

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 692**

51 Int. Cl.:

C12P 13/04 (2006.01)

C12P 5/02 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2008 E 08102622 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 1980620**

54 Título: **Procedimiento para la producción de biogás y aminoácidos a partir de un hidrolizado**

30 Prioridad:

12.04.2007 DE 102007017184

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

10.08.2015

73 Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**VILLELA FILHO, MURILLO;
SCHAARSCHMIDT, ISABELLE;
WAHL, BERND;
ROTHER, ELMAR;
ZIMMERMANN, HARTMUT y
KARAU, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 542 692 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 la producción de biogás y aminoácidos a partir de un hidrolizado

5 La invención se refiere a un procedimiento para el aprovechamiento integrado de los contenidos energéticos y materiales de hidrolizados y sólidos que resultan en la hidrólisis enzimática de materias primas renovables, en el que la disolución de la hidrólisis resultante se emplea como fuente de C en fermentaciones y los sólidos no hidrolizados se aportan a la obtención de biogás.

Estado de la técnica

10 Procedimientos fermentativos para la preparación de sustancias diana tales como, p. ej., aminoácidos, vitaminas y carotenoides por parte de microorganismos son en general conocidos. En función de las distintas condiciones del procedimiento se aprovechan en este caso diferentes fuentes de carbono. Estas abarcan desde sacarosa pura, pasando por melaza de remolacha y de caña de azúcar, las denominadas "high test molasses" (melaza de caña de azúcar invertida), hasta glucosa de hidrolizados de almidón. Para la preparación biotecnológica de L-lisina se mencionan, además de ello, ácido acético y etanol como co-sustratos utilizables a gran escala (Pfefferle et al, Biotechnological Manufacture of Lysine, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol. 79 (2003), 59-112).

20 Una fuente importante de carbono para la fermentación de microorganismos es el almidón. Éste debe primero licuarse y sacarificarse en etapas de reacción antepuestas, antes de que pueda ser utilizado como fuente de carbono en una fermentación. Para ello, el almidón se obtiene de una fuente de almidón natural tal como patatas, mandioca, cereales, p. ej., trigo, maíz, cebada, centeno o arroz, habitualmente en una forma pre-purificada, a continuación se licúa enzimáticamente y se sacarifica con el fin de ser empleado luego en la fermentación propiamente dicha para la producción de las sustancias diana.

Técnicas más recientes se ocupan de métodos mejorados que deben posibilitar la preparación de medios de fermentación a partir de recursos renovables (documentos EP 1205557, US 2002/079268).

25 Se describió ya también un procedimiento fermentativo con el que debe ser posible emplear el almidón como fuente de carbono (documento WO 2005116228).

30 En una fermentación no sólo se forma el producto deseado, sino que, básicamente, también biomasa. Esta biomasa se elimina como producto de desecho o ha de ser aprovechada de otro modo y, debido a su formación, reduce el rendimiento (producto por precursor) del proceso. En el caso de la preparación fermentativa de etanol se producen, por lo tanto, a menudo alimentos para animales complejos en forma de co-productos. En el denominado proceso Dry-Milling (de molienda en seco), mediante el cual se prepara aproximadamente el 65% del etanol, sólo en los Estados Unidos de América se preparan casi cuatro toneladas de DDGS (siglas inglesas de cereales secos de destilería con componentes solubles) (Lyons 2003, Jacques 2003). En resumen, el denominado proceso Dry-Milling se puede describir de la siguiente forma: los granos de cereales se muelen en un molino para formar partículas finas y se mezclan con líquido. Este puré se trata entonces con una enzima licuante con el fin de hidrolizar el cereal para formar dextrinas, que son una mezcla a base de oligosacáridos. La hidrólisis de almidón con la enzima licuante, denominada α -amilasa, se lleva a cabo por encima de la temperatura de gelificación del cereal. El puré se hierve a una temperatura correspondiente con el fin de disgregar la estructura granular del almidón y desencadenar la gelificación. Finalmente, las dextrinas resultantes se continúan hidrolizando en un proceso de sacarificación con la exoenzima glucoamilasa para formar glucosa. Los DDGS que resultan en este caso es el co-producto principal en la preparación de etanol. Aproximadamente el 80% de estos DDGS son dados como alimento a rumiantes. Esto significa que el aprovechamiento sólo es rentable en el caso de que en el entorno de la instalación de producción existan suficientes instalaciones de crianza de rumiantes que sean consumidoras de los DDGS.

45 Este aprovechamiento de productos secundarios de la preparación fermentativa de etanol como alimentos para animales complejos debe diferenciarse, sin embargo, de la preparación de sustancias diana adecuadas como aditivos para alimentos para animales. En el caso de estos procedimientos, se producen por fermentación, por ejemplo, aminoácidos o vitaminas como productos principales y encuentran aplicación en la alimentación de animales. En este caso, en el proceso de fermentación resultan adicionalmente productos secundarios complejos que contienen la biomasa. Una posibilidad para el aprovechamiento de los productos secundarios es la preparación de fertilizantes a partir del caldo de fermentación (Ideka 2003). Para la preparación de lisinas se emplean también procesos en los que el producto no es purificado después de la fermentación, sino que la biomasa es vendida

conjuntamente como componente del aditivo del alimento para animales (Biolys[®], documento US 5.431.933). Como idea adicional para el aprovechamiento de la biomasa resultante se publicó el reciclaje de la biomasa (Blaesen et. al 2005). En el caso de este procedimiento puede aumentarse, en el caso de procesos de fermentación, mediante el reciclaje a la fermentación de la biomasa que resulta como precursor, el rendimiento medio y reducirse la cantidad residual a eliminar.

Del estado de la técnica se conoce la degradación anaerobia de sustancia orgánica por parte de bacterias, en la que resulta biogás que se compone en un 50-85% de metano. La energía almacenada en el biogás y obtenida a partir del mismo se designa como renovable, dado que procede de una sustancia orgánica renovable. Adicionalmente, el aprovechamiento energético de biogás, a diferencia de la combustión de gas natural, petróleo o carbón, es neutro para el dióxido de carbono, dado que el dióxido de carbono resultante se mueve en el circuito natural de carbono y es consumido de nuevo por las plantas durante su crecimiento.

