



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 326 485**

51 Int. Cl.:  
**C12P 7/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05748648 .2**

96 Fecha de presentación : **06.06.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1751296**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.02.2007**

54 Título: **Procedimiento para producir etanol.**

30 Prioridad: **04.06.2004 FI 20040775**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.10.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.10.2009**

73 Titular/es:  
**VALTION TEKNILLINEN TUTKIMUSKESKUS**  
**Vuorimiehentie 3**  
**02150 Espoo, FI**

72 Inventor/es: **Penttilä, Merja;**  
**Siika-Aho, Matti;**  
**Uusitalo, Jaana y**  
**Viikari, Liisa**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

**ES 2 326 485 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 para producir etanol.

**5 Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la producción de etanol. En concreto, la presente invención se refiere a un nuevo  
10 procedimiento para la conversión de material lignocelulósico fibroso en etanol mediante fermentación.

**Descripción de la técnica relacionada**

La conversión de biomasa en energía combustible ha recibido una creciente atención como un medio de sustituir  
15 la energía derivada de combustibles fósiles. De los biocombustibles líquidos (etanol, metanol, metiléster de ácidos grasos), el etanol tiene un largo historial probado y ventajas medioambientales. Se puede producir a partir de diversas materias primas. Tradicionalmente, el etanol se ha producido a partir de almidón o de productos agrícolas de base azúcares, pero hoy en día la atención se centra en diferentes residuos agrícolas y forestales o en flujos secundarios de la industria forestal. Una ventaja ambiental muy importante de la producción del etanol es que se genera poco  
20 CO<sub>2</sub>, siempre y cuando la materia prima provenga de residuos de desecho renovables o madera. Actualmente, el coste del etanol producido a partir de materias primas que contienen lignocelulosa es todavía demasiado elevado por diversos motivos. Entre las barreras están los elevados costes de las tecnologías de conversión de la lignocelulosa, una concentración y rendimiento de etanol bajos, así como los bajos porcentajes de producción, todo lo cual aumenta los costes del etanol producido a partir de lignocelulósicos, en comparación con el etanol producido a partir de materias  
25 primas basadas en almidón o azúcar.

La conversión de madera o materiales lignocelulósicos derivados de la agricultura en azúcares y después en etanol es un procedimiento complejo que implica varias etapas (pretratamiento, potencial separación de sólidos, hidrólisis de la celulosa, producción de etanol a partir de celulosa y hemicelulosa y destilación del etanol). Dependiendo de la  
30 materia prima, son necesarios diferentes tipos de técnicas de pretratamiento. Generalmente es necesaria una etapa de pretratamiento para mejorar la hidrolizabilidad de la parte celulósica. El objetivo del pretratamiento es hacer que los materiales de la biomasa sean más accesibles a una hidrólisis bien química o bien enzimática para una producción eficaz de azúcares a partir de celulosa y hemicelulosa. Los objetivos del pretratamiento son extraer y separar la hemicelulosa de la celulosa, romper y extraer el recubrimiento de lignina, disminuir la cristalinidad de la celulosa, aumentar el área superficial accesible de la celulosa y aumentar el tamaño de poro de la celulosa para facilitar la penetración de los agentes hidrolizantes (Chang y Holtzaple, 2000).  
35

Hay disponibles descripciones detalladas de diversas tecnologías de pretratamiento (recogidas, por ejemplo, por Hsu y col., 1996). De las diversas opciones de pretratamiento, la explosión por vapor (con impregnación de ácido sulfúrico y con dióxido de azufre) es uno de los procedimientos más ampliamente estudiados (Chandrakant y Bisaria, 1998).  
40

La digestibilidad máxima de la celulosa generalmente coincide con la extracción completa de la hemicelulosa. Por tanto, en los procedimientos de pretratamiento eficaces, la mayor parte de la hemicelulosa se solubiliza y forma una fracción soluble que contiene principalmente azúcares derivados de la hemicelulosa (denominada “filtrado de hemicelulosa”). El filtrado crudo de hemicelulosa del pretratamiento generalmente contiene varios productos de la degradación de la lignocelulosa. Éstos pueden ser productos de la descomposición de azúcares y lignina, incluyendo furfural, hidroximetilfurfural y ácidos fórmico y acético. La mayoría de estos componentes son tóxicos para las enzimas y microorganismos, ralentizando el procedimiento posterior de hidrólisis y fermentación. Se han investigado  
50 diversos procedimientos diferentes de destoxicación (Gong y col., 1999). Entre los procedimientos estudiados se encuentran la neutralización con cal, el tratamiento con carbón y diferentes resinas de adsorción. Inhibidores en el filtrado de hemicelulosa han mostrado una fuerte disminución de los porcentajes tanto de la hidrólisis como de la fermentación.

Los procedimientos de hidrólisis de la parte celulósica se pueden basar bien en ácidos o bien en enzimas. Las desventajas principales de la hidrólisis enzimática son que el procedimiento es bastante lento y que los costes de las enzimas son todavía demasiado elevados (Kaylen y col., 2000). Generalmente, el rendimiento de la hidrólisis depende del tipo de pretratamiento del sustrato, del tipo y dosis de la enzima y del tiempo de hidrólisis. La mayoría de los experimentos se han llevado a cabo con bajas consistencias de las materias primas debido a la cantidad de compuestos  
60 inhibidores en el sustrato derivado de la fase de pretratamiento.

