

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 325**

51 Int. Cl.:
C12P 19/14 (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08872507 .2**
96 Fecha de presentación: **10.12.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2235195**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.10.2010**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE JUGO AZUCARADO A PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA CON RECICLADO MEJORADO DE LAS ENZIMAS.**

30 Prioridad:
20.12.2007 FR 0709121

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.11.2011

73 Titular/es:
**IFP ENERGIES NOUVELLES
1 & 4 AVENUE DE BOIS-PRÉAU
92852 RUEIL MALMAISON CÉDEX, FR**

72 Inventor/es:
**CASNAVE, Dominique y
LOPEZ FERREIRA, Nicolas**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 369 325 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 jugo azucarado a partir de biomasa lignocelulósica con reciclado mejorado de las enzimas

Campo de la invención

La presente invención se inscribe dentro de la producción de biocombustibles denominados de "segunda generación". Se refiere a un procedimiento de producción de jugos azucarados en el cual la hidrólisis enzimática de sustratos lignocelulósicos presenta una mejoría en la utilización y en el reciclado de las enzimas empleadas. Los jugos azucarados que se obtienen de este modo se dirigen hacia la etapa de fermentación alcohólica y de destilación, con vistas a la producción de un alcohol a partir de biomasa.

Antecedentes de la invención

El recurso de la biomasa lignocelulósica representa una fuente de energía renovable considerable y procede tanto de los residuos agrícolas y forestales o de los subproductos de transformación de la madera como de los cultivos específicos (plantas leñosas o herbáceas). La materia lignocelulósica está formada por tres elementos principales imbricados en un sistema complejo. Estos elementos son la celulosa, las hemicelulosas y la lignina. Sus proporciones respectivas varían de acuerdo con el origen exacto de la biomasa.

El método a menudo recomendado para obtener unos azúcares fermentables a partir de celulosa es la hidrólisis enzimática. La degradación de la celulosa en glucosa necesita la acción sinérgica de tres categorías de enzimas, las celulasas, clasificadas en función de su actividad:

- las endoglucanasas cortan la celulosa de manera aleatoria a la altura de las zonas amorfas de la celulosa;
- las exoglucanasas (o celobiohidrolasas cuando estas producen celobiosa) actúan de forma progresiva sobre los extremos libres de las cadenas de celulosa, liberando glucosa o celobiosa;
- las β -glucosidasas (o celobiasas) hidrolizan las celodextrinas solubles y la celobiosa en glucosa.

Una de las principales barreras que actualmente limitan el desarrollo industrial de este procedimiento es el elevado coste asociado a la producción de las celulasas. Con el fin de mejorar la actividad de los cócteles enzimáticos comerciales, se describe en la literatura una suplementación de las celulasas con β -glucosidasas, con el fin de anular el efecto inhibitorio bien conocido de la celobiosa sobre la actividad de las endo- y exo-glucanasas.

Con el fin reducir la cantidad de enzimas empleadas, se han propuesto diferentes soluciones para poder reciclar estas enzimas. Al finalizar la hidrólisis enzimática, las enzimas se encuentran en parte en forma libre en el hidrolizado y en forma inmovilizada en el residuo sólido.

En la patente FR-B-2 608 625, a nombre de la solicitante, se propone un método que consiste en recuperar la mayor parte de las enzimas: las enzimas libres se recuperan mediante adsorción sobre el sustrato nuevo que hay que convertir, mientras que las enzimas inmovilizadas se reutilizan mediante la puesta en contacto de nuevo del residuo sólido con el sustrato nuevo. En el caso de que las celulasas se suplementen con β -glucosidasas para mejorar la actividad del cóctel enzimático, el método propuesto no siempre es satisfactorio: tras el reciclado, se observa una pérdida de actividad importante, asociada a la acumulación de celobiosa (Ramos y otros, Applied Biochemistry and Biotechnology, 1994, 45 (6), 193-207). Este método no permite, en efecto, reciclar de manera eficaz las β -glucosidasas libres que tienen muy poca afinidad con el sustrato lignocelulósico.

La suplementación de las celulasas comerciales con β -glucosidasas soportadas es un método descrito por Woodward y otros ("Use of immobilized beta-glucosidase in the hydrolysis of cellulose", 1993, ACS symposium series, 533, 240-250) que permite reutilizar varias veces las β -glucosidasas, sin pérdida de actividad ni disminución apreciable de la conversión de la celulosa en glucosa. La inmovilización de las β -glucosidasas permite mejorar de manera notable su estabilidad: Aguado y otros (Biotechnology and Applied Biochemistry, 1995, 17 (1), 49-55) han mostrado que la inmovilización de las β -glucosidasas de *Penicillium funiculosum* sobre polvo de nylon permite obtener una actividad estable durante 1.500 min a 50 °C, mientras que estas mismas enzimas en el estado libre se desactivan a partir de los 40 °C. Las β -glucosidasas de *Aspergillus niger* son, por su parte, estables en el estado libre hasta los 45 °C, mientras que en la forma inmovilizada sobre Eupergit C su actividad se mantiene estable hasta los 65 °C (Tu y otros, 2006, Biotechnology Letters, 28 (3), 151-156). A estas temperaturas, las celulasas son, por el contrario, poco estables y se desactivan con rapidez, lo que afecta a la eficacia de la hidrólisis.

El reciclado de las β -glucosidasas soportadas necesita que se las extraiga de la mezcla reactiva que contiene un residuo sólido, lo que no se puede realizar de manera cómoda cuando las celulasas y las β -glucosidasas se utilizan en el mismo reactor.

Por otra parte, la adsorción no productiva de las β -glucosidasas sobre la lignina es una causa conocida de limitación de la hidrólisis enzimática. Una de las soluciones conocidas para limitar esta adsorción consiste en añadir

surfactantes y/o proteínas como la albúmina de suero bovino (ASB) (Yang y otros, 2006, Biotechnology and Bioengineering, 94 (4), 611-617).

5 Estas importantes limitaciones se pueden eliminar poniendo en práctica el procedimiento de jugo azucarado de acuerdo con la presente invención.

10 El documento US5962289 describe unas proteínas de fusión que se unen a la celulosa. El ejemplo 5 describe la producción de glucosa a partir de celobiosa utilizando proteínas de fusión de β -glucosidasas inmovilizadas. Se añaden endo- y exo-glucanasas al medio que comprende el material celulósico que hay que degradar. La totalidad de la mezcla se dirige a continuación hacia una columna Avicel, que inmoviliza y concentra las endo- y las exo-glucanasas. El eluyente que contiene la celobiosa se dirige hacia una segunda columna Avicel que contiene unas β -glucosidasas inmovilizadas, la celobiosa convirtiéndose de este modo en glucosa.