El biogás es un portador de energía muy valioso, es decir, puede ser aprovechado de múltiples maneras y con un elevado grado de eficacia. La fuente de ingresos principal en la producción de biogás es actualmente el beneficio del uso para la producción de electricidad. A través del denominado acoplamiento fuerza-calor, el biogás se utiliza clásicamente como combustible en el motor de combustión interna que acciona a un generador para la creación de corriente de la red (corriente alterna o bien corriente trifásica). El calor residual del motor que resulta al mismo tiempo a partir de enfriamiento y gas de escape puede aprovecharse para el calentamiento. Como alternativa a la generación de energía con un grado de eficacia más elevado se emplean ya también celdas de combustible. El biogás puede prepararse también a partir de residuos de la producción de L-lisina (Viesturs et al. 1987 Proc. Latv. Acad. Sci 8 (841): 102-105). Otro procedimiento ha de posibilitar en un proceso integrado la preparación paralela de carne (o leche), etanol, alimentos para ganado y biogás (biofertilizante) (documento US 2005/0153410). En el caso de utilizar co-precusores con contenido en proteínas en procesos de fermentación anaerobios se puede topar con dificultades, dado que las proteínas pueden experimentar, en el caso de variaciones del valor del pH y en presencia de cationes divalentes, variaciones estructurales que pueden impedir un ataque enzimático posterior (Mulder 2003, Biological wastewater treatment for industrial effluents; technology and operation, Paques B.V., 3.1 Fermentation).

El proceso de degradación típico de material orgánico para formar biogás consiste esencialmente en cuatro etapas.

En la primera etapa (hidrólisis), bacterias aerobias transforman las sustancias orgánicas de elevado peso molecular (proteínas, hidratos de carbono, grasas, celulosa), con ayuda de enzimas, en compuestos de bajo peso molecular tales como azúcares sencillos, aminoácidos, ácidos grasos y agua. Las enzimas secretadas por las bacterias hidrolíticas se adhieren a la cara exterior de las bacterias (las denominadas exoenzimas) y con ello disocian hidrolíticamente los componentes orgánicos del sustrato en pequeñas moléculas solubles en agua. En la segunda etapa (acidificación) las moléculas individuales son degradadas y transformadas de manera intracelular por bacterias formadoras de ácidos. Se trata en este caso de especies aerobias facultativas que consumen el oxígeno todavía remanente y, de esta forma, crean las condiciones anaerobias necesarias para las bacterias del metano. En este caso, se generan principalmente ácidos grasos de cadena corta, alcoholes de bajo peso molecular y gases. En la tercera etapa (formación de ácido acético), bacterias del ácido acético producen, a partir de los ácidos orgánicos, los productos de partida para la formación de metano (ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno). En la cuarta etapa (formación de metano) las bacterias del metano forman el metano (Eder y Schulz 2006).

Planteamiento del problema

Los costes para la habilitación de la fuente de carbono influyen, al igual que los costes energéticos, considerablemente sobre los márgenes en el sector de los productos químicos nobles. El factor mayor en los costes de producción de, por ejemplo, L-lisina es la fuente de C (Pfefferle et al. 2003). El precio del azúcar se ve sometido a fuertes oscilaciones y tiene una influencia de mucho peso sobre la rentabilidad de los procesos de fermentación, ante todo en el caso de los productos en serie de bajo precio tales como glutamato monosódico, L-lisina-HCl y L-treonina, cuyo mercado viene determinado fuertemente por la competencia (Ikeda, 2003). La habilitación de fuentes de carbono adecuadas para el aprovechamiento fermentativo a partir de materias primas renovables favorables no es, sin embargo, técnicamente trivial. Durante el tratamiento de estas fuentes de carbono mediante hidrólisis resultan restos vegetales fibrosos en forma de productos residuales a eliminar. Adicionalmente, durante la fermentación se forma biomasa como producto residual a eliminar. Si se elige la generación de biogás como procedimiento de eliminación, se puede topar con dificultades durante el uso de co-precusores con contenido en proteínas en el proceso de fermentación anaerobio empleado en este caso. Las proteínas pueden experimentar variaciones estructurales en el caso de variaciones del valor del pH en presencia de cationes divalentes, que pueden impedir un posterior ataque enzimático (Mulder 2003). Oscilaciones en la calidad de las materias primas dificultan adicionalmente una realización estable y reproducible del proceso durante la preparación de biogás.

Planteamiento de la misión

Es misión de la presente invención proporcionar un procedimiento integrado para la preparación de aminoácidos proteínogénicos a partir de materias primas renovables, en el que resulten menos sustancias residuales y se aproveche mejor el contenido energético de las materias primas.

5 Objeto de la invención es un procedimiento para el aprovechamiento integrado de los contenidos energéticos y materiales de disoluciones y sólidos que resultan en la hidrólisis enzimática de materias primas renovables con contenido en almidón, que comprende:

- 10 a) la preparación, mediante hidrólisis enzimática, de una mezcla de hidrólisis acuosa que contiene al menos una fuente de carbono aprovechable por el microorganismo empleado para la preparación de un aminoácido proteínogénico, a base de materias primas renovables,
- b) el uso de esta mezcla acuosa en la preparación de aminoácidos proteínogénicos mediante fermentación, en donde
- c) antes de la etapa b) se separan los componentes sólidos de la mezcla de hidrólisis que resulta en la etapa a), y
- 15 d) los componentes sólidos de la mezcla de hidrólisis que resulta en la etapa a) y la biomasa que resulta en la fermentación en la etapa b) se someten a una co-fermentación anaerobia para la preparación de biogás, en donde el biogás resultante se recoge, se calcina y se transforma en energía calorífica y/o eléctrica y se emplea en una o varias etapas del procedimiento del proceso (véase la Figura 1).

20 Como fuente de almidón entran en consideración, ante todo, carióspsides o semillas que, en estado seco, presentan una proporción de almidón de al menos 40% en peso y preferiblemente de al menos 50% en peso. Éstas se encuentran en muchas plantas de cereales cultivadas a gran escala tales como maíz, trigo, avena, cebada, centeno, arroz y diferentes de especies de mijo, p. ej., sorgo y milo. Preferiblemente, como fuente de almidón se eligen cereales, de manera particularmente preferida maíz, centeno y trigo. Básicamente, el procedimiento de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo con otras fuentes de almidón tales como, por ejemplo, patatas, tapioca o una
25 mezcla de diferentes frutos o semillas con contenido en almidón.

Las mezclas preparadas mediante hidrólisis enzimática contienen azúcares de los que se trata preferiblemente de monosacáridos tales como hexosas y pentosas, p. ej., glucosa, fructosa, manosa, galactosa, sorbosa, xilosa, arabinosa y ribosa, en particular se trata de glucosa. La proporción de monosacáridos distintos a la glucosa puede variar en función de la fuente de almidón utilizada y de los componentes que no contienen almidón contenidos en
30 ella.