Hay básicamente dos tipos diferentes de procedimientos que se pueden usar para convertir la celulosa (y la hemicelulosa) en etanol. Éstos son hidrólisis-fermentación independientes (SHF) y sacarificación-fermentación simultáneas (SSF). Este último procedimiento también se ha ampliado para abarcar sacarificación-fermentación de hemicelulosa simultáneas (SSHF) y también se denomina sacarificación-cofermentación (SSCF). Entre los diversos esquemas de bioconversión de celulosa, el SSF parece ser el enfoque más prometedor para la conversión bioquímica de celulosa en etanol. La producción industrial de etanol tradicionalmente se lleva a cabo con levaduras, que son organismos resis-  
65

tentes muy conocidos. Se han creado por ingeniería genética nuevas cepas (bien de levaduras o bien de bacterias) para utilizar de forma eficaz todos los azúcares derivados de la materia prima lignocelulósica. La utilización de todos los azúcares, incluyendo las pentosas y todas las hexosas derivadas de la hemicelulosa, es esencial para una producción económica de etanol.

5 Las condiciones de la hidrólisis usadas en un procedimiento de hidrólisis independiente (SHF) vienen determinadas por las condiciones óptimas para las enzimas (principalmente celulasas de hongos que tienen una actividad máxima a 50°C y a un pH en el intervalo de 4 a 5). La principal ventaja de una etapa de hidrólisis independiente es que la hidrólisis se lleva a cabo a la temperatura óptima para las enzimas y la fermentación independiente a la óptima para las levaduras, aproximadamente 30°C. La principal desventaja es que los azúcares liberados en la hidrólisis inhi-  
10 ben mucho la actividad de las celulasas durante la hidrólisis. Esto se puede solucionar al menos parcialmente aumentando la actividad de la beta-glucosidasa en la preparación usada (añadiendo una enzima separada o usando una cepa sobreproductora). Las cargas de celulasas habitualmente varían de 10 a 20 FPU/g de sustrato (o celulosa) y se complementan con betaglucosidasa. Habitualmente, las concentraciones de azúcares producidos son bastante bajas debido a la poca cantidad de materia seca en la hidrólisis. Los rendimientos (a partir de los azúcares) habitualmente son mayores en sistemas más diluidos, en los que la inhibición del producto final se minimiza. Los tiempos de reacción prolongados también hacen posible un rendimiento y concentración de etanol mayores.

En el procedimiento de sacarificación-fermentación simultáneas (SSF) la sacarificación de la celulosa en glucosa con celulasas y la posterior fermentación de la glucosa (y pentosas) para obtener etanol tienen lugar en los mismos reactores. Según los actuales esquemas del procedimiento, todos los reactivos (celulosa, enzimas y organismos fermentadores) se añaden al mismo tiempo. Uno de los requisitos más importantes del procedimiento SSF es la compatibilidad de los sistemas de sacarificación y fermentación respecto a la temperatura (inferior a 37°C), al pH y a la concentración de sustrato. Las principales ventajas ofrecidas por el SSF incluyen un mayor porcentaje de hidrólisis de la celulosa debido a la extracción (mediante levaduras) de los azúcares que inhi-  
25 ben la actividad de la celulosa y a un menor requisito de condiciones asépticas. Las desventajas son las diferencias en las condiciones óptimas para la hidrólisis y la fermentación. El uso de todo el material, tanto la celulosa sólida como el filtrado de hemicelulosa, simultáneamente para la fermentación en vez de solo el filtrado ha mostrado ventajas; por ejemplo, disminuye la formación de ácido láctico (Stenberg y col. 2000).

30

### Resumen de la invención

Un objetivo de la presente invención es mejorar el ahorro y la eficacia (en términos de utilización de materias primas) de la técnica conocida y proporcionar un nuevo procedimiento para convertir materiales lignocelulósicos en etanol. En concreto, un objetivo de la presente invención es aumentar la concentración final de etanol del procedimiento de fermentación y mejorar el porcentaje y el rendimiento de la producción.

La invención se basa en la idea de realizar la hidrólisis y la fermentación con una alta concentración de sustratos y, evitando los efectos inhibidores del filtrado de hemicelulosa, disminuir la cantidad de enzimas necesarias y, finalmente, disminuir los costes globales de producción de etanol. Las pocas configuraciones de procedimientos publicadas (tales como el procedimiento del NREL) no han alcanzado estas metas.

La presente invención se basa en una combinación de tres etapas principales del procedimiento, concretamente en una primera etapa en la que el material lignocelulósico pretratado, que tiene una mayor concentración de material celu-  
45 lósico o lignocelulósico capaz de ser fermentado para obtener etanol, es sometido a una etapa preliminar de hidrólisis a alta consistencia. A continuación, la hidrólisis continúa durante una segunda etapa de la invención simultánea con la fermentación. Finalmente, las hemicelulosas solubilizadas, separadas durante el pretratamiento de la materia prima, se añaden - potencialmente después de la extracción de los inhibidores de la fermentación - a la mezcla de fermentación y la fermentación de los sustratos combinados continúa para proporcionar mayor rendimiento del producto.

Más específicamente, la invención está caracterizada principalmente por lo que se expone en la parte caracterizadora de la reivindicación 1.

La presente invención, que comprende las características esenciales de una tecnología de hidrólisis y fermentación mejorada, proporciona las siguientes ventajas:

Se obtienen un porcentaje de hidrólisis alto y una concentración alta al comenzar la hidrólisis con una alta consistencia de materias primas en las condiciones óptimas para las enzimas pre-hidrolizantes. La inhibición del producto final se evita continuando la etapa principal de hidrólisis simultáneamente con la producción de etanol a partir de los azúcares hidrolizados por las levaduras, lo que consume los azúcares potencialmente provocando la inhibición del producto final de las enzimas.