15 El documento EP0062027 describe un procedimiento de producción de monosacáridos a partir de una materia prima celulósica que comprende las siguientes etapas:

20 el material celulósico se mezcla con una solución de celulasas antes de dirigirlo a una serie de primeros reactores de hidrólisis enzimática colocados en paralelo. La totalidad del hidrolizado que se obtiene, que comprende por lo tanto una fase líquida mezclada con unos residuos sólidos, pasa por un agitador y un molino antes de dirigirse a una centrifugadora que permite separar los residuos sólidos de la fase líquida. La fase líquida se dirige entonces a un segundo reactor que comprende unas β -glucosidasas soportadas. El flujo que sale de este reactor vuelve a circular en parte hacia los primeros reactores de hidrólisis o hacia el agitador, donde se mezcla con un microorganismo para la etapa de fermentación de los jugos azucarados.

25 **Resumen de la invención**

El procedimiento de acuerdo con la presente invención consiste en producir un jugo azucarado a partir de sustrato lignocelulósico mediante hidrólisis enzimática que comprende una fase de conversión de la lignocelulosa, una fase de producción de jugo azucarado y una fase de vaciado completo de los reactores, en el que se realiza la suplementación de las celulasas con β -glucosidasas soportadas dentro de un reactor (2) separado del reactor (1) de hidrólisis enzimática de la lignocelulosa, dicho sustrato, previamente pretratado, estando en contacto con una solución de celulasas, el hidrolizado H1 producido durante la fase de conversión y obtenido a la salida del reactor (1) dirigiéndose a un medio filtrante (3) y a un medio de separación de tal modo que la fracción sólida y las celulasas presentes en la mezcla reactiva se queden dentro del reactor (1), antes de dirigirlo al reactor (2), la mayor parte del flujo de hidrolizado (H2) procedente del reactor (2) inyectándose de nuevo hacia el reactor (1) durante la fase de conversión.

La presente invención también describe el dispositivo en el que se realiza el procedimiento de hidrólisis enzimática.

40 **Descripción de las figuras**

La figura 1 representa un esquema del procedimiento de acuerdo con la presente invención que corresponde a la fase de conversión de la lignocelulosa.

45 La figura 2 representa un esquema del procedimiento de acuerdo con la presente invención que corresponde a la fase de producción continua de jugo azucarado.

50 Las figuras 3 corresponden a los esquemas del procedimiento de producción de jugos azucarados de acuerdo con la invención aplicado en modo discontinuo, la figura 3A correspondiendo a la fase de vaciado de los dos reactores y la figura 3B a la fase de llenado de los reactores.

La figura 4 representa un esquema del procedimiento de acuerdo con la presente invención que corresponde a la fase de vaciado completo del reactor de hidrólisis enzimática de lignocelulosa.

55 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de jugo azucarado a partir de sustrato lignocelulósico mediante hidrólisis enzimática que comprende una fase de conversión de la lignocelulosa, una fase de producción de jugo azucarado y una fase de vaciado completo de los reactores, en el que se realiza la suplementación de las celulasas con β -glucosidasas soportadas en un reactor (2) separado del reactor (1) de hidrólisis enzimática de la lignocelulosa, dicho sustrato, previamente pretratado, estando en contacto con una solución de celulasas, el hidrolizado H1 producido durante la fase de conversión y obtenido a la salida del reactor (1) dirigiéndose a un medio filtrante (3) y a un medio de separación de tal modo que la fracción sólida y las celulasas presentes en la mezcla reactiva se queden dentro del reactor (1), antes de dirigirlo al reactor (2), la mayor parte del flujo de hidrolizado (H2) procedente del reactor (2) inyectándose de nuevo hacia el reactor (1) durante la fase de conversión.

El procedimiento de acuerdo con la invención permite en particular mejorar el reciclado de las enzimas, facilitando la extracción de las β -glucosidasas del medio reactivo.

5 Otra ventaja del procedimiento de acuerdo con la invención es que se pueden disociar las condiciones de funcionamiento (temperatura y eventualmente pH) de los dos reactores y, en consecuencia, optimizarlas en el segundo reactor específico para las β -glucosidasas. Las células se extraen a la salida del reactor (1) y no se dirigen al segundo reactor.

10 Además, en el procedimiento de la presente invención, las β -glucosidasas soportadas no están en contacto con la lignina que queda en el reactor dedicado a la hidrólisis enzimática de la lignocelulosa.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención permite producir un jugo azucarado, rico en glucosa a partir de sustratos lignocelulósicos.

15 Los sustratos que se utilizan se seleccionan entre la paja, la madera, los cultivos forestales, los residuos de plantas alcoholígenas, azucareras y de los cereales, los residuos de la industria papelera y los productos de transformación de los materiales celulósicos y lignocelulósicos.

20 En el procedimiento de acuerdo con la presente invención, el hidrolizado H1 que se obtiene a la salida del reactor 1 se dirige hacia una membrana de ultrafiltración (7) que permite extraer las celulasas.

El procedimiento de producción de jugo azucarado de acuerdo con la presente invención comprende una fase de conversión de la lignocelulosa, una fase de producción propiamente dicha del jugo azucarado y una fase de vaciado completo de los reactores.

25 Para poner en práctica el procedimiento de acuerdo con la presente invención, se pone en contacto dentro del reactor (1) un sustrato lignocelulósico (S), previamente pretratado, con una solución de celulasas (E) en unas condiciones de dilución, de temperatura y de pH favorables a la hidrólisis enzimática de la lignocelulosa. El pretratamiento realizado de acuerdo con las técnicas conocidas por el experto en la materia permite mejorar la susceptibilidad del sustrato para la hidrólisis enzimática.

35 Cuando el sustrato comienza a licuarse (figura 1), la fase de conversión de la lignocelulosa produce un hidrolizado que se extrae de manera continua del reactor (1) en un medio filtrante (3) y en un medio de separación (7) de tal modo que la fracción sólida (residuo sólido de la hidrólisis enzimática) y las celulasas presentes en la mezcla reactiva se queden dentro del reactor (1). Tras pasar por el medio filtrante (3) y por el medio de separación (7), el hidrolizado (H1), que contiene unos oligómeros solubles de glucosa no fermentables, se inyecta dentro del reactor (2) en el que se pone en contacto con unas β -glucosidasas soportadas, en unas condiciones de temperatura favorables a la hidrólisis de los oligómeros solubles de glucosa (celobiosa, celotriosa...) en glucosa. El tiempo de permanencia del jugo azucarado (H1) dentro del reactor (2) se ajusta de tal modo que el contenido de oligómeros solubles residuales sea muy bajo (de preferencia inferior a 1 g/l) en el hidrolizado que se obtiene a la salida del reactor (2).

40 La temperatura dentro del reactor (1) está comprendida de manera preferente entre 40 °C y 55 °C y la del reactor (2) entre 40 °C y 70 °C.

45 Las condiciones operativas de temperatura y/o de pH de los reactores (1) y (2) pueden ser diferentes o iguales.

50 De forma muy preferente, las condiciones operativas de los reactores (1) y (2) son diferentes. De manera muy preferente, la temperatura dentro del reactor (1) está comprendida entre 45 y 55 °C y la temperatura dentro del reactor (2) está comprendida entre 60 y 70 °C.