Estos procedimientos de hidrólisis son conocidos del estado de la técnica (documento WO 2005/116228).

El medio nutritivo con contenido en azúcares, preparado a partir de la mezcla de hidrólisis después de la separación de los sólidos remanentes, se utiliza para la preparación fermentativa de aminoácidos proteínogénicos. Para ello, la mezcla preparada en la etapa a) se aporta, después de la separación de los sólidos, a una fermentación conforme a
35 b). La realización del proceso de fermentación puede tener lugar de la forma habitual conocida por el experto en la materia.

Aminoácidos proteínogénicos son preferiblemente lisina, metionina, fenilalanina, triptófano y treonina.

Microorganismos empleados de acuerdo con la invención se eligen preferiblemente de los géneros Corynebacterium, Bacillus, Ashbya, Escherichia, Aspergillus, Alcaligenes, Actinobacillus, Anaerobiospirillum, Lactobacillus, Propionibacterium y Clostridium, en particular de las cepas de Corynebacterium glutamicum, Bacillus subtilis, Ashbya gossypii, Escherichia coli, Aspergillus niger o Alcaligenes latus, Anaerobiospirillum succiniproducens, Actinobacillus succinogenes, Lactobacillus delbrückii, Lactobacillus leichmanni, Propionibacterium arabinosum, Propionibacterium schermanii, Propionibacterium freudenreichii, Clostridium propionicum y Clostridium acetobutilicum.
40

45 En una forma de realización preferida, en el caso del aminoácido proteínogénico preparado mediante fermentación de trata de L-lisina. Para llevar a cabo la fermentación pueden aplicarse en este caso condiciones y modos de

proceder análogos a los que se describen, p. ej., en Pfefferle et al., véase cita anterior, y en el documento US 3.708.395. En principio se consideran tanto un modo de funcionamiento continuo como también discontinuo (en tandas o alimentado en tandas), se prefiere el modo de funcionamiento alimentado en tandas.

5 La capacidad de realización del procedimiento de acuerdo con la invención se muestra con ayuda de la hidrólisis enzimática de harina integral de maíz, grano partido fino de harina integral de trigo, harina integral de centeno (tipo 1159) y grano partido fino de harina integral de centeno con tres enzimas diferentes. La separación de la fase sólida (proporción de fibras) tiene lugar mediante filtración con presión, filtración en el campo centrífugo, sedimentación en el campo centrífugo así como lavado. El medio nutritivo obtenido a partir del hidrolizado se concentra en el evaporador de rotación en vacío y, a continuación, se esteriliza mediante autoclave. La idoneidad de un hidrolizado de trigo procesado de este modo como fuente de carbono para la preparación fermentativa de productos químicos nobles se demostró en el ejemplo de la preparación de L-lisina con la cepa de *Brevibacterium flavum* DM1730 (Georgi et al. 2005) tanto en experimentos con matraces sacudidos con una realización escalonada del proceso como también en la caldera con agitador en un proceso de alimentación. En este caso, se demostró, sorprendentemente, que los experimentos con hidrolizado conducían a rendimientos espacio-tiempo claramente mejorados que el experimento control con una disolución de glucosa estándar.

La fermentación del resto de hidrolizado separado o bien del residuo de fermentación tiene lugar según procedimientos conocidos del estado de la técnica.

20 La carga de un reactor de biogás puede tener lugar de forma continua o discontinua. En el caso de la carga discontinua, el denominado principio "batch", todo el tanque digestor es cargado de una vez. La carga es digerida sin cambio del sustrato hasta el final del tiempo de permanencia elegido. Con ello, después de la carga se inicia la producción de gas, alcanza un máximo y luego se aplanan. Después de transcurrido el tiempo de permanencia, el tanque es vaciado por completo, a excepción de un resto que actúa como material de inoculación, para la siguiente carga.

25 Para la carga y el vaciado fluido junto al tanque digestor es también necesario un tanque de reserva y almacenamiento del mismo tamaño. La producción irregular de gas puede compensarse mediante varios pequeños fermentadores que son cargados de forma desplazada en fase. Sin embargo, varios recipientes más pequeños determinan elevados costes específicos. También son desventajosos los procesos de degradación ligados con pérdidas de metano en el depósito previo durante el largo tiempo hasta el vaciado del tanque digestor.

30 Por estos motivos, la demanda de una tecnología de procedimiento en tandas es muy baja. Sin embargo, la misma se elige para ensayos de laboratorio con el fin de examinar un sustrato en cuanto a su comportamiento en el fermentador y sus rendimientos de gas.

35 Son ventajosos fermentadores que son cargados continuamente con las sustancias a fermentar, siendo bombeada al mismo tiempo una cantidad correspondiente de sustrato digerido. Con ello comienza una putrefacción que tiene lugar permanentemente con una producción de gas constante y, además, se previene una acidificación debido a la adición frecuente de pequeñas cantidades de sustrato.

La instalación de biogás para la fermentación conjunta del resto de hidrolizado y del residuo de fermentación se diseña, por lo tanto, en particular como una instalación cargada de forma continua.

40 La degradación anaerobia es llevada a cabo por una población mixta de bacterias en diferentes intervalos de temperaturas, diferenciándose entre modos de proceder termófilos y mesófilos. Bacterias de este tipo están contenidas en el lodo de pudrición habitual de instalaciones de clarificación.

El modo de proceder mesófilo se mantiene en este caso más estable con respecto al modo de proceder termófilo en el caso de oscilaciones de temperatura.

45 Una buena mezclado a fondo y distribución influyen en gran medida sobre la velocidad y la compleción de la degradación anaerobia. Una intensa mezclado a fondo reduce los gradientes de temperatura y del valor del pH dentro del fermentador y posibilita una fácil salida de las burbujitas de gas. Al mismo tiempo se reduce o evita la formación de capas flotantes y sumergidas, así como se alcanza una buena mezclado a fondo del sustrato reciente con el sustrato de fermentación. En contra de una intensa mezclado a fondo se encuentra el elevado consumo de energía. Además, para una buena metanización se ha de aspirar a una circulación moderada, con el fin de no influir negativamente sobre la simbiosis entre los grupos de microorganismos acetógenos y metanógenos mediante sollicitación de cizalla, dado que, de lo contrario, disminuye la producción de metano.

