

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 001**

51 Int. Cl.:

C12P 7/10 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01)

C13K 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07733438 .1**

96 Fecha de presentación: **03.07.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2167672**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2010**

54 Título: **Proceso para la producción fermentativa de etanol a partir de un hidrolizado de hemicelulosa derivado del bagazo de la caña de azúcar empleando Pichai stipitis**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.06.2012

73 Titular/es:
**PETROLEO BRASILEIRO S.A. - PETROBRAS
AVENIDA REPUBLICA DO CHILE NO 65
RIO DE JANEIRO, BR**

72 Inventor/es:
**SANTANNA, Lidia, Maria, Melo;
PEREIRA, Nei;
BITANCUR, Gabriel, Jaime, Vargas;
BEVILAQUA, Juliana, Vaz;
GOMES, Absal da Conceicao y
MENEZES, Emerson, Pires**

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 382 001 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso para la producción fermentativa de etanol a partir de un hidrolizado de hemicelulosa derivado del bagazo de la caña de azúcar empleando *Pichia stipitis*

5

Campo de la invención

La presente invención es un proceso de fermentación para producir etanol usando, como material de partida, bagazo de la caña de azúcar y más específicamente un hidrolizado de la fracción *hemicelulosa* del bagazo de la caña de azúcar, obtenido por hidrólisis suave del bagazo de la caña de azúcar con ácido sulfúrico. El material hidrolizado se prensa a partir de la materia sólida que aún está dentro del reactor y el hidrolizado se neutraliza con hidróxido de calcio, para favorecer el proceso de fermentación usando una cepa de la levadura *Pichia stipitis* debidamente adaptada y aclimatada al sustrato principal del hidrolizado.

10

15 **Antecedentes de la invención**

Brasil es uno de los principales productores de etanol, procedente de la caña de azúcar, en todo el mundo, generando residuos sustanciales en forma de bagazo de caña de azúcar. Esta enorme cantidad de bagazo tiene un potencial considerable para usar como material de partida para la producción de etanol mediante procesos biotecnológicos.

20

Actualmente, una gran parte del bagazo producido en el país se quema para producir energía dentro de las propias plantas de producción de etanol. Sin embargo, existe un considerable exceso (del orden de 16 millones de toneladas) que podría causar graves problemas ambientales.

25

Técnica anterior

Por consiguiente, la tecnología para producir etanol a partir de este exceso de bagazo, además de contribuir a resolver problemas ambientales, también tendría un valor añadido para este producto residual agroindustrial, dando lugar a ventajas económicas para el país.

30

El desarrollo de la biotecnología ha dado lugar a nuevas técnicas de manipulación de microorganismos para hacerlos más resistentes y capaces de adaptarse a ambientes más adversos. Por lo tanto, se han realizado muchos estudios hacia el uso de productos secundarios o residuos agrícolas industriales, y especialmente de materiales basados en celulosa tales como paja de cereales, mazorcas de maíz, virutas de diferentes tipos de maderas y bagazo de caña de azúcar, etc., y también técnicas para adaptar microorganismos exclusivamente para la producción de alcohol a escala industrial.

35

Estudios publicados por M.D. Ferrari et al., "Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*" (John Wiley & Sons, Inc. 1992), M. Moniruzzaman, "Alcohol fermentation of enzymatic hydrolysate of exploded rice straw by *Pichia stipitis*" (World Journal of Microbiology & Biotechnology 11: 646-648, 1995); P. V. Gurgel et al., "Evaluation of sugarcane bagasse acid hydrolyzate treatments for xylitol production", (Braz. J. Chem. Eng., Vol. 15, No. 3, Sao Paulo septiembre, 1998), J. N. Nigam, "Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of *Pichia stipitis*" (Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 26: 145-150. 2001), y Heizer F. de Castro et al., "Alternative approach for utilization of pentose stream from sugarcane bagasse by an induced flocculent *Pichia stipitis*" (Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 107, No. 1, 3 de abril del 2003, págs. 547-556 (10)), son prueba de los esfuerzos de especialistas en todo el mundo para conseguir sus objetivos. Sin embargo, aunque los resultados han sido prometedores, aún son insatisfactorios porque los rendimientos conseguidos son menores que los deseados.

40

El proceso para producir alcohol de acuerdo con la presente invención representa un importante avance en cuanto a conseguir los objetivos brasileños proporcionando resultados hasta ahora no obtenidos.