55 El medio de separación (7) es de manera preferente una membrana de ultrafiltración. A la salida de esta membrana, el filtrado liberado de las celulasas se dirige al reactor (2), entonces el concentrado se mezcla con el flujo (H2) que sale del reactor (2). Este modo de realización permite en particular que el reactor (2) funcione, por ejemplo, a unas temperaturas más elevadas que las se utilizan de manera habitual para las celulasas.

60 El hidrolizado pobre en oligómeros solubles (H2) se extrae del reactor (2) de manera continua en un medio filtrante (4), de tal modo que las β -glucosidasas soportadas presentes en la mezcla reactiva se queden dentro del reactor (2): la selección del medio filtrante (4) se hace en función de la granulometría del soporte seleccionado para inmovilizar las enzimas soportadas.

Durante la fase de conversión, la mayor parte del flujo (H2) y de manera preferente la totalidad del flujo (H2) producido se vuelve a inyectar dentro del reactor (1).

65 Cuando se considera que la conversión es suficiente, es decir, cuando el análisis realizado indica que se ha alcanzado la concentración deseada de azúcares en el hidrolizado (H2), se pone en marcha la fase de producción

propiamente dicha de jugos azucarados, que se ilustra en las figuras 2 y 3.

La fase de producción de jugo azucarado se puede hacer de acuerdo con dos modos de realización: en modo continuo o en modo discontinuo.

5 De acuerdo con el primer modo de realización, la fase de producción se realiza en modo continuo. El flujo de hidrolizado (H2) procedente del reactor (2) se separa en al menos dos flujos (H2a) y (H2b).

10 El flujo (H2a) se introduce de manera continua dentro de un contactor (5). Este hidrolizado (H2a) se pone en contacto dentro de la instalación (5) con sustrato lignocelulósico nuevo (S) de tal modo que las celulasas presentes en el hidrolizado (H2a) se adsorban sobre el sustrato nuevo.

15 El flujo (H2b), pobre en oligómeros solubles, se vuelve a inyectar dentro del reactor (1) permitiendo de este modo mejorar las condiciones de mezclado dentro del reactor y favorecer la actividad de las celulasas por el efecto diluyente inducido, los oligómeros solubles siendo conocidos, en efecto, como productos inhibidores de la actividad de las celulasas.

20 El sustrato nuevo impregnado de celulasas (SE), procedente del contactor (5), se separa del hidrolizado (H3) antes de dirigirlo al reactor (1).

El hidrolizado (H3) que se recupera a la salida del contactor (5) corresponde al flujo de los jugos azucarados producido mediante el procedimiento.

25 De acuerdo con el segundo modo de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, la fase de producción se realiza en modo discontinuo y se hace en dos etapas (figuras 3A y 3B), la primera etapa consistiendo en el vaciado de los reactores y la segunda en una nueva puesta en marcha.

30 Se procede en un primer momento al vaciado de los reactores: el flujo (H2) procedente del reactor (2) se dirige al contactor (5), donde se pone en contacto con sustrato lignocelulósico nuevo (S) de tal modo que las celulasas introducidas en el hidrolizado (H2) a la salida del medio de separación (7) se adsorban sobre el sustrato nuevo. El hidrolizado (H3) que se obtiene a la salida del contactor corresponde al flujo de jugo azucarado producido mediante el procedimiento.

35 Al final de la fase de vaciado de los reactores, se procede a una nueva puesta en marcha de la fase de producción en modo discontinuo (figura 3B), introduciendo el sustrato nuevo impregnado de celulasas (SE) dentro del reactor (1).

40 Cuando la cantidad de residuo sólido acumulado en el reactor (1) es muy importante, se procede al vaciado completo del reactor (1) (figura 4). La mezcla reactiva recuperada se dirige a un medio filtrante (6), de tal modo que se separe la fracción sólida (residuo R), correspondiente al residuo de la hidrólisis enzimática, y a continuación hacia el medio de separación (7) a la salida del cual se obtiene una fracción líquida (H4).

45 Esta fracción líquida (H4) es un jugo azucarado. Con vistas a optimizar la producción de glucosa, si esta fracción (H4) contiene oligómeros solubles residuales, se la puede dirigir al reactor (2) antes de extraerla.

50 La fracción (H4), correspondiente al flujo producido mediante el procedimiento durante la fase de vaciado, puede eventualmente volver a introducirse en parte o totalmente dentro del reactor (1) durante la fase de puesta en marcha de la hidrólisis enzimática volviendo a introducir celulasas frescas y sustrato nuevo, o utilizarse para impregnar sustrato nuevo dentro del contactor (5).

La presente invención también describe el dispositivo en el que se aplica el procedimiento de producción de jugo azucarado que se ha descrito con anterioridad.

55 Dicho dispositivo para la producción de jugo azucarado mediante hidrólisis enzimática a partir de sustrato lignocelulósico consta de:

- 60 – al menos un primer reactor (1) para hidrólisis enzimática de la lignocelulosa, dicho reactor (1) estando provisto de al menos un conducto para la introducción de sustrato y de la solución de celulasas, de al menos un conducto para extraer el jugo convertido (H1) y dirigirlo hacia al menos un medio filtrante (3) colocado a la salida del reactor (1), y de al menos un medio de separación (7), que es de manera preferente una membrana de ultrafiltración, para extraer las celulasas del hidrolizado;
- eventualmente, un intercambiador térmico a la salida del primer reactor (no representado en las figuras);
- 65 – al menos un segundo reactor (2) que comprende las β -glucosidasas soportadas, conectado al medio de separación (7) por medio de al menos un conducto, dicho reactor (2) estando equipado con al menos un medio filtrante (4) y con al menos un conducto para la extracción del flujo (H2) formado por el hidrolizado pobre en oligómeros solubles;

- al menos un conducto para introducir al menos una parte del flujo (H2) dentro de un contactor (5) y de al menos un conducto para volver a dirigir al menos una parte del flujo (H2) dentro del reactor (1);
- al menos un contactor (5), provisto de al menos un conducto para la introducción del sustrato nuevo, de al menos un conducto para la extracción del jugo azucarado producido (H3) y de al menos un conducto para la salida del sustrato nuevo impregnado de celulasas y su introducción dentro del reactor (1).

Dicho dispositivo consta de al menos un medio filtrante (6) que se utiliza durante la fase de vaciado completo del reactor (1), de al menos un conducto para la extracción del residuo sólido R, de al menos un conducto para la extracción del flujo (H4) de jugo azucarado producido y eventualmente de al menos un conducto para la introducción del flujo (H4) dentro del reactor (2).

El reactor (1) puede ser un tanque mecánicamente agitado, o no. La agitación también estar totalmente o en parte garantizada por el bucle de circulación del jugo azucarado alrededor del reactor (1) (flujo H2b o flujo H2), utilizando unas altas velocidades de inyección.