50

El tiempo de permanencia del sustrato es una magnitud importante para el dimensionamiento del reactor de biogás. A pesar de que el tiempo de permanencia teóricamente necesario para la degradación de los materiales orgánicos en ensayos por tandas de laboratorio es mucho más corto, en la práctica se han acreditado 50-80 días para la fermentación de materias primas renovables y fertilizantes industriales. Un parámetro importante que incluye el tiempo de permanencia es la denominada solicitación del recinto de digestión. Con ello se designa la cantidad de sustancia seca orgánica que es aportada diariamente al fermentador. Viene dada en kilogramos de sustancia seca orgánica por m³ de volumen de fermentador y día. Una optimización de la solicitación del recinto de digestión es uno de los puntos más importantes para un funcionamiento eficaz de una instalación de biogás. Una solicitación del recinto demasiado escasa es desfavorable, dado que las capacidades dadas no son aprovechadas por completo y, por consiguiente, una instalación de biogás no proporciona el beneficio industrial máximo. Una solicitación del recinto demasiado elevada conduce a una inestabilidad del proceso de fermentación, con lo cual peligran un funcionamiento continuo de la instalación.

Se examinó experimentalmente la formación de biogás procedente del resto de hidrolizado de trigo (proporción de fibra), del residuo de fermentación (biomasa en exceso) y de una mezcla de ambos (mediante la denominada co-fermentación). En detalle, se determinó el potencial de biogás, es decir la composición del biogás y la cantidad de los componentes con una estructura de ensayo adecuada. Se compararon los resultados de las fermentaciones del hidrolizado de trigo y del residuo de fermentación así como de la co-fermentación. En este caso, se demostró que en la co-fermentación se pueden alcanzar rendimientos específicos de biogás más elevados que en las fermentaciones individuales de restos de fibras o desechos de biomasa solos. El elevado contenido en proteínas de la biomasa no tuvo en este caso, de manera sorprendente, influencia negativa alguna sobre la generación de biogás.

En el procedimiento de acuerdo con la invención la energía/el calor que resulta en la etapa d) del procedimiento conforme a la reivindicación 1 es introducido en uno o varios puntos adecuados en el proceso integrado de acuerdo con la invención (véase la Figura 2). La biomasa que resulta en la fermentación aerobia para la preparación de los aminoácidos proteínogénicos es alimentada a la fermentación anaerobia para la producción del biogás, cuyo componente aprovechable se compone de metano (véase la Figura 3).

El aprovechamiento energético más completo y la integración más completa la ofrece el transcurso del procedimiento conforme a la Figura 4.

Allí, la alimentación de la energía y el calor que resultan en el proceso de fermentación tiene lugar en uno o varios puntos en el proceso integrado mientras que al mismo tiempo se obtiene energía de la biomasa en la etapa de fermentación.

El proceso integrado de acuerdo con la invención se manifiesta como económico, dado que emplean materias primas renovables. Los residuos fibrosos que resultan en el tratamiento de las materias primas renovables en fuentes de carbono aprovechables en la fermentación mediante hidrólisis enzimática se separan antes de la fermentación, se fermentan para formar biogás, el cual, en general, se transforma ulteriormente en energía eléctrica o calor. En especial, con la energía o el calor obtenido se abastecen al menos algunas etapas del proceso y, por consiguiente, se reduce la demanda de energía neta del procedimiento integrado.

La biomasa que resulta durante la preparación fermentativa se alimenta transversalmente como co-precursor en la generación de biogás y, con ello, aumenta el rendimiento de biogás. En este caso, el co-precursor para la producción de biogás (biomasa a partir de la preparación de sustancia diana) es de una calidad comparativamente constante, lo cual favorece de nuevo una realización más reproducible del proceso en la generación de biogás. En conjunto, resultan cantidades claramente menores de productos residuales y productos secundarios que en procedimientos parciales conocidos.

Bibliografía:

- Blaesen M, Flaschel E, Friehs K (2006) Chem. Ing. Tech 78(3): 267-272
- Busch R, Hirth T, Liese A et al. (2006) Chem. Ing. Tech. 78(3): 219-228
- Eder B, Schulz H (2006) Biogas - Praxis: Grundlagen, Planung, Anlagenbau, Beispiele, Wirtschaftlichkeit, 3ª ed., Ökobuch Verlag, Staufen
- Georgi T, Rittmann D, Wendisch VF (2005) Metab. Eng. 7(4): 291-301
- Ikeda M (2003) Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 79:1-35
- Pfeufferle W, Möckel B, Bathe B, Marx A (2003) Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 79:59-112
- Lyons TP (2003) págs. 1-7 en: Jacques KA et al. (comps.) The alcohol textbook, 4ª ed. Nottingham University Press, Nottingham

- Mulder R (2003) Biological wastewater treatment for industrial effluents: technology and operation, Paques B. V., Balk
- Viesturs U, Dubrovskis V, Sakse A, Ruklisha M (1987) Proc, Latv. Acad. Sci. 8(481): 102-105

Descripción del ensayo

5 1.

Spirizyme® Plus (amiloglucosidasa)	Novozymes, Dinamarca
Termamyl® SC (alfa-amilasa)	Novozymes, Dinamarca
Shearzyme® 500 L (xilanasas)	Novozymes, Dinamarca
BAN (alfa-amilasa)	Novozymes, Dinamarca

Tabla 1: Enzimas utilizadas

2. Hidrólisis enzimática

10 2.1. Se hidrolizaron enzimáticamente harinas de maíz (harina integral de maíz), de trigo (grano partido fino de harina integral de trigo) y de centeno (harina integral de centeno y grano partido fino de harina integral de centeno). Para ello, 300 g de harina se suspendieron en 610 ml de agua (al 33% p/p). Como recipiente agitador servía un biorreactor Braun B-DCU con electrodo de pH, regulación de temperatura, refrigerador del aire de escape, agitador de discos

15 Para las fases de suspensión, licuación y sacarificación se añadieron las enzimas indicadas en la Tabla 1 y se mantuvieron los parámetros correspondientes (véase la Tabla 2). Para el ajuste del valor del pH se utilizó ácido sulfúrico 2,5 M. El residuo se sometió a ensayo en cuanto al contenido de glucosa con el aparato de medición 7100MBS de YSI. La reacción finalizó aprox. 28 horas después del comienzo de la etapa de licuación.

Tabla 2 Parámetros de la hidrólisis

	Adición de enzima	pH	T [min]	T [°C]	Número de revoluciones [rpm]
Suspensión	0,051 mL Shearzyme ¹ , 0,3 mL BAN ²	5,7	30	55	800 1500 (centeno)
Licuación	0,12 mL Termamyl SC	5,5-5,8	90	85	1000
Sacarificación	0,270 mL Spirizyme Plus	4,5-5,0	aprox. 28	60	1000

¹: sólo en harinas de trigo y centeno
²: sólo en harinas de centeno

20

2.2 Lavado

El lavado de la glucosa del resto de sólidos se llevó a cabo por tandas.