45

De acuerdo con T. W. Jeffries – "Genetic Engineering of *Pichia stipitis* for the improved fermentation of xylose" (7th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Vancouver, BC, Canadá, 16-19 de junio de 1998), el rendimiento normalmente conseguido en estos procesos es de 0,3 a 0,44 g de sustrato de etanol/g tal como xilosa y la velocidad de producción es de aproximadamente 0,5 g/l.h.

50

El documento de ROBERTO, I.C. ET AL.: "Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol" (PROCESS BIOCHEMISTRY, vol. 26, 1991, páginas 15-21) describe un proceso para la producción de etanol a partir de un hidrolizado de una fracción de hemicelulosa de bagazo de caña de azúcar que comprende las etapas de homogenización del bagazo de caña de azúcar, junto con ácido sulfúrico, en el que la proporción de sólido: líquido es de 1:6, y la fermentación del hidrolizado se realiza empleando *Pichia stipitis* que no se ha adaptado al hidrolizado.

55

60

65

El documento VAN ZYL, C. ET AL.: "Production of Ethanol from Sugar Cane Bagasse Hemicellulose Hydrolyzate by *Pichia stipitis*" (APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 17, 1988, páginas 357-369) describe un proceso para producir etanol a partir de un hidrolizado de una fracción de hemicelulosa de bagazo de caña de azúcar que comprende las etapas de homogenización del bagazo de caña de azúcar junto con ácido sulfúrico, en el que la proporción de sólido: líquido es de 1:10, y la fermentación del hidrolizado se realiza empleando *Pichia stipitis* que no se ha adaptado al hidrolizado.

El documento AMARTEY, S. & JEFFRIES, T.: "An improvement in *Pichia stipitis* fermentation of acid-hydrolysed hemicellulose achieved by overliming (calcium hydroxide treatment) and strain adaptation" (WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 12, no. 3, 1996, páginas 281-283) describe el hecho de que la velocidad de fermentación de etanol a partir de un hidrolizado de una fracción de hemicelulosa de mazorca de maíz podría aumentarse si *Pichia stipitis* se hubiese adaptado al hidrolizado.

Con el proceso de la presente invención ha sido posible conseguir velocidades de producción de hasta 1,10 g/l.h. Este aumento en cuanto a la velocidad de producción hace que el proceso sea económicamente viable a escala industrial; y resuelve los problemas ambientales resultantes del exceso de residuos de caña.

Estas y otras ventajas serán evidentes a medida que se describa la invención con más detalle.

20 Sumario de la invención

La invención proporciona un proceso para producir etanol a partir de hidrolizado de una fracción de hemicelulosa de bagazo de caña de azúcar, caracterizado por que comprende las etapas de:

- 25 a) homogenización del bagazo de caña de azúcar junto con ácido sulfúrico, en el que la proporción de sólido: líquido se encuentra en el intervalo de 1:4 a 1:2;
- b) hidrólisis del material homogeneizado;
- c) extracción de la fase líquida (hidrolizado);
- 30 d) neutralización del hidrolizado;
- e) filtración del hidrolizado;
- f) fermentación del hidrolizado usando una concentración inicial de biomasa de *Pichia stipitis* aclimatada o complementada con la misma, con agitación y oxigenación.

Típicamente, la etapa de hidrólisis (b) y/o la etapa de extracción (c) se realiza en un reactor a presión.

Se prefiere que la etapa de neutralización del hidrolizado (d) se realice usando hidróxido de calcio.

Generalmente, la duración de hidrólisis en la etapa (b) se encuentra en el intervalo de 30 a 50 minutos.

40 Típicamente, la fermentación se produce en 25 a 40 horas.

La velocidad de producción es generalmente de 0,97 a 1,10 g/l.h.

45 Típicamente, el ácido sulfúrico es ácido sulfúrico diluido. Se prefiere que el ácido sulfúrico diluido tenga una concentración menor del 12% en peso, más preferentemente menor del 10% en peso, particularmente menor del 5% en peso, incluso más preferentemente menor del 2% en peso, especialmente aproximadamente del 1% en peso.

En general, la etapa de hidrólisis (b) se realiza en una autoclave.

50 La etapa de hidrólisis (b) puede realizarse a una presión menor de 2 atmósferas, preferentemente aproximadamente de 1 atmósfera. Preferentemente, la presión corresponde a una temperatura de 110-130 °C (por ejemplo, aproximadamente 121 °C).

55 Típicamente, la duración de la etapa de hidrólisis (b) se determina de acuerdo con la proporción sólido: líquido en la etapa de homogeneización (a).