Los medios filtrantes (3) y (6) que permiten extraer la fracción líquida de la mezcla reactiva se adaptan a la granulometría del sustrato lignocelulósico sólido. Se puede utilizar cualquier instalación conocida por el experto en la materia para realizar este fraccionamiento: sistema de filtración instalado en el interior o en el exterior del reactor incluyendo el sistema de retrolavado o limpieza asociado (bujías filtrantes, rejilla frotada mecánicamente ...), módulo de separación externo con reinyección de la fracción sólida dentro del reactor (filtro prensa, centrifugadora...). El dimensionamiento de estas instalaciones se debe adaptar al volumen que hay que tratar.

Estos medios filtrantes (3) y (6) pueden eventualmente no diferenciarse del medio de separación (7).

La aplicación de las enzimas inmovilizadas dentro del reactor (2) se puede realizar en lecho fijo o en lecho móvil o en un reactor de tipo slurry agitado. El medio filtrante (4) tiene por objeto mantener las enzimas soportadas dentro del reactor (2).

En el caso de un lecho fijo, que es la aplicación preferente, este medio (4) puede ser una rejilla o un lecho protector instalado dentro del reactor.

Para los otros modos de realización (lecho móvil o reactor de tipo slurry agitado), las instalaciones que se han descrito con anterioridad para el medio filtrante (3) también pueden ser adecuadas para el medio filtrante (4).

Para atenuar la desactivación de las β -glucosidasas soportadas, se puede realizar un refuerzo continuo con enzimas frescas junto con una extracción de enzimas desactivadas en el caso de las aplicaciones en lecho móvil o slurry. En el caso de una aplicación en lecho fijo, la sustitución de las enzimas desactivadas por enzimas nuevas se hace en modo discontinuo durante la fase de vaciado de los reactores (1) y (2) por ejemplo.

El reciclado de las celulasas efectuado en la instalación (5) se puede realizar mediante la puesta en contacto del hidrolizado (H2a) o (H4) con sustrato lignocelulósico fresco pretratado, dicho contacto haciéndose por ejemplo mediante percolación o mediante resuspensión y separación, de tal modo que se recuperen las celulasas mediante adsorción, de acuerdo con cualquier método conocido por el experto en la materia. La instalación (5) puede ser, por lo tanto, una instalación similar a la que se ha descrito para el conjunto de reactor (1) y medio filtrante (3), en los que se pueden realizar la resuspensión y filtración del sustrato.

La instalación (5) también puede ser cualquier tipo de tecnología que permita realizar una puesta en contacto líquido-sólido mediante percolación del líquido sobre el sólido en modo discontinuo o de manera preferente en modo continuo. En el caso de una puesta en contacto mediante percolación, la instalación (5) podrá incorporar, además, un sistema de filtro prensa que permite reducir la cantidad de jugo azucarado que se volverá a introducir dentro del reactor (1).

La preparación de las β -glucosidasas soportadas o inmovilizadas se realiza a partir de β -glucosidasas producidas por cepas de hongos que pertenecen a los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* o *Schizophyllum*, por ejemplo mediante *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, o mediante *Trichoderma reesei*. Estas cepas pueden haber sido modificadas genéticamente. Su inmovilización se realiza utilizando cualquier tipo de soporte (sólido o gel) conocido por el experto en la materia (resinas, Eupergit C, nanotubos de carbón activado, alúmina recubierta con una matriz polímero, polvo de nylon activado, alginato de calcio, chitosán...).

Los ejemplos siguientes ilustran la presente invención sin limitar su alcance.

Ejemplo 1: Hidrólisis enzimática de paja de trigo con reciclado de enzimas, de acuerdo con las indicaciones de la patente FR-B-2 608 625 (β -glucosidasas no soportadas)

Se ha pretratado una muestra de paja de trigo mediante explosión por vapor de agua en presencia de ácido sulfúrico de tal modo que se mejore su digestibilidad, es decir su reactividad frente a la hidrólisis enzimática. La composición

de esta muestra pretratada y lavada es la siguiente: un 56,5 % de celulosa, un 14,6 % de hemicelulosa, un 25,6 % de lignina y compuestos extraíbles (en % de materia seca). La hidrólisis enzimática de esta muestra se ha realizado en presencia de celulasas comerciales de SAF-ISIS (referencia XL-E508) complementadas con β-glucosidasas comercializadas por Novozyme (referencia SP-188). La cantidad de celulasas utilizadas en los ensayos viene expresada en unidades internacionales con "papel filtro" (uPF) y las de las β-glucosidasas en unidades internacionales "UI" (1 UI = 1 μmol de glucosa producida por minuto a partir de celobiosa).

Se ha realizado una primera serie de ensayos (A1, B1, C1 correspondiendo a los ensayos A, B y C realizados en las condiciones 1) en 3 reactores agitados que contienen cada uno 100 g de sustrato (expresado en materia seca), 480 uFP (celulasas), 1.000 ul (β-glucosidasas) en un volumen final de 1 litro. El pH se ha ajustado a 4,8 y la temperatura a 50 °C. Tras 72 horas de tiempo de hidrólisis, los residuos sólidos se han separado mediante centrifugación y los azúcares formados en el hidrolizado se han determinado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se ha realizado una segunda serie de ensayos (A2, B2, C2) en unas condiciones idénticas a las de la primera serie de ensayos, salvo en lo que se refiere a los puntos siguientes:

- el ensayo B2 se ha realizado sin adición de enzimas frescas, pero las enzimas solubles se han reciclado mediante una nueva puesta en contacto del hidrolizado obtenido al final del ensayo B1 con el sustrato nuevo y se ha reciclado el 100 % del residuo sólido obtenido al final del ensayo B1;
- el ensayo C2 se ha realizado de manera idéntica al ensayo B2, añadiendo 1.000 ul de β-glucosidasas frescas.

Se ha realizado una tercera y última serie de ensayos (A3, B3, C3) en unas condiciones estrictamente idénticas a las de la primera serie de ensayos.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 1. Los azúcares producidos tras cada serie de ensayos se han medido a partir de la determinación de los azúcares presentes en el hidrolizado final. Para las series B y C, la cuantificación de los azúcares producidos a lo largo de la segunda y la tercera series de ensayos se realiza descontando los azúcares presentes al comienzo de la hidrólisis enzimática (azúcares contenidos en el residuo sólido).