25 Por cada paso se resuspendió en agua totalmente desalinizada y se centrifugó. El proceso de lavado finalizó cuando en el agua de lavado era detectable menos de uno por ciento de la concentración de partida de glucosa.

2.3 Concentración

Los hidrolizados de grano partido fino de harina integral de trigo, harina integral de centeno y grano partido fino de harina integral de centeno se concentraron en el evaporador de vacío. Los ensayos se llevaron a cabo a diferentes temperaturas y presiones aplicadas. La concentración másica de glucosa en las disoluciones se determinó antes y después de la etapa de concentración.

2.4 Esterilización

Los ensayos de esterilización se llevaron a cabo con el grano partido fino de harina integral de trigo concentrado - disoluciones de glucosa. Por cada ensayo se pesaron 7 g de disolución en un frasco de vidrio de 100 mL. En un autoclave con un volumen interno de 75 L se ajustaron los tiempos de permanencia y las temperaturas de esterilización correspondientes. Durante el proceso se recogieron en el autoclave los datos de temperatura y presión a través de un registrador de datos.

Estos datos deberían servir para la comparación de los distintos ensayos.

Con un espectrofotómetro se registró la extinción de las disoluciones en el intervalo de las longitudes de onda de 200 nm a 800 nm.

15 3. Balance de masas

Con el balance de masas se ha de establecer el rendimiento de glucosa por cantidad de materia prima empleada. Se ha de representar el valor de recuperación y mostrar la unidad del equilibrio. Esto incluye la cuantificación del resto de sólidos y de la proporción de proteínas, lípidos, pentosanos, glucosa y otros azúcares en la disolución.

Como base para el balance de masas se determinaron la humedad residual, el contenido en pentosanos y el contenido en almidón de las harinas empleadas. La fase acuosa del hidrolizado se examinó en cuanto al contenido en proteínas. Se analizó el sobrenadante acuoso de una hidrólisis de harina integral de maíz. La concentración de proteínas ascendió a 0,66 mg/mL. Esto correspondía a 0,05% del peso neto de la harina. Con ello se puede partir del hecho de que sólo cantidades despreciables de la proteína pasan a disolución, o bien que la proteína detectada ha de asociarse a las enzimas añadidas. Para comparación, la proporción de proteínas en la harina de maíz se encuentra en 9,2%. La porción de proteínas se ha de asumir, por consiguiente, en el resto sólido.

Los valores de recuperación se representan en la Figura 5. La unidad de la balanza de masas era en el caso del grano partido fino de harina integral de trigo, WSF con un 98% el mejor. La unidad se encontraba para MVM en 90,2% (en MVM) y para harina integral de centeno y grano partido fino de harina integral de centeno RMV y RSF en 83,5% o bien 81%. En la figura se muestra, además, la relación de la proporción en volumen de resto sólido. El resto sólido de grano partido fino de harina integral de trigo era comparativamente el más bajo. Esto significa también que la proporción de glucosa en el sobrenadante era la mayor. Igualmente lo es la relación de glucosa en el sobrenadante y la proporción de sólidos en la harina integral de maíz, harina integral de centeno e hidrolizados de grano partido fino de harina integral de centeno. Cuanto mayor sea el volumen de sólidos, tanto menos glucosa se encuentra en el sobrenadante. Es decir, la disolución de glucosa está incluida en el sólido.

40 4. Ensayos para la separación de sólidos

Se llevaron a cabo ensayos de centrifugación con las suspensiones de hidrólisis de grano partido fino de harina integral de trigo, harina integral de centeno, grano partido fino de harina integral de centeno y harina integral de maíz. En este caso, se centrifugaron muestras en recipientes graduados durante 20 min a 4800 RCF (Minifuge; Heraeus). En otros ensayos se examinó el comportamiento en la separación de sólidos en el grano partido fino de harina integral de trigo (Tabla 3).

4.1 Propiedades de la suspensión

	Método	Aparato
Viscosidad	Viscosímetro de rotación	Haake: Rheostress 600
Conductividad	Conductométrico	WTW: LF 323
Potencial zeta	Determinación del punto isoeléctrico	DT 1200
Granulometría	Espectrómetro de difracción de rayos láser	HORIBA LA920
Valor del pH	Electrodo de pH	Mettler-Toledo
Composición química de la porción fina	Análisis elemental	
Efecto tampón del hidrolizado	Titulación con ácido clorhídrico 1M	Electrodo de pH; Mettler-Toledo

4.2 Filtración

5 Filtración de la suspensión en una celda de filtración solicitable a presión. La superficie de filtración ascendió a 20 cm². El flujo pudo registrarse a través de una balanza con sistema de determinación acoplado (Filtratest®; BOKELA). Al término de la filtración, se determinaron el grosor de la torta y el TS de la torta.

4.3 Centrifuga de filtración

10 Filtración en el campo centrífugo (Megafuge 1.0; Heraeus), en una copa de filtración a un valor de centrifugación de 1500 g y tiempos entre un minuto y diez minutos. Además, se variaron la temperatura y el valor del pH (véanse los resultados y la discusión). La superficie de filtración ascendió a 15 cm². Al término del proceso se determinaron el espesor de la torta y el TS de la torta.

4.4 Sedimentación

15 La sedimentación se llevó a cabo en el campo centrífugo en vasos de centrifuga de 10 mL. El valor de centrifugación ascendió en cada caso a 3000 g. Se variaron el valor del pH, la temperatura y el tiempo de centrifugación. Se documentó la proporción en volumen de sobrenadante y fases sólidas, así como se determinó el TS de las fases sólidas.

4.5 Formación de biogás del resto de hidrolizado

20 La cantidad de biogás y su contenido en metano se determinan con el sistema de medición OxiTop®-Control a escala de laboratorio. La medición se basa en el aumento de presión por la formación de biogás en el frasco de medición (Figura 6).

25 Primero se determina el volumen del recinto de gas de los frascos de medición empleados incluidas todas las estructuras interiores (manguitos de caucho vulcanizado, varilla agitadora magnética). El armario de termostato se ajusta a 35°C y se incorpora una plancha agitadora. El agua del grifo prevista para ser utilizada y el lodo de pudrición reciente se desgasifican durante algunos minutos con nitrógeno con el fin de eliminar el oxígeno contenido, y se atemperan a 35°C. Antes del comienzo del ensayo, el lodo de pudrición se empobrece entre uno y cinco días.