La cantidad de enzimas necesarios disminuye debido a la menor inhibición del producto final y a la menor necesidad de beta-glucosidasa. La concentración y la destoxicación opcional de la fracción de hemicelulosa mejoran el porcentaje de producción de etanol y conduce a una elevada concentración final de etanol. La adición de la fracción de hemicelulosa en una fase posterior disminuye la inhibición de enzimas y microorganismos por cualquier compuesto inhibidor. La minimización de los efectos inhibidores y el aumento de la consistencia de la materia prima (carbohidra-

## ES 2 326 485 T3

tos) conducen a mayores porcentajes de fermentación, mayores concentraciones finales de etanol y menores costes de producción de etanol.

A continuación se describirá la invención con más detalle en referencia al dibujo adjunto.

5

### Breve descripción del dibujo

la fig. 1 muestra de forma esquemática el diagrama de un procedimiento nuevo de tres etapas según la invención para convertir lignocelulosa en etanol.

10

### Descripción detallada de la invención

El procedimiento total para producir etanol a partir de una materia prima lignocelulósica fibrosa, que contiene carbohidratos, generalmente comprende las etapas de

15

- Prehidrólisis enzimática a alta consistencia, típicamente con el 10% en peso en seco o más, a la temperatura óptima para las enzimas. La composición de enzimas se puede diseñar específicamente para la prehidrólisis o puede ser la misma durante la prehidrólisis y la etapa de hidrólisis principal;

20

- Hidrólisis principal enzimática y fermentación simultáneas secundarias de los azúcares hexosas a una temperatura adecuada para los organismos fermentadores; y

25

- Adición de la fracción de hemicelulosa concentrada y opcionalmente detoxificada después de que la mayor parte de los azúcares hexosa hayan fermentado; este procedimiento también permite el uso de un filtrado de hemicelulosa no detoxificado.

En concreto, el procedimiento comprende

30

a) la conversión de la materia prima en una fracción lignocelulósica sólida con una concentración aumentada de celulosa y una fracción líquida que contiene principalmente hemicelulosas solubilizadas;

35

b) la hidrólisis del material lignocelulósico fibroso con alta consistencia con una enzima celulasa para proporcionar un material lignocelulósico modificado con mayor fluidez (lo que significa, por ejemplo, características de mezclado y bombeo mejoradas),

40

c) el sometimiento simultáneo del material lignocelulósico modificado a una hidrólisis continua con una celulasa y a una fermentación para obtener etanol en una mezcla de fermentación,

45

d) la continuación de la fermentación para convertir una gran parte de los carbohidratos disponibles en etanol,

e) la adición de la fracción líquida que contiene hemicelulosas solubilizadas a la mezcla de fermentación y la continuación de la fermentación, y

f) la recuperación del etanol de la mezcla de fermentación.

En el presente procedimiento, como materia prima, se puede usar cualquier material lignocelulósico, generalmente lignocelulósico fibroso, que contenga cantidades importantes de celulosa y hemicelulosa para la fermentación para obtener etanol susceptible de una hidrólisis del material hidrocarbonado para obtener azúcares monoméricos, hexosas y pentosas.

50

Típicamente, la materia prima se selecciona de entre residuos de madera blanda y madera dura, cultivos dedicados, desechos agrícolas, papel usado o un flujo secundario de la industria forestal.

55

En referencia ahora al dibujo, se puede observar que los siguientes números de referencia se usan para designar las diversas etapas del procedimiento:

1. Pretratamiento

60

2. Filtración y lavado

3. Prehidrólisis

4. Hidrólisis y fermentación de las hexosas

65

5. Concentración

6. Destoxificación

## ES 2 326 485 T3

7. Hidrólisis y fermentación de la hemicelulosa

8. Destilación

5 Estas etapas se examinarán a continuación:

### 1. *Pretratamiento de la materia prima*

10 La materia prima se trata previamente con un procedimiento de pretratamiento, tal como la explosión por vapor, con el objetivo de liberar la hemicelulosa de la matriz fibrosa lignocelulósica. Como técnica, la explosión por vapor es descrita con más detalle por Saddler y col. (1993), y un equipo y un procedimiento para el pretratamiento son descritos por Palmqvist y col., (1996).

15 (Saddler, J., Ramos, L. y Breuil, C. (1993) Steam pre-treatment of lignocellulosic residues. En: Bioconversion of Forest and Agricultural plant Residues. Saddler, J.N. (ed.) CAB International, Wallingford, UK, capítulo 3, 73-92; Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M., Larsson, M., Stenberg, K., Szengyel, Z., Tengborg, C. y Zacchi, G., 1996, Design and operation of a bench-scale process development unit for the production of ethanol from lignocellulosics. Bioresource Technology 58:171-179)

20 La materia prima comprende materiales lignocelulósicos tales como madera (madera blanda, madera dura y mezclas de las mismas) y materiales lignocelulósicos derivados agrícolas, tales como plantas perennes o caducas.

### 2. *Filtración y lavado*

25 En la siguiente etapa, la suspensión se somete a filtración y lavado. El material fibroso así obtenido tienen una mayor concentración de celulosa en comparación con la materia prima, puesto que una parte importante de las hemicelulosas (aproximadamente del 5% en peso al 30% en peso de la materia prima total) se ha disuelto en la fase líquida (fase acuosa). El objetivo es separar una parte importante, al menos el 40% en peso, en concreto al menos el 50% en peso, de las hemicelulosas presentes en la materia prima e incorporarlas en la fase líquida principalmente en forma monomérica u oligomérica. Típicamente, la cantidad de hemicelulosas/sacáridos en la fracción líquida es al menos 2 veces superior, preferiblemente de 2,5 a 15 veces superior (calculado en peso), que en el material fibroso.