60 En el proceso para producir etanol a partir de bagazo de caña azúcar de acuerdo con la presente invención, las etapas principales son la hidrólisis con ácido sulfúrico suave de la fracción de hemicelulosa del bagazo de caña de azúcar, seguido de extracción del hidrolizado y después fermentación con la levadura *Pichia stipitis*. El proceso se realiza con una proporción de sólido: líquido de 1:4 ó 1:2 (bagazo seco en g: solución de ácido en ml).

65 El proceso tiene lugar en un reactor a presión especialmente diseñado para este fin, que permite una extracción más eficaz del hidrolizado y por consiguiente una mejor realización del proceso. Un ejemplo de tal reactor a presión comprende, sustancialmente de manera preferente, un cuerpo cilíndrico cuya altura es de 0,75 a 1,25 veces su diámetro y es, sustancialmente de manera preferente, igual a su diámetro y posee, en su parte inferior, una válvula de cierre acoplado para permitir la extracción del material hidrolizado, que se proporciona con un sistema de

filtración que puede conectarse internamente que, preferentemente, comprende dos tornillos y una malla de acero inoxidable o de otro tipo, que permite la separación de las fases sólida y líquida y posee una primera tapa, usada durante el proceso de hidrólisis, que consiste en una lámina de acero o de otro tipo y una segunda tapa, empleada en la etapa de separación de sólidos, que funciona acoplada a un sistema de prensa hidráulica o de otro tipo junto con un pistón u otro dispositivo que actúa como un mecanismo a presión.

También incluye la climatización de la levadura *Pichia stipitis*, aumentando de esta manera el rendimiento y la velocidad de producción del proceso.

10 Descripción detallada de la invención

La primera etapa en el proceso comprende la hidrólisis suave de la caña de azúcar con ácido sulfúrico al 1%, con objeto de producir, preferentemente, pentosas y especialmente xilosas, que son los principales componentes de la hemicelulosa. Se sabe que una hidrólisis más violenta de las fibras de celulosa del bagazo da lugar a la formación de productos tales como furfural, metales pesados, terpenos, taninos, compuestos fenol, etc., que inhiben el crecimiento de las levaduras.

Inicialmente, *Pichia stipitis* se aclimata y se adapta al entorno de fermentación usando la técnica de cultivo celular secuencial en medios de cultivo que aumentan gradualmente el contenido de hidrolizado.

En términos generales, las etapas básicas del proceso son las siguientes:

- a) homogenización del bagazo de caña de azúcar junto con ácido sulfúrico diluido (1%) en la proporción de sólido: líquido seleccionada;
- b) hidrólisis del material homogeneizado en un reactor a presión especial (descrito más adelante), usando una autoclave con una presión de 1 atm (que corresponde a una temperatura de 121 °C) durante un tiempo que se decide para ajustar la proporción sólido:líquido, pero preferentemente está en el intervalo de 30 a 50 minutos;
- c) extracción de la fase líquida (hidrolizado), dentro del reactor a presión;
- d) neutralización del hidrolizado usando hidróxido de calcio;
- e) filtración del hidrolizado;
- f) fermentación del hidrolizado usando una concentración inicial de biomasa de *Pichia stipitis* aclimatada, o complementada con la misma, con agitación y oxigenación.

Los procesos se realizaron usando proporciones sólido: líquido de 1:4 y 1:2 para la hidrólisis y la fermentación se realizó a 3 °C, agitando a 500 rpm y con una tasa de oxigenación de 0,02 y 0,05 vvm dependiendo de la proporción sólido: líquido seleccionada, durante aproximadamente 24 a 40 horas en un biorreactor BioStat E[®]. En los procesos que usan proporciones sólido: líquido menores, el hidrolizado se complementó concentrando la biomasa aclimatada.

Los resultados promedio se presentan en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1

A (g:ml)	B (g/l)	C (g/l)	D (g/g)	E (g/g)	G (g/l.h)
1:4	60,1	25,8	0,04	0,38	0,97
1:2	120,1	38,9	0,09	0,32	1,10

En la que:

- A = proporción sólido: líquido
- B = azúcares fermentables al 100% producidos y no consumidos
- C = concentración final de etanol
- D = rendimiento de azúcar fermentable consumido expresado en términos de biomasa
- E = rendimiento de azúcar fermentable consumido expresado en términos de etanol
- F = velocidad de producción de masa por volumen

Al final del proceso de fermentación, que tardó aproximadamente 36 horas, a escala de laboratorio, usando una proporción sólido: líquido de 1:2, fue posible obtener 100 l de alcohol en el medio de fermentación por tonelada de hidrolizado de bagazo.

