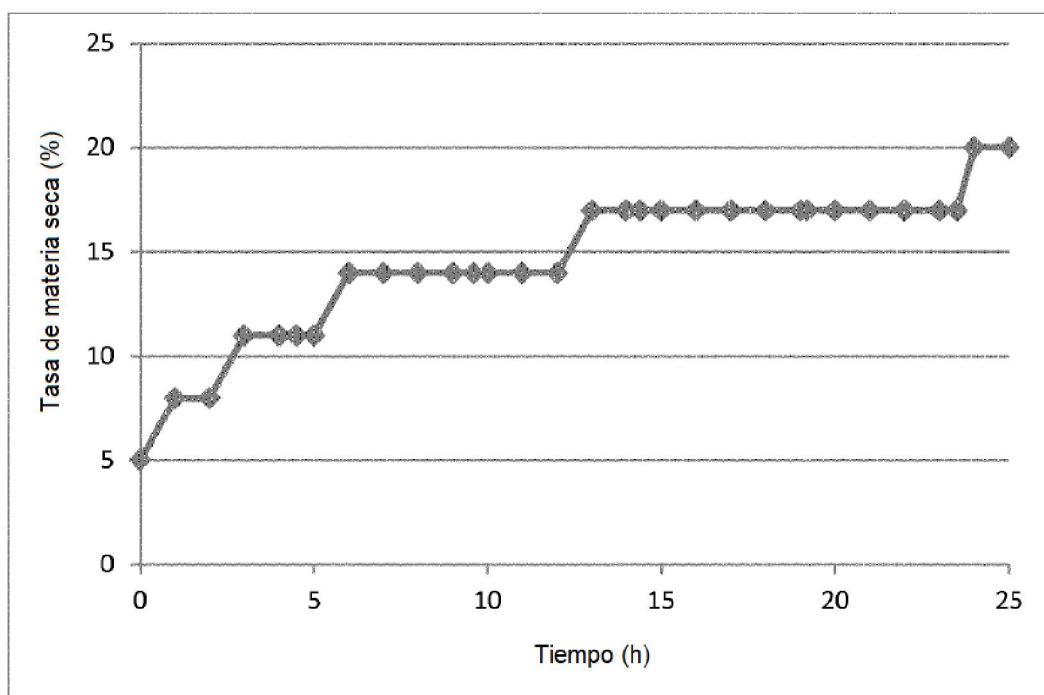


Figura 2b

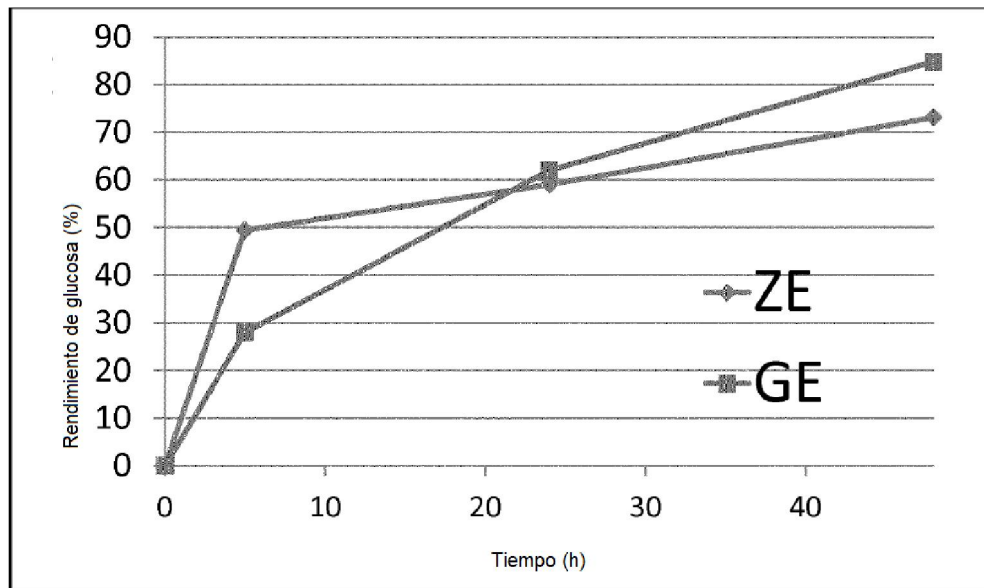


Figura 3