30 Los frascos de medición se colocan con una varilla agitadora magnética en un sistema de agitación inductivo y se cargan con 400 ml del agua del grifo preparada. Después, se añade el resto de hidrolizado pesado que se compone, en particular, de porciones de fibras, y mediante gasificación de los frascos con nitrógeno se garantiza una atmósfera lo más anaerobia posible. El recipiente con contenido en el lodo de pudrición se gasifica asimismo con nitrógeno. Después de la agitación se transfieren 50 ml del mismo con una pipeta a los frascos de medición. Después de la medición del valor del pH, éste se corrige eventualmente con ácido clorhídrico diluido o lejía de sosa (0,5 mol/l) a pH 7 ± 0,2. Los frascos se cierran y después de la activación de las cabezas de medición se incuban a 35°C en la oscuridad bajo agitación (aprox. 130 rpm). Para tener en cuenta la formación propia de gas del lodo de pudrición también se inicia un ensayo sin resto de hidrolizado (Ensayo 19 en la Tabla 4).

La base de la evaluación la forma la ley de gases perfectos:

$$p \cdot V = n \cdot R \cdot T$$

Con ello, con la presión P [Pa], la temperatura T [K], la constante de universal de gases R [J/mol·K] y el volumen de gas V [m³] del frasco, se puede calcular la cantidad formada n [mol] de gas.

5

Los resultados de las cantidades de gas formadas están recopilados en la Tabla 4:

Frasco N°	19	21	22	23	24
Muestra	Referencia	0,4 g hidrol.	0,4 g hidrol.	0,8 g hidrol.	0,8 g hidrol.
Volumen de gas de los frascos [ml]	705	707	708	707	706
Cantidad de gas, comienzo del ensayo [mol]	0,0292	0,0293	0,0293	0,0292	0,0292
Cantidad total de gas [mol]	0,0360	0,0375	0,0372	0,0393	0,0394
Cantidad de gas recién formado [mol]	0,0068	0,0083	0,0079	0,0101	0,0102
Cantidad de gas de resto de hidrolizado [mol]	-	0,0015	0,0010	0,0033	0,0034
Porción de CH ₄ en la cantidad de gas del hidrol. [%]	-	41	68	62	58
Porción de CO ₂ en la cantidad de gas del hidrol. [%]	-	4	15	31	27
Suma de CO ₂ y CH ₄ [%]	-	45	84	93	84

La proporción de metano y dióxido de carbono en la cantidad de gas formada en el resto de hidrolizado se encuentra en los Ensayos N° 22, N° 23 y N° 24 entre 84% y 93%.

10

4.6 Formación de biogás de la co-fermentación de resto de hidrolizado y biomasa de la fermentación de (producto diana)

Los ensayos se llevan a cabo análogamente a 4.5. La sustancia seca que resulta en conjunto está formada en un 39% por el residuo de fermentación y en un 61% por el residuo de hidrolizado.

15

La Tabla muestra las proporciones de metano y dióxido de carbono medidas en porcentaje en volumen, así como las cantidades absolutas, descontando la formación de gas propia de la muestra de referencia. El contenido en sulfuro de hidrógeno no se determinó, dado que tanto en el caso de la fermentación del resto de hidrolizado como también del residuo de fermentación se rebasó por abajo el umbral de medición por cromatografía de gases de 0,05% en vol.

20

Tabla 5: Cantidades de metano y dióxido de carbono de la co-fermentación

Frasco N°	20	21	24
Muestra	Referencia	0,4 g hidrol. y residuo	0,8 g hidrol. y residuo
Presión absoluta término del ensayo [hPa]	1129	1194	1241
Cantidad de gas [mol]	0,0311	0,0330	0,0342
Contenido en CH ₄ [% en vol.]	1	3,7	6
Contenido en CO ₂ [% en vol.]	0,9	1,8	2,5
Contenido en CH ₄ [mol]	0,00031	0,00122	0,00205
Contenido en CO ₂ [mol]	0,00028	0,00059	0,00086
Cantidad de CH ₄ restando Referencia [mol]	-	0,00091	0,00174
Cantidad de CO ₂ restando Referencia [mol]	-	0,00031	0,00058

4.7 Comparación de mono- y co-fermentación

5 Una comparación de las cantidades absolutas de metano de 355 NI/kg oTS (litros normales / kg oTS (sustancia seca orgánica empleada)) en el caso de la adición proporcional de las cantidades de gas de los ensayos de mono-fermentación y 430 NI/kg de oTS en el ensayo de co-fermentación demuestran que mediante la co-fermentación se pueden alcanzar cantidades de metano referidas a masa claramente superiores. Con ello, se ha de preferir la co-fermentación frente a la mono-fermentación.

4.8 Grado de degradación del hidrolizado

10 El grado de degradación indica qué porcentaje de la sustancia seca orgánica es degradado dentro del tiempo de permanencia indicado.

Para este cálculo se calculan en peso las cantidades en mol de metano y dióxido de carbono determinadas y se relacionan a la cantidad de sustrato empleada.

La Tabla 6 muestra el grado de degradación calculado del resto de hidrolizado.

Tabla 6: Grado de degradación del resto de hidrolizado

15

Frasco N°	23	24
Muestra	0,8 g hidrolizado	0,8 g hidrolizado
Cantidad de CH ₄ [mol]	0,00205	0,00193
Cantidad de CO ₂ [mol]	0,00101	0,00089
Peso de CH ₄ [g]	0,0328	0,0310
Peso de CO ₂ [g]	0,0443	0,0394
Peso total del gas [g]	0,0771	0,0704
Cantidad de oTS del resto de hidrolizado [g]	0,139	0,139
Grado de degradación [%]	56	51

Para las dos muestras indica una buena coincidencia y asciende, por término medio, a 54%. Con ello, se reduce la cantidad a eliminar de resto de hidrolizado (sustancia seca orgánica) en un 54% mediante acoplamiento de la producción de biogás en la etapa de hidrólisis.

4.9 Acoplamiento de hidrólisis, fermentación y generación de biogás

20 El ejemplo se basa en una instalación de hidrólisis con una capacidad de 100.000 t/a de equivalente de glucosa.

25 La instalación está acoplada con una instalación de fermentación para la preparación de L-lisina. La disolución de glucosa producida se concentra a la concentración necesaria para la fermentación y se esteriliza. Estos procesos son energéticamente muy intensos. La demanda de energía de una instalación de este tipo asciende a aprox. 625 GWh/a. A partir de la generación de biogás (co-fermentación) se producen aprox. 47,6 GWh/a de energía y aprox. 52,3 GWh/a de calor. Para el presente ejemplo se cubren, por consiguiente, aproximadamente 1/6 de la demanda total de energía de la hidrólisis, a la que está acoplada la fermentación para la preparación del producto diana, mediante la generación de biogás de acuerdo con la prescripción de acuerdo con la invención.