30 La filtración se lleva a cabo usando, por ejemplo, filtros prensa u otros procedimientos de separación convencionales para la separación y el lavado de la fracción de sólidos, que contiene principalmente celulosa. La separación conduce a una torta de filtración (a alta temperatura) con un alto contenido de sólidos y a una fracción líquida que contiene hemicelulosas solubilizadas y también los compuestos inhibidores.

### 3. *Prehidrólisis (etapa b anterior)*

40 La hidrólisis de la etapa b se lleva a cabo a una temperatura de 30-90°C, o de 40-90°C, durante de 0,5 a 24 horas, típicamente de aproximadamente 1 a 12 horas. La consistencia es elevada, generalmente de aproximadamente el 5 al 40% en peso en seco, preferiblemente aproximadamente el 10-25% en peso en seco, o el 10-40% de peso en seco. La hidrólisis se lleva a cabo en condiciones ligeramente ácidas, preferiblemente con un pH en el intervalo de 4 a 6.

45 Como se analizará con más detalle a continuación, la hidrólisis de la etapa b se lleva a cabo con una primera preparación de celulasas y la hidrólisis de la etapa c (número de referencia 5 en la figura 1) se lleva a cabo con una segunda preparación de celulasas, siendo las celulasas bien las mismas o, preferiblemente, diferentes. Usando diferentes celulasas es posible emplear enzimas, que se optimizan para sus diferentes tareas. Por tanto, la primera enzima se puede optimizar específicamente para mejorar la tratabilidad (tal como el mezclado y el bombeo - generalmente "fluidez") a alta consistencia, disminuyendo la viscosidad, produciendo azúcares fermentables y siendo activa a temperaturas de 30-90°C en la etapa b. Durante la prehidrólisis, al menos parte de la celulosa y otros carbohidratos se hidrolizarán para obtener azúcares (monosacáridos, tales como hexosas y pentosas). Típicamente, al menos el 5%, preferiblemente aproximadamente el 10%-90%, en concreto aproximadamente el 20%-80%, de los carbohidratos se hidrolizan en esta fase para producir monosacáridos fermentables. En los ejemplos posteriores el grado de hidrólisis es de aproximadamente el 20-70%.

55 Preferiblemente, la enzima usada en la etapa b tiene un amplio espectro de celulasas. En concreto, la enzima tiene el menos dos actividades seleccionadas del grupo constituido por actividades celobiohidrolasa, actividades endoglucanasa, actividades beta-glucosidasa y actividades hemicelulasa (véase a continuación para una explicación más detallada de las enzimas).

### 4. *Hidrólisis y fermentación de las hexosas*

60 La etapa de hidrólisis y fermentación simultáneas (etapa c) se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura en el intervalo de 30 a 70°C. (La hidrólisis de la etapa b se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura mayor que la hidrólisis y fermentación de la etapa c). La hidrólisis continúa con una segunda enzima, que es activa a esta temperatura para un tiempo de reacción de 6 a 96 horas.

## ES 2 326 485 T3

La enzima usada en la etapa c tiene un amplio espectro de celulasas y es activa a temperaturas de 30 a 90°C. La enzima tiene preferiblemente al menos dos actividades seleccionadas del grupo constituido por actividades celobiohidrolasa, actividades endoglucanasa, actividades beta-glucosidasa y actividades hemicelulasa. Se optimiza específicamente para llevar a cabo la hidrólisis del material lignocelulósico restante en las etapas c a e.

Las dos enzimas tienen preferiblemente el mismo origen y están diseñadas para una hidrólisis eficaz del material lignocelulósico en todo el procedimiento constituido por las etapas b a e.

A continuación, se proporciona una descripción más completa de las enzimas.

Durante la hidrólisis, las porciones restantes de celulosa y otros carbohidratos del material celulósico y lignocelulósico se convierten en azúcares.

La etapa de fermentación se lleva a cabo en presencia de un organismo fermentador, capaz de fermentar los principales carbohidratos derivados de la lignocelulosa (azúcares), es decir, monosacáridos, tales como hexosas y pentosas. El organismo fermentador es capaz de producir etanol a partir de los principales azúcares derivados de la lignocelulosa a una temperatura de 30-70°C.

Ejemplos de organismos adecuados son los siguientes:

### Levaduras:

*Saccharomyces cerevisiae*, incluyendo organismos genéticamente modificados (GMO), tales como la cepa VTT B-03339

*Pichia stipitis*

*Candida shehatae*

*Hansenula polymorpha*

*Pachysolen tannophilus*

*Brettanomyces naardenensis*

*Pichia segobiensis*

*P. guillermondii*

*P. naganishii*

*Candida tenuis*

*C. albicans*

*C. tropicalis*

*C. maltosa*

*C. torresii*

*Metschnikowia bicuspidata*

*M. zobellii*

*Sporopachydermia quercuum*

*Wingea robertsii*

### Bacteria:

*Zymomonas mobilis*

*E. coli* (GMO -kanta/kantoja)

*Klebsiella oxytoca* (GMO -kanta)

Hongos:

*Fusarium oxysporum*

5 *Candida guilliermondii*

*C. millerii*

10 *C. tropicalis*

*C. parapsilosis*

*Petromyces albertensis*

15 *Debaromyces hansenii*

*Cellulomonas cellulans*

*Corynebacterium sp.*

20 *Serratia marcescens*

25 En concreto, el organismo fermentador es una levadura, capaz de producir etanol a partir de los principales azúcares derivados de la lignocelulosa.