			Caso índice sin reciclado de enzimas	Reciclado enzimas sin complementación beta-glucosidasa	Reciclado enzimas con complementación beta-glucosidasa
			Ensayo A	Ensayo B	Ensayo C
Operación 1	Condiciones	Sustrato paja de trigo (g) Celulasas frescas (uPF) Beta-glucosidasas frescas (UI) Reciclado de enzimas	100 480 1.000 ninguno	100 480 1.000 ninguno	100 480 1.000 ninguno
	Azúcares producidos	Celobiosa (g) Glucosa (g)	0 42,9	0 42,9	0 42,9
Operación 2	Condiciones	Sustrato paja de trigo (g) Celulasas frescas (uPF) Beta-glucosidasas frescas (UI) Reciclado de enzimas	100 480 1.000 ninguno	100 0 0 100 %	100 0 1.000 100 %
	Azúcares producidos	Celobiosa (g) Glucosa (g)	0 42,9	5,2 17,3	0 30,5
Operación 3	Condiciones	Sustrato paja de trigo (g) Celulasas frescas (uPF) Beta-glucosidasas frescas (UI) Reciclado de enzimas	100 480 1.000 ninguno	100 0 1,0 100 %	100 0 1.000 100 %
	Azúcares producidos	Celobiosa (g) Glucosa (g)	0 42,9	7,3 14,5	0 25,7
Resultado final	Condiciones	Sustrato paja de trigo (g) Celulasas frescas (uPF) Beta-glucosidasas frescas (UI)	300 1.440 3.000	300 480 1.000	300 480 3.000
	Total glucosa producida		128,7	74,7	99,059
	% glucosa producida / caso índice		100	58,0	77,0
	Glucosa producida por unidad de enzimas (mg/uPF)		89,4	155,6	206,4

Tabla 1: Hidrólisis enzimática de paja de trigo con o sin reciclado de enzimas

Los resultados de la serie de ensayos B, correspondiente al método que se describe en la patente FR-B-2 608 625, muestran que los rendimientos que se obtienen a lo largo de las operaciones 2 y 3 se ven claramente empeorados: la producción de glucosa al término de las 3 operaciones de hidrólisis no representa más que un 58 % del caso índice. Una adición de β-glucosidasas nuevas a lo largo de las operaciones 2 y 3, realizada para la serie de ensayos C permite mejorar los rendimientos: la producción de glucosa al término de las 3 operaciones de hidrólisis representa un 77 % del caso índice (ensayo A).

Ejemplo 2: Hidrólisis enzimática de paja de trigo con reciclado de enzimas y utilización de β-glucosidasas soportadas en un reactor separado de acuerdo con el procedimiento descrito en la presente invención

Se han realizado una serie de ensayos de hidrólisis con la misma paja de trigo que en el ejemplo 1.

Se ha realizado una primera operación de hidrólisis D1 en un reactor agitado que contiene 100 g de sustrato (expresado en materia seca) y 480 uFP (celulasas) en un volumen final de 1 litro. El pH se ha ajustado a 4,8 y la temperatura a 50 °C. Tras 6 horas de tiempo de hidrólisis, la fracción líquida de la mezcla reactiva se extrae de manera continua a través de un medio filtrante, tipo membrana de ultrafiltración con un caudal de 10 ml/min para introducir de manera continua el hidrolizado sin celulasas por medio de una bomba en un segundo reactor lleno con un lecho fijo de β-glucosidasas soportadas sobre Eupergit C, preparado de acuerdo con el protocolo descrito por Tu y otros que contiene 1.000 ul (actividad β-glucosidasas). La temperatura del segundo reactor se mantiene a 60 °C. Todo el flujo procedente de este segundo reactor se vuelve a inyectar en el primer reactor de hidrólisis enzimática. Tras 66 horas de operación, se vacían los dos reactores. El residuo sólido se separa mediante centrifugación y los azúcares formados en el hidrolizado se han determinado mediante HPLC.

Se ha realizado una segunda operación D2 en unas condiciones idénticas a las de D1, salvo en lo que se refiere a los puntos siguientes:

- el ensayo D2 se ha realizado sin adición de enzimas frescas, pero las enzimas solubles se han reciclado mediante una nueva puesta en contacto del hidrolizado obtenido al final del ensayo D1 con el sustrato nuevo y se ha reciclado el 100 % del residuo sólido obtenido al final del ensayo D1.

Se ha realizado una tercera operación D3 en unas condiciones estrictamente idénticas a las del ensayo D2.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 2.

			Caso índice sin reciclado de enzimas	De acuerdo con la invención
			Ensayo A	Ensayo D
Operación 1	Condiciones	Sustrato paja de trigo (g) Celulasas frescas (uPF) Beta-glucosidasas frescas (UI) Reciclado de enzimas	100 480 1.000 ninguno	100 480 1.000
	Azúcares producidos	Celobiosa (g) Glucosa (g)	0 42,9	0 48,2
Operación 2	Condiciones	Sustrato paja de trigo (g) Celulasas frescas (uPF) Beta-glucosidasas frescas (UI) Reciclado de enzimas	100 480 1.000 ninguno	100 0 0 100 %
	Azúcares producidos	Celobiosa (g) Glucosa (g)	0 42,9	0 35,2
Operación 3	Condiciones	Sustrato paja de trigo (g) Celulasas frescas (uPF) Beta-glucosidasas frescas (UI) Reciclado de enzimas	100 480 1.000 ninguno	100 0 0 100 %
	Azúcares producidos	Celobiosa (g) Glucosa (g)	0 42,9	0 29,9
Resultado final	Condiciones	Sustrato paja de trigo (g) Celulasas frescas (uPF) Beta-glucosidasas frescas (UI)	300 1.440 3.000	300 480 1.000
	Total glucosa producida		128,7	113,27
	% glucosa producida / caso índice		100	88,0
	Glucosa producida por unidad de enzimas (mg/uPF)		89,4	236,0

Tabla 2: Hidrólisis enzimática de paja de trigo de acuerdo con la invención

La utilización de β-glucosidasas soportadas puesta en práctica en un reactor separado permite mejorar claramente los rendimientos: la producción de glucosa al término de las 3 operaciones de hidrólisis representa un 88 % del caso índice (ensayo A).

Ejemplo 3: Hidrólisis enzimática de pasta de papel con reciclado de enzimas, de acuerdo con las indicaciones de la patente FR-B-5 608 625 (β-glucosidasas no soportadas)

Las series de ensayos que se han descrito en el ejemplo 1 se han retomado con una muestra de pasta de papel no blanqueado. La composición de esta muestra es la siguiente: un 70,3 % de celulosa, un 15,9 % de hemicelulosa, un 7,6 % de lignina y compuestos extraíbles (en % de materia seca). Los resultados obtenidos, tras 48 horas de tiempo de hidrólisis se presentan en la tabla 3.