30

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el aprovechamiento integrado de los contenidos energéticos y materiales de disoluciones y sólidos que resultan en la hidrólisis enzimática de materias primas renovables con contenido en almidón, que comprende:

- 5 a) la preparación, mediante hidrólisis enzimática, de una mezcla de hidrólisis acuosa que contiene al menos una fuente de carbono aprovechable por el microorganismo empleado para la preparación de un aminoácido proteinogénico, a base de materias primas renovables,
- b) el uso de esta mezcla acuosa como fuente de carbono en la preparación de aminoácidos proteinogénicos mediante fermentación, en donde
- 10 c) antes de la etapa b) se separan los componentes sólidos de la mezcla de hidrólisis que resulta en la etapa a), y
- d) los componentes sólidos de la mezcla de hidrólisis que resulta en la etapa a) y la biomasa que resulta en la fermentación en la etapa b) se someten a una co-fermentación anaerobia para la preparación de biogás,

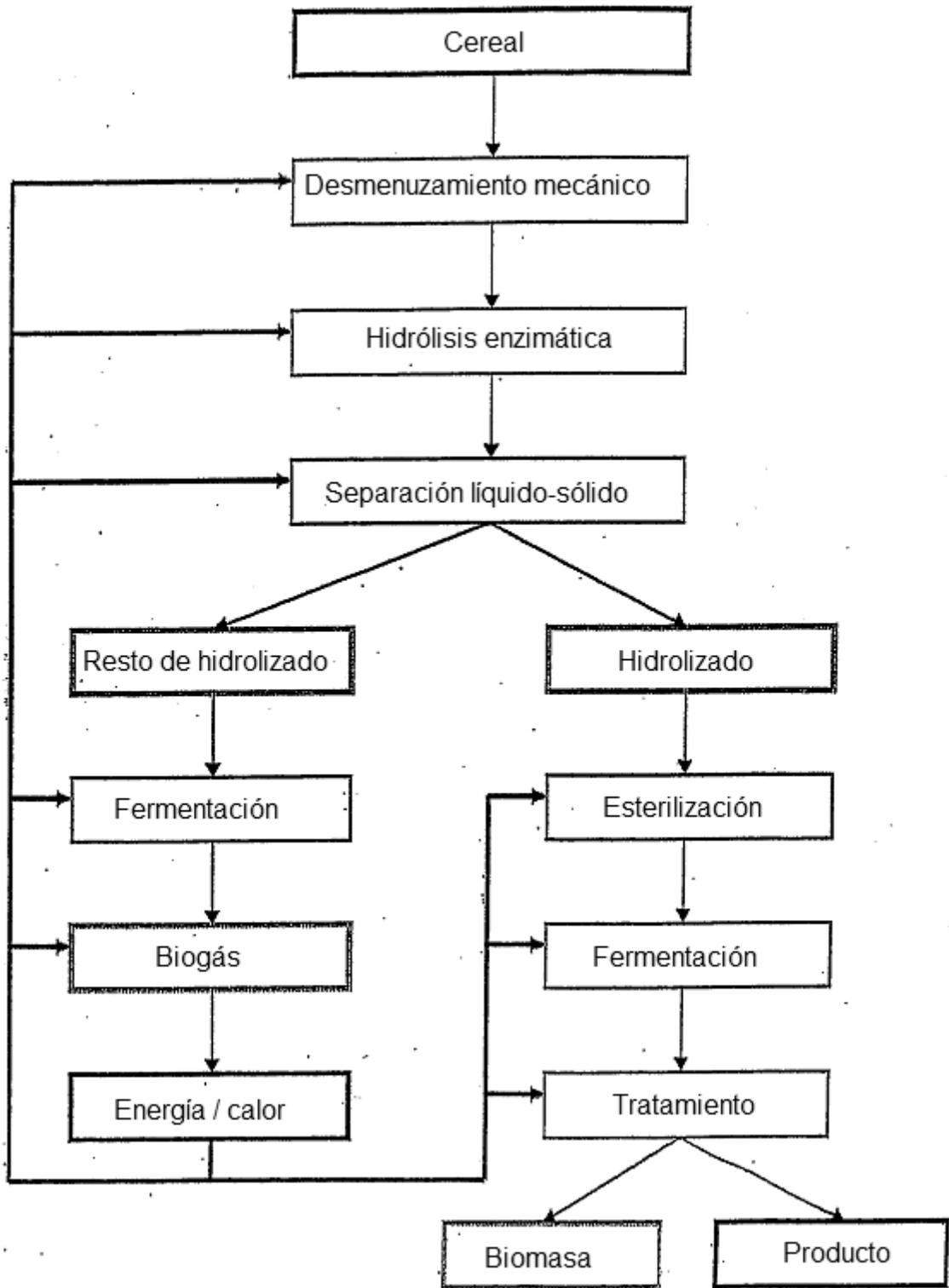
15 en donde el biogás resultante se recoge, se calcina y se transforma en energía calorífica y/o eléctrica y se emplea en una o varias etapas del procedimiento del proceso.