5. *Concentración*

30 La concentración de la fracción líquida obtenida de la etapa de filtración aumenta después antes de la adición de líquido a la mezcla de fermentación. Por tanto, es preferible aumentar la concentración de la fracción de hemicelulosa hasta una concentración en peso en seco del 5-60%.

35 La concentración se puede llevar a cabo por evaporación o mediante diferentes técnicas de membrana. Durante la concentración por evaporación, algunos compuestos inhibidores de organismos fermentadores también se pueden eliminar del filtrado de hemicelulosa.

6. *Destoxificación*

40 La fracción líquida puede ser sometida - dependiendo de las condiciones del pretratamiento - a una operación de destoxificación para liberar la fracción de hemicelulosa de sustancias que pueden inhibir la fermentación. Se pueden eliminar los inhibidores, por ejemplo, mediante separación, evaporación, exclusión iónica, resinas o el procedimiento de tratamiento con carbón.

7. *Hidrólisis y fermentación de la hemicelulosa*

45 La fracción líquida se añade cuando una gran parte del sustrato de carbohidratos disponible para la fermentación durante la etapa c se ha fermentado para obtener etanol. Preferiblemente al menos el 50% en peso, en concreto al menos el 55% en peso o al menos el 60% en peso, de los monosacáridos disponibles, en concreto hexosas y pentosas, formados durante la hidrólisis se fermentan para obtener etanol antes de la adición de la fracción líquida. La fracción  
50 concentrada de hemicelulosa se añade entonces durante un periodo de tiempo de 10 minutos a 48 horas, preferiblemente de aproximadamente 15 min. a 24 horas, tiempo después del cual continúa la fermentación durante de 6 a 72 horas más, preferiblemente de 8 a 48 horas, a una temperatura de 30-70°C y a un pH de 4 a 6.

55 Como resultado del procedimiento anterior, se obtiene una mezcla de fermentación que generalmente contiene aproximadamente del 0,5 al 10%, en concreto aproximadamente del 1,5 al 8%, en peso de etanol. El rendimiento (calculado a partir de los carbohidratos disponibles) es del 80% en peso o más, en concreto del 85% en peso o más.

8. *Destilación del etanol*

60 La destilación y deshidratación del etanol se lleva a cabo con técnicas convencionales o nuevas.

*Enzimas celulolíticas*

65 Las etapas de hidrólisis enzimática anteriormente mencionadas se llevan a cabo con mezclas de enzimas celulasas. Las mezclas están compuestas, en concreto, por los tres principales tipos de enzimas: celobiohidrolasas (CBH), endoglucanasas (EG) y  $\alpha$ -glucosidasas. Además, las mezclas pueden contener otras enzimas hidrolíticas, tales como las hemicelulasas. La composición de las mezclas de enzimas se optimiza para hidrolizar los carbohidratos, especialmente la celulosa, de forma eficaz para obtener azúcares monoméricos. Por esto, las celobiohidrolasas son necesarias

## ES 2 326 485 T3

para actuar en la parte cristalina de la celulosa, las endoglucanasas principalmente en la parte amorfa de la celulosa y las beta-glucosidasas para eliminar la celobiosa de las mezclas de hidrólisis, porque la celobiosa inhibe la acción de las enzimas CBH debido a la inhibición del producto final. Los mecanismos de hidrólisis son muy conocidos y son descritos con más detalle, por ejemplo, por Teeri (1997). Las actuales preparaciones enzimáticas comerciales de celulasas se obtienen principalmente a partir de hongos (por ejemplo, Trichoderma, Aspergillus). Las propiedades de las mezclas se pueden mejorar o adecuar a condiciones específicas usando procedimientos biotecnológicos. Las mezclas se pueden modificar para contener nuevas proteínas celulasas derivadas de otros organismos usando procedimientos de ingeniería genética, o se pueden mejorar las propiedades de las actuales proteínas celulasas mediante ingeniería de proteínas.

(Teeri, T. (1997) Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. TIBTECH 15 (Mayo 1997), pág. 161-167).

Los siguientes ejemplos no limitativos ilustran adicionalmente la invención:

### Ejemplo 1

#### *Prehidrólisis de madera blanda pretratada*

Se pretrató con vapor madera blanda y se dividió en dos fracciones: una fracción sólida que contenía principalmente celulosa y una fracción soluble que contenía principalmente los azúcares de la hemicelulosa y los compuestos inhibidores. La fracción sólida se filtró, se lavó y se suspendió para formar una suspensión de fibras con el 14,4% de materia seca. La fibra se pre hidrolizó usando preparaciones enzimáticas comerciales (Celluclast 1,5 L FG, 20 FPU/g en peso en seco y Novozym 188, dosis de beta-glucosidasa de 200 nkat/g en peso en seco) a 50°C durante de 2 a 20 horas.

Durante la hidrólisis, se hidrolizó el 74% de la celulosa de la fibra para obtener glucosa que estaba presente en la fracción líquida en una concentración de 46 g/l. Además, la parte líquida contenía pequeñas cantidades de otros azúcares fermentables: 0,1 g/l de manosa, 0,03 g/l de galactosa y 0,04 g/l de xilosa. La viscosidad de la fracción sólida disminuyó rápidamente durante la hidrólisis y las propiedades de mezclado mejoraron claramente ya en las primeras 2 horas de hidrólisis, creando características de procesamiento más favorables de la suspensión de fibras.