			Caso índice sin reciclado de enzimas	Reciclado enzimas sin complementación beta-glucosidasa	Reciclado enzimas con complementación beta-glucosidasa
			Ensayo A	Ensayo B	Ensayo C
Operación 1	Condiciones	Sustrato pasta de papel (g) Celulasas frescas (uPF) Beta-glucosidasas frescas (UI) Reciclado de enzimas	100 1.400 5.000 ninguno	100 1.400 5.000 ninguno	100 1.400 5.000 ninguno
	Azúcares producidos	Celobiosa (g) Glucosa (g)	0 75	0 75	0 75
Operación 2	Condiciones	Sustrato pasta de papel (g) Celulasas frescas (uPF) Beta-glucosidasas frescas (UI) Reciclado de enzimas	100 1.400 5.000 ninguno	100 0 0 100 %	100 0 5.000 100 %
	Azúcares producidos	Celobiosa (g) Glucosa (g)	0 75	4,9 47,9	0 54,1
Operación 3	Condiciones	Sustrato pasta de papel (g) Celulasas frescas (uPF) Beta-glucosidasas frescas (UI) Reciclado de enzimas	100 1.400 5.000 ninguno	100 0 0 100 %	100 0 5.000 100 %
	Azúcares producidos	Celobiosa (g) Glucosa (g)	0 75	7,3 34,9	0 44,9
Resultado final	Condiciones	Sustrato pasta de papel (g) Celulasas frescas (uPF) Beta-glucosidasas frescas (UI)	300 4.200 15.000	300 1.400 5.000	300 1.400 15.000
	Total glucosa producida		225	157,8	174
	% glucosa producida / caso índice		100,0	70,1	77,3
	Glucosa producida por unidad de enzimas (mg/uPF)		53,6	112,7	124,3

Tabla 3: Hidrólisis enzimática de pasta de papel con o sin reciclado de enzimas

5 Los resultados de la serie de ensayos B, correspondiente al método que se describe en la patente FR-B-2 608 625, muestran que los rendimientos que se obtienen a lo largo de las operaciones 2 y 3 se ven claramente empeorados: la producción de glucosa al término de las 3 operaciones de hidrólisis no representa más que un 70,1 % del caso índice. Una adición de β -glucosidasas nuevas a lo largo de las operaciones 2 y 3, realizada para la serie de ensayos 10 C permite mejorar los rendimientos: la producción de glucosa al término de las 3 operaciones de hidrólisis representa un 77,3 % del caso índice (ensayo A).

15 **Ejemplo 4:** Hidrólisis enzimática de pasta de papel con reciclado de enzimas y utilización de β -glucosidasas soportadas en un reactor separado de acuerdo con el procedimiento que se describe en la presente invención

20 Se han realizado una serie de ensayos de hidrólisis enzimática con la misma pasta de papel que en el ejemplo 3 y en unas condiciones de aplicación estrictamente idénticas a las que se describen en el ejemplo 2, con un tiempo de hidrólisis limitado a 48 horas y unas cantidades de enzimas ajustadas al nuevo sustrato seleccionado (1.400 uPF de celulasas y 5.000 UI de β -glucosidasas inmovilizadas).

			Caso índice sin reciclado de enzimas	De acuerdo con la invención
			Ensayo A	Ensayo B
Operación 1	Condiciones	Sustrato pasta de papel (g) Celulasas frescas (uPF) Beta-glucosidasas frescas (UI) Reciclado de enzimas	100 1.400 5.000 ninguno	100 1.400 5.000
	Azúcares producidos	Celobiosa (g) Glucosa (g)	0 75	0 75
Operación 2	Condiciones	Sustrato pasta de papel (g) Celulasas frescas (uPF) Beta-glucosidasas frescas (UI) Reciclado de enzimas	100 1.400 5.000 ninguno	100 0 0 100 %
	Azúcares producidos	Celobiosa (g) Glucosa (g)	0 75	0 68,9
Operación 3	Condiciones	Sustrato pasta de papel (g) Celulasas frescas (uPF) Beta-glucosidasas frescas (UI) Reciclado de enzimas	100 1.400 5.000 ninguno	100 0 0 100 %
	Azúcares producidos	Celobiosa (g) Glucosa (g)	0 75	0 64,2
Resultado final	Condiciones	Sustrato pasta de papel (g) Celulasas frescas (uPF) Beta-glucosidasas frescas (UI)	300 4.200 15.000	300 1.400 5.000
	Total glucosa producida		225	208,1
	% glucosa producida / caso índice		100,0	92,5
	Glucosa producida por unidad de enzimas (mg/uPF)		53,6	148,6

Tabla 4: Hidrólisis enzimática de pasta de papel de acuerdo con la invención

La utilización de β -glucosidasas soportadas puesta en práctica en un reactor separado también permite mejorar claramente los rendimientos: la producción de glucosa al término de las 3 operaciones de hidrólisis representa un 92,5 % del caso índice (ensayo A).

5

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de jugo azucarado a partir de sustrato lignocelulósico mediante hidrólisis enzimática que comprende una fase de conversión de la lignocelulosa, una fase de producción de jugo azucarado y una fase de vaciado completo de los reactores, en el que se realiza la suplementación de las celulasas con unas β -glucosidasas soportadas en un reactor (2) separado del reactor (1) para hidrólisis enzimática de la lignocelulosa, dicho sustrato, previamente pretratado, estando en contacto con una solución de celulasas, el hidrolizado H1 producido durante la fase de conversión y obtenido a la salida del reactor (1) dirigiéndose a un medio filtrante (3) y a un medio de separación de tal modo que la fracción sólida y las celulasas presentes en la mezcla reactiva se queden dentro del reactor (1), antes de enviarlas al reactor (2), la mayor parte del flujo de hidrolizado (H2) procedente del reactor (2) inyectándose de nuevo hacia el reactor (1) durante la fase de conversión.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el medio de separación (7) es una membrana de ultrafiltración.
3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2 en el que la totalidad del flujo de hidrolizado (H2) procedente del reactor (2) se inyecta de nuevo hacia el reactor (1) durante la fase de conversión.
4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 en el que la fase de producción de jugos azucarados se realiza de acuerdo con un modo continuo o discontinuo.
5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4 en el que la fase de producción de jugos azucarados se realiza de acuerdo con un modo continuo, el hidrolizado (H2), procedente del reactor (2) y que comprende el concentrado procedente del medio de separación (7), separándose en al menos dos flujos (H2a) y (H2b), el flujo (H2a) introduciéndose de manera continua dentro de un contactor (5) y el flujo (H2b) inyectándose de nuevo dentro del reactor (1).
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 en el que el flujo (H2a) se pone en contacto con sustrato lignocelulósico nuevo dentro de la instalación (5).
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el sustrato nuevo impregnado de celulasas (SE) procedente del contactor (5) se separa del hidrolizado (H3) antes de dirigirlo dentro del reactor (1).
8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4 en el que la fase de producción de jugos azucarados se realiza de acuerdo con un modo discontinuo, una primera etapa consistiendo en el vaciado de los reactores a lo largo de la cual el flujo de hidrolizado (H2), procedente del reactor (2), se dirige al contactor (5) donde se pone en contacto con sustrato lignocelulósico nuevo, y una segunda etapa consistiendo en una nueva puesta en marcha mediante la introducción del sustrato nuevo impregnado de celulasas (SE) dentro del reactor (1).
9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 en el que, durante la fase de vaciado completo del reactor (1), la mezcla reactiva contenida dentro del reactor (1) se dirige hacia un medio filtrante (6) donde se separa el residuo seco (R), y a continuación hacia el medio de separación (7) a la salida del cual se obtiene una fracción líquida (H4) formada por un jugo azucarado, que eventualmente se dirige hacia el reactor (2).
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 en el que la fracción líquida (H4) se introduce de nuevo totalmente o en parte dentro del reactor (1) durante la fase de puesta en marcha de la hidrólisis enzimática volviendo a introducir celulasas frescas y sustrato nuevo.
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 en el que la fracción líquida (H4) se dirige hacia el contactor 5 para impregnar sustrato nuevo.
12. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11 en el que las condiciones operativas de temperatura y/o de pH de los reactores (1) y (2) son diferentes.
13. Dispositivo para la producción de jugo azucarado mediante hidrólisis enzimática a partir de sustrato lignocelulósico que consta de:
- al menos un primer reactor (1) para hidrólisis enzimática de la lignocelulosa, dicho reactor (1) estando provisto de al menos un conducto para la introducción de sustrato y de la solución de celulasas, de al menos un conducto para extraer el jugo convertido (H1) y dirigirlo hacia al menos un medio filtrante (3) colocado a la salida del reactor (1), y de al menos un medio de separación (7) para extraer las celulasas del hidrolizado;
 - eventualmente, un intercambiador térmico a la salida del primer reactor;
 - al menos un segundo reactor (2) que comprende las β -glucosidasas soportadas, conectado a al menos un medio de separación (7) por medio de al menos un conducto, dicho reactor (2) estando equipado con al menos un medio filtrante (4) y con al menos un conducto para la extracción del flujo (H2) formado por el