Para realizar el proceso de hidrólisis y extracción de la fase líquida, a partir de la mezcla líquido/sólido, se diseñó y construyó, un reactor a escala de laboratorio y un sistema a presión con una capacidad de 3,5 l, en acero inoxidable, para impedir la contaminación del hidrolizado con metales durante el tratamiento térmico.

El reactor comprendía un cuerpo cilíndrico cuya altura era similar a su diámetro, con una válvula de cierre acoplado en la parte inferior del cuerpo cilíndrico para permitir la extracción del material hidrolizado.

El reactor también se equipó con un sistema de filtración, que podía acoplarse internamente con el mismo, que consistía en dos tornillos y una malla de acero inoxidable, para separar las fases sólida y líquida.

5 Además, dos tapas, que podían ajustarse al reactor mediante tornillos, permitían usar el dispositivo tanto para la fase de hidrólisis como para la de separación. La primera tapa se usó durante el proceso de hidrólisis y consistía en una lámina de acero. La segunda tapa se empleó en la etapa de separación de sólidos y funcionaba acoplada al sistema hidráulico de la prensa, junto con un pistón, que actuaba como un mecanismo a presión.

10 Por este medio, prácticamente todo el material hidrolizado se separó y se recuperó para la siguiente etapa de fermentación. Las principales ventajas del uso de la levadura *Pichia stipitis*, que se ha aclimatado y adaptado, han sido un aumento de la velocidad de producción de alcohol y una disminución del tiempo de fermentación. La bibliografía cita tiempos de fermentación del orden de 75 horas; pero con el proceso de la invención, la fermentación proporciona resultados en 25 a 40 horas.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir etanol a partir de un hidrolizado de una fracción de hemicelulosa de bagazo de caña de azúcar, **caracterizado por que** comprende las siguientes etapas:
- 5
- a) homogenización del bagazo de caña de azúcar junto con ácido sulfúrico, en el que la proporción sólido: líquido se encuentra en el intervalo de 1:4 a 1:2;
 - b) hidrólisis del material homogeneizado;
 - c) extracción de la fase líquida (hidrolizado);
 - 10 d) neutralización del hidrolizado;
 - e) filtración del hidrolizado;
 - f) fermentación del hidrolizado usando una concentración inicial de biomasa de *Pichia stipitis* aclimatada, o complementada con la misma, con agitación y oxigenación.
- 15 2. Un proceso de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que la etapa de hidrólisis (b) y/o la etapa de extracción (c) se realizan en un reactor a presión.
3. Un proceso de acuerdo con la Reivindicación 1 ó 2, en el que la etapa (d) de neutralización del hidrolizado se realiza usando hidróxido de calcio.
- 20 4. Un proceso de acuerdo con la Reivindicación 1, 2 ó 3, **caracterizado por que** la duración de la hidrólisis en la etapa (b) se encuentra en el intervalo de 30 a 50 minutos.
5. Un proceso de acuerdo con la Reivindicación 1, 2 ó 3, **caracterizado por que** la fermentación se produce durante 25 a 40 horas.
- 25 6. Un proceso de acuerdo con cualquier Reivindicación anterior, **caracterizado por que** la velocidad de producción es de 0,97 a 1,10 g/l.h.
- 30 7. Un proceso de acuerdo con cualquier Reivindicación anterior, en el que el ácido sulfúrico es ácido sulfúrico diluido.
8. Un proceso de acuerdo con la Reivindicación 7, en el que la concentración del ácido sulfúrico diluido es inferior al 12% en peso.
- 35 9. Un proceso de acuerdo con cualquier Reivindicación anterior, en el que la etapa de hidrólisis (b) se realiza en una autoclave.
10. Un proceso de acuerdo con cualquier Reivindicación anterior, en el que la etapa de hidrólisis (b) se realiza a una presión inferior a 2 atmósferas.
- 40 11. Un proceso de acuerdo con la Reivindicación 10, en el que la presión corresponde a una temperatura de 110-130 °C.
- 45 12. Un proceso de acuerdo con cualquier Reivindicación anterior, en el que la duración de la etapa de hidrólisis (b) se determina de acuerdo con la proporción sólido: líquido que se aplica en la etapa de homogeneización (a).