La madera blanda pretratada con vapor también se trató directamente con enzimas, de forma similar a como se describió anteriormente, pero sin separación de la fracción de azúcares de hemicelulosa y sin lavado. En este caso el porcentaje de hidrólisis fue solo del 11% del obtenido con fibra lavada (se hidrolizó el 8% de celulosa de la fibra), indicando que la fase de prehidrólisis es claramente más eficaz en el caso de que la fracción de hemicelulosa se separe de la fibra antes de la prehidrólisis.

Cuando se llevó a cabo el correspondiente experimento de hidrólisis con menor contenido de fibra (el 2% de materia seca), el porcentaje de hidrólisis con fibra no lavada fue mejor: el 66% del porcentaje de la hidrólisis con fibra lavada. Esto indica que la inhibición de enzimas por el filtrado de hemicelulosa se vuelve claramente más fuerte cuando se aumenta el contenido de fibra. Por tanto, la separación del filtrado de hemicelulosa de la fibra es muy importante para una hidrólisis eficaz en la fase de prehidrólisis en procedimientos a alta consistencia.

### Ejemplo 2

#### *Producción de etanol a partir de madera blanda prehidrolizada*

Se pretrató con vapor madera blanda y se dividió en dos fracciones: una fracción sólida que contenía principalmente celulosa y una fracción soluble que contenía principalmente los azúcares de la hemicelulosa. La fracción sólida se filtró, se lavó y se suspendió para formar una suspensión de fibras con el 14,5% de materia seca. La fibra se prehidrolizó usando preparaciones enzimáticas comerciales a 50°C. Las condiciones de hidrólisis fueron: 13,3% de sólidos en peso en seco en un tampón acetato, pH 5; las preparaciones enzimáticas usadas fueron Celluclast 1,5 L FG, 20 FPU/g en peso en seco y Novozym 188, con una dosis de beta-glucosidasa de 200 nkat/g en peso en seco. Después de 20 horas, el prehidrolizado se enfrió hasta 30°C y se inoculó con la levadura (cepa VTT-B-03339) suspendida con nutrientes antes de la inoculación al 10% en volumen (de prehidrolizado) respecto al agua. El tratamiento de referencia se llevó a cabo en las mismas condiciones, pero la levadura se inoculó al principio del procedimiento inmediatamente después de la adición de las enzimas.

El experimento con prehidrólisis y el tratamiento de referencia produjeron una concentración de etanol de 25 g/l, correspondiente a un rendimiento de etanol del 81% del teórico. Por tanto, la prehidrólisis fue tan buena como la hidrólisis independiente en términos de producción de etanol en el procedimiento y, además, produjo mejores propiedades de mezclado con menor demanda de energía.

## ES 2 326 485 T3

### Ejemplo 3

#### *Producción de etanol a partir de madera blanda prehidrolizada con y sin la fracción de hemicelulosa*

5 Se pretrató con vapor madera blanda y se dividió en dos fracciones: una fracción sólida que contenía principalmente celulosa y una fracción soluble que contenía principalmente los azúcares de la hemicelulosa. La fracción sólida se filtró, se lavó y se suspendió para formar una suspensión de fibras con el 18% de materia seca. La fibra se prehidrolizó usando preparaciones enzimáticas comerciales a 50°C. Las condiciones de hidrólisis fueron: 16,2% de sólidos en peso en seco en un tampón acetato, pH 5; las preparaciones enzimáticas usadas fueron Celluclast 1,5 L FG, 20 FPU/g  
10 en peso en seco y Novozym 188, con una dosis de beta-glucosidasa de 200 nkat/g en peso en seco. Después de la prehidrólisis se había hidrolizado aproximadamente el 20% de la celulosa en la fracción de fibra para obtener glucosa.

Después de 20 horas, el prehidrolizado se enfrió hasta 30°C y se inoculó con la levadura (cepa VTT-B-03339) suspendida con nutrientes antes de la inoculación a aproximadamente el 10% en volumen (de prehidrolizado) respecto al agua.  
15

El filtrado de hemicelulosa que contenía compuestos inhibidores y tóxicos para la levadura se añadió:

- 20 a) bien al principio de la hidrólisis (produciendo un 13,3% de sólidos en peso en seco en la hidrólisis).
- b) o bien al principio de la fermentación al mismo tiempo que la levadura, o
- c) mediante dos adiciones consecutivas después del principio de la fermentación.

25 El tratamiento de referencia se llevó a cabo usando el material pretratado con vapor no lavado que contenía la fracción de hemicelulosa, es decir, el material sin separación de la fracción de hemicelulosa y sin lavado.

Las concentraciones de etanol producido en la fermentación con levadura fueron, en los diferentes casos: a) 0,2%, b) 2,6% y c) 3,2%. El tratamiento de referencia produjo solo el 0,15% de etanol. Los azúcares del filtrado añadido solo se utilizaron parcialmente en el caso b), mientras que la mayor parte de los mismos se consumió en el caso c). Los resultados indican que la adición gradual del filtrado tóxico en la etapa anterior de la fermentación mejoró los rendimientos y los porcentajes de producción. Debido a la toxicidad del filtrado, disminuyeron los porcentajes tanto de la hidrólisis como de la fermentación.  
30

### 35 Ejemplo 4

#### *Eliminación de inhibidores del filtrado de hemicelulosa por evaporación*

40 El filtrado de hemicelulosa se separó de la fibra de abeto y se concentró 4,8 veces mediante evaporación al vacío a 60-65°C. El filtrado se analizó antes y después de la concentración por HPLC para monosacáridos y diversos compuestos inhibidores: ácido acético, furfural y 5-hidroxitilfurfural (5-HMF).