hidrolizado pobre en oligómeros solubles;

- al menos un conducto para introducir al menos una parte del flujo (H2) dentro de un contactor (5) y de al menos un conducto para volver a dirigir al menos una parte del flujo (H2) al reactor (1);
- al menos un contactor (5), provisto de al menos un conducto para la introducción del sustrato nuevo, de al menos un conducto para la extracción del jugo azucarado producido (H3) y de al menos un conducto para la salida del sustrato nuevo impregnado de celulasas y su introducción dentro del reactor (1).

5

14. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 13 **que se caracteriza porque** consta de al menos un medio filtrante (6) que se utiliza durante la fase de vaciado completo del reactor (1), de al menos un conducto para la extracción del residuo sólido R, de al menos un conducto para la extracción del flujo (H4) de jugo azucarado producido y eventualmente de al menos un conducto para la introducción del flujo (H4) dentro del reactor (2).

10

15. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 13 o 14 en el que el reactor (2) que comprende las β -glucosidasas es un reactor de lecho móvil o de tipo slurry agitado, o un reactor de lecho fijo.

15

16. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 15 en el que el medio filtrante (4) es una rejilla o un lecho protector instalado dentro del reactor (2).

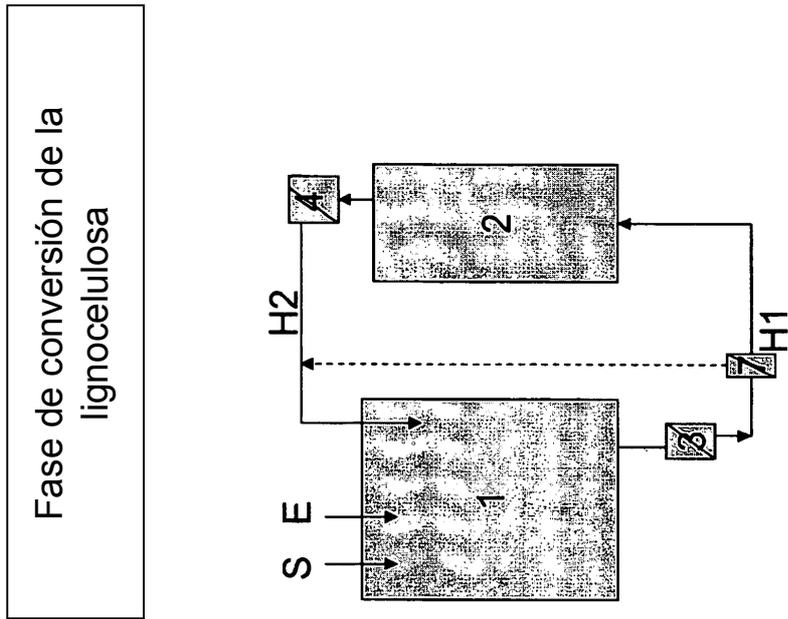


Figura 1

Fase de producción continua de jugos azucarados

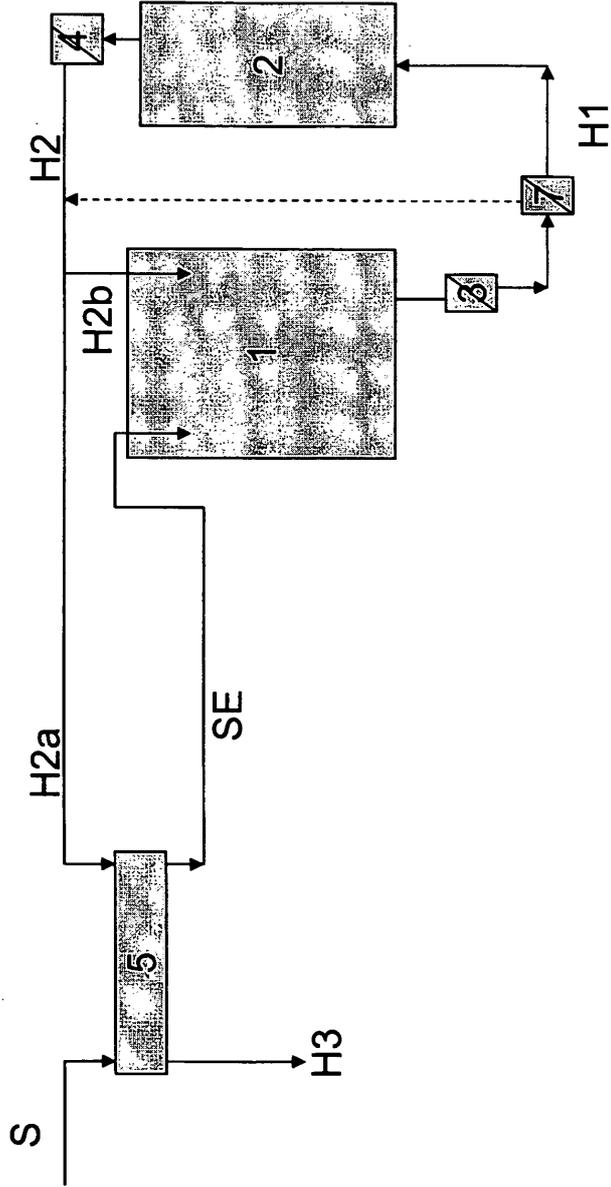


Figura 2

Fase de producción discontinua de jugos azucarados: fase de vaciado reactores 1 y 2

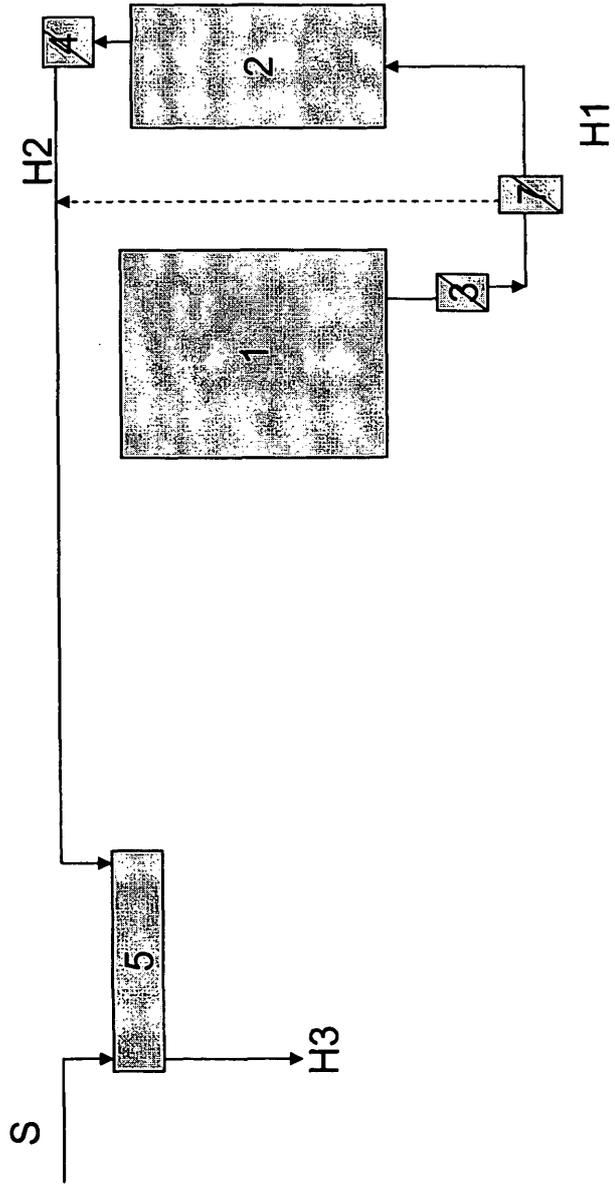


Figura 3A

Fase de producción discontinua de jugos azucarados: fase de llenado de los reactores 1 y 2

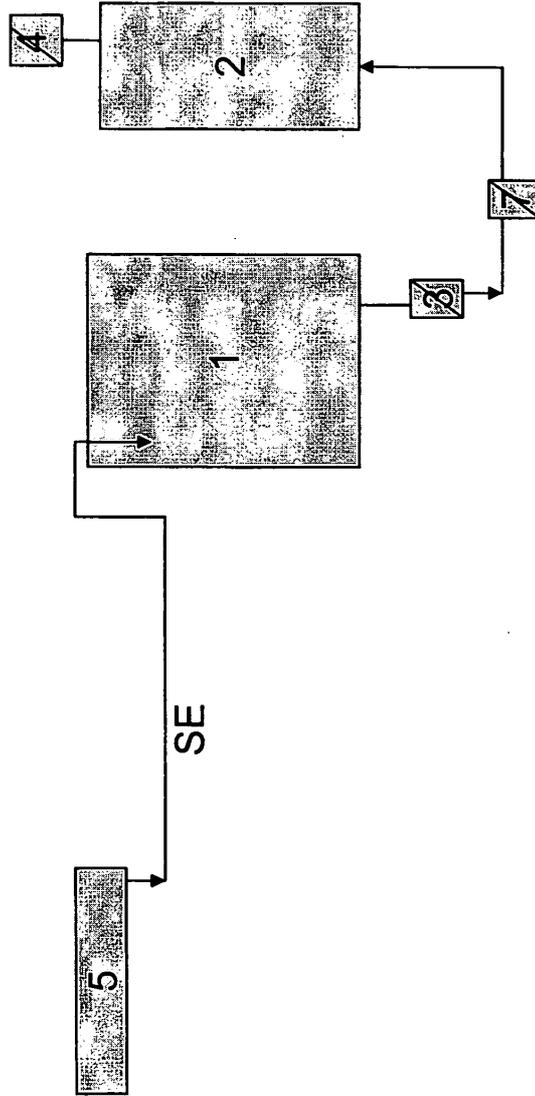


Figura 3B

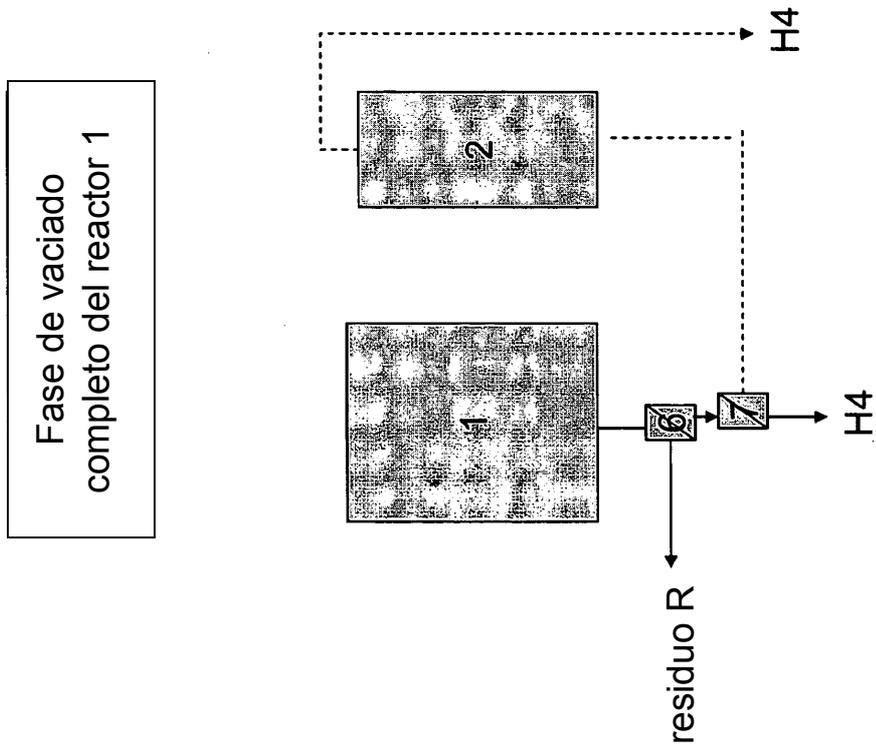


Figura 4