Durante la evaporación el furfural se extrajo del filtrado (siendo la cantidad inferior al límite de detección de la HPLC en el concentrado). En la concentración por evaporación, la cantidad de ácido acético se redujo en un 67% y la cantidad de 5-HMF se redujo en un 12%. Por tanto, la cantidad de diversos compuestos inhibidores se puede reducir o se pueden eliminar del filtrado de hemicelulosa por evaporación, llevada a cabo para concentrar el filtrado de hemicelulosa antes de su adición al procedimiento de fermentación.  
45

### 50 Ejemplo 5

#### *Producción de etanol a partir de madera blanda pretratada en un procedimiento de tres etapas*

55 Todo el procedimiento se ensayó en condiciones de elevada consistencia de sólidos en peso en seco (13% en peso en la fase de prehidrólisis) con la adición de la fracción concentrada de hemicelulosa (concentración de azúcares del 27%) durante la fase de SSF. El experimento se llevó a cabo en un fermentador de laboratorio con control de pH y temperatura y un mezclado eficaz de la suspensión. El experimento comenzó con una consistencia del 13%, con la etapa de prehidrólisis a 50°C (adición de enzima como se describió en el ejemplo 2) y continuó durante 24 horas.  
60 Después de la prehidrólisis se había hidrolizado el 60% de la celulosa en la fracción de fibra para obtener glucosa.

La temperatura del fermentador se disminuyó entonces hasta 30°C, se añadieron nutrientes adecuados y el fermentador se inoculó con la levadura fermentadora de pentosas (cepa VTT-B-03339). Los azúcares producidos en la hidrólisis se consumieron rápidamente y la hidrólisis y fermentación simultáneas continuaron. Después de 24 horas desde la inoculación de levadura comenzó la adición de la fracción concentrada de hemicelulosa, la destoxicación y la concentración por evaporación (hasta aproximadamente el 20% del volumen original) y continuó durante aproximadamente 25 horas.  
65

## ES 2 326 485 T3

5 Cuando se completó la fermentación, la concentración de etanol era del 4,5% correspondiente a un rendimiento teórico de aproximadamente el 90% de los carbohidratos en la materia prima. La mayor parte de los azúcares del filtrado también se utilizó: por ejemplo, el uso total de manosa y glucosa fue del 92% y el 95%, respectivamente, de toda la manosa o glucosa presente en las materias primas. El procedimiento produjo así una concentración y un rendimiento elevados de etanol y facilitó la utilización de los azúcares de la fracción de hemicelulosa.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 326 485 T3

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir etanol a partir de una materia prima lignocelulósica fibrosa, que comprende
- 5 a) la conversión de la materia prima en una fracción lignocelulósica sólida con una mayor concentración de celulosa y una fracción líquida que contiene principalmente hemicelulosas solubilizadas;
- b) la hidrólisis del material lignocelulósico fibroso con alta consistencia con una enzima celulasa para proporcionar un material lignocelulósico modificado con mayor fluidez;
- 10 c) el sometimiento simultáneo del material lignocelulósico modificado a una hidrólisis continua con una celulasa y a una fermentación para obtener etanol en una mezcla de fermentación;
- 15 d) la continuación de la fermentación para convertir una gran parte de los carbohidratos disponibles en etanol;
- e) la adición de la fracción líquida que contiene las hemicelulosas solubilizadas a la mezcla de fermentación y la continuación de la fermentación; y
- 20 f) la recuperación del etanol de la mezcla de fermentación.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la materia prima se somete a una explosión por vapor en la etapa a.
- 25 3. El procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la hidrólisis de la etapa b se lleva a cabo a una temperatura de 40-90°C durante de 0,5 a 24 horas.
4. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que la hidrólisis de la etapa b se lleva a cabo con una consistencia de 10-25% en peso en seco.
- 30 5. El procedimiento según la reivindicación 3 ó 4, en el que la hidrólisis de la etapa b se lleva a cabo a un pH en el intervalo de 4 a 6.
6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que la hidrólisis de la etapa b se lleva a cabo con una primera preparación de celulasas y la hidrólisis de la etapa c se lleva a cabo con una segunda preparación de celulasas, siendo dichas celulasas primera y segunda diferentes.
- 35 7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la enzima usada en la etapa b tiene un amplio espectro de celulasas y es activa a temperaturas en el intervalo de 30 a 90°C.
- 40 8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que la enzima tiene al menos dos actividades seleccionadas del grupo constituido por actividades celobiohidrolasa, actividades endoglucanasa, actividades beta-glucosidasa y actividades hemicelulasa.
- 45 9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la hidrólisis de la etapa b se lleva a cabo a una temperatura mayor que la hidrólisis y fermentación de la etapa c.
10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la etapa c se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 30 a 70°C.
- 50 11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la enzima usada en la etapa c tiene un amplio espectro de celulasas y es activa a temperaturas de 30 a 90°C.
12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que la enzima tiene al menos dos actividades seleccionadas del grupo constituido por actividades celobiohidrolasa, actividades endoglucanasa, actividades beta-glucosidasa y actividades hemicelulasa.
- 55 13. El procedimiento según la reivindicación 11 ó 12, en el que la enzima usada en de la etapa c es capaz de hidrolizar el material lignocelulósico presente en las etapas c a e.
- 60 14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de fermentación se lleva a cabo en presencia de un organismo fermentador, capaz de fermentar los principales azúcares derivados de la lignocelulosa, es decir, hexosas y pentosas.
- 65 15. El procedimiento según la reivindicación 14, en el que el organismo fermentador es capaz de producir etanol a partir de los principales azúcares derivados de la lignocelulosa a una temperatura de 30-70°C.

## ES 2 326 485 T3

16. El procedimiento según la reivindicación 14 ó 15, en el que el organismo fermentador es una levadura, capaz de producir etanol a partir de los principales azúcares derivados de la lignocelulosa.

5 17. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la fermentación se lleva a cabo a una temperatura de 30-70°C y la hidrólisis continúa con una segunda enzima, que es activa a esta temperatura durante un tiempo de reacción de 6 a 96 horas.

10 18. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la fracción líquida que contiene hemicelulosas disueltas se añade a la mezcla de fermentación cuando al menos el 50% en peso de las hexosas y pentosas disponibles se han fermentado para obtener etanol.

19. El procedimiento según la reivindicación 18, en el que la concentración de la fracción líquida aumenta después de la etapa a y antes de la etapa d.

15 20. El procedimiento según la reivindicación 19, en el que se añade la fracción de hemicelulosa con una concentración en peso en seco del 5-60%.

20 21. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la fracción líquida se somete a una operación de destoxificación para liberar la fracción de hemicelulosa de sustancias que pueden inhibir la fermentación.

22. El procedimiento según la reivindicación 21, en el que los inhibidores se eliminan mediante separación, evaporación, exclusión iónica, resinas o el procedimiento de tratamiento con carbón.

25 23. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, en el que la fracción concentrada de hemicelulosa se añade durante un periodo de tiempo de 10 minutos a 48 horas, tiempo después del cual continúa la fermentación durante de 6 a 72 horas más a una temperatura de 30-70°C y a un pH de 4 a 6.

30 24. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las enzimas primera y segunda tienen el mismo origen y están diseñadas para una hidrólisis eficaz del material lignocelulósico en todo el procedimiento constituido por las etapas b a e.

35 25. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la materia prima lignocelulósica proviene de madera blanda, madera dura, cultivos dedicados, desechos agrícolas, papel usado o un flujo secundario de la industria forestal.

26. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende

40 - la hidrólisis del material lignocelulósico fibroso con una consistencia del 10 al 40% en peso en seco con una enzima celulasa para hidrolizar aproximadamente del 20 al 80% de los carbohidratos para proporcionar un material lignocelulósico modificado que contiene hexosas y pentosas, teniendo dicho material mayor fluidez;

45 - el sometimiento simultáneo del material lignocelulósico modificado a una hidrólisis continua con una celulasa y a una fermentación de las hexosas y pentosas para obtener etanol en una mezcla de fermentación;

- la adición de la fracción líquida que contiene hemicelulosas solubilizadas a la mezcla de fermentación cuando al menos el 50% en peso de las hexosas y pentosas disponibles se hayan fermentado para obtener etanol y la continuación de la fermentación; y

50 - la recuperación del etanol de la mezcla de fermentación.

27. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en el que la materia prima lignocelulósica fibrosa contiene carbohidratos.

55

60

65

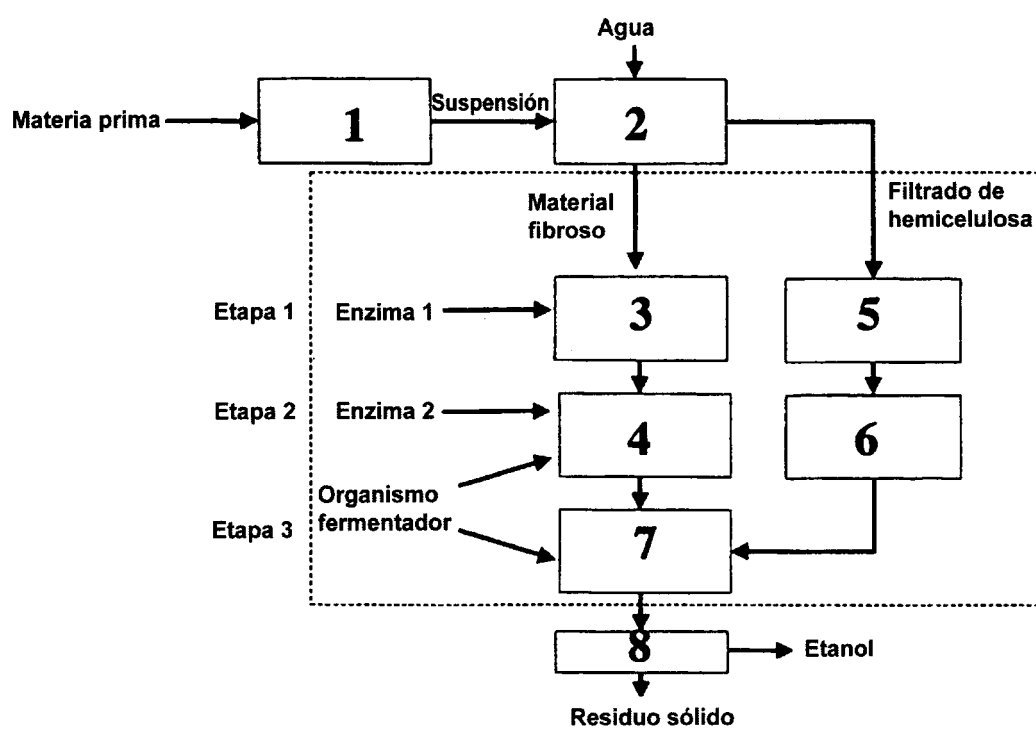


Fig. 1.