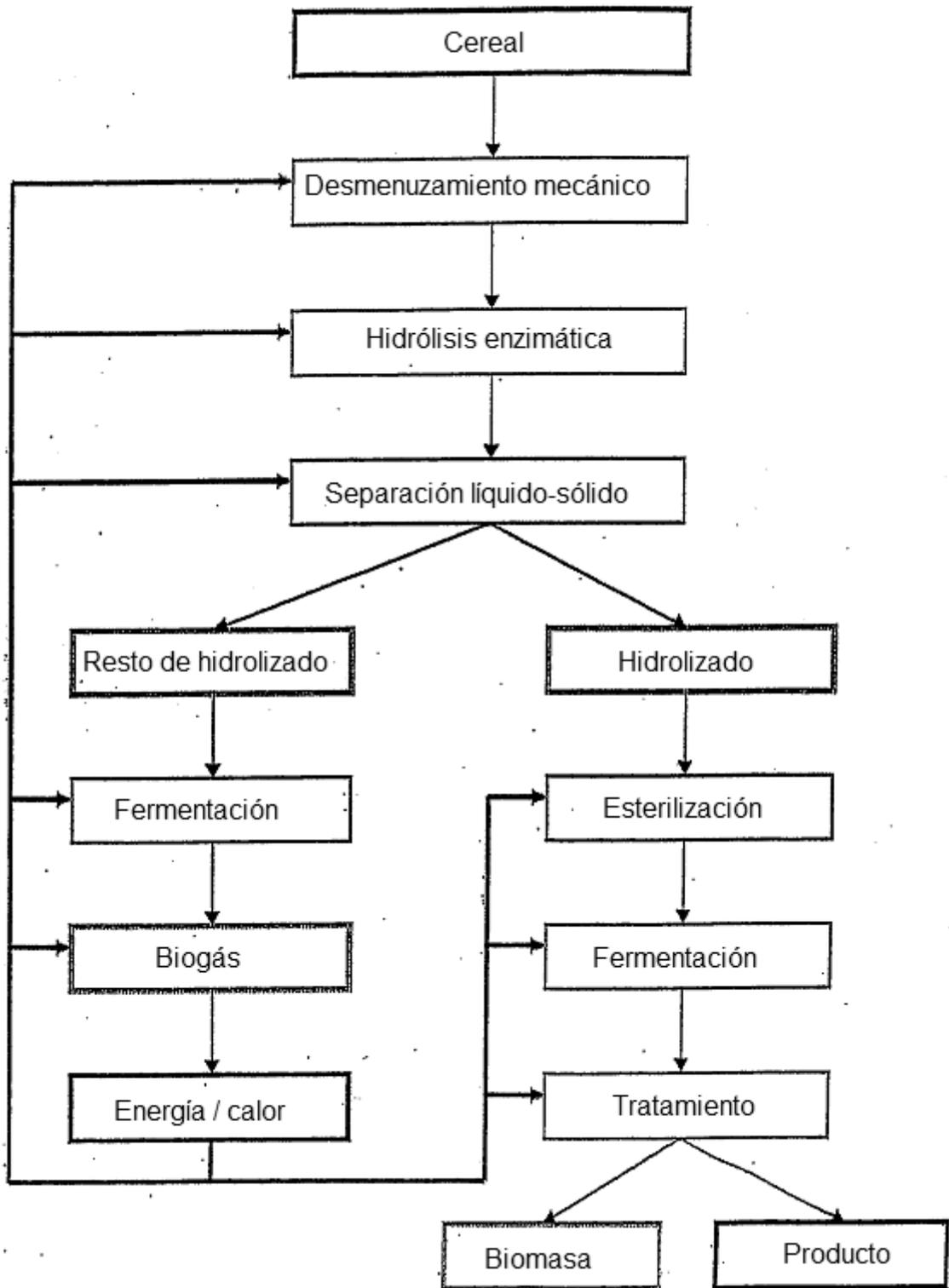
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que como fuente de carbono se utilizan granos de cereales.

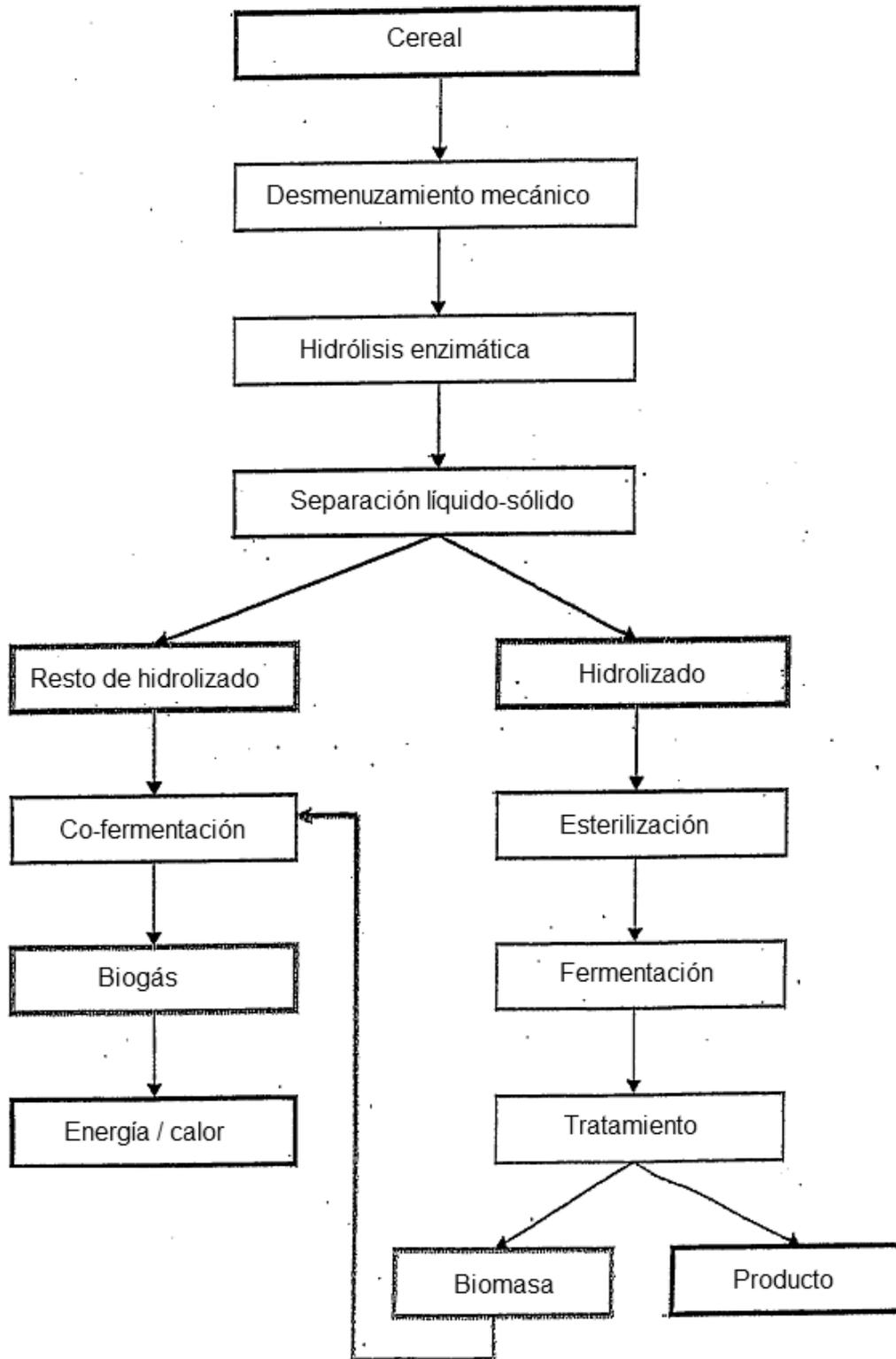
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el cereal se elige del grupo de maíz, centeno, trigo y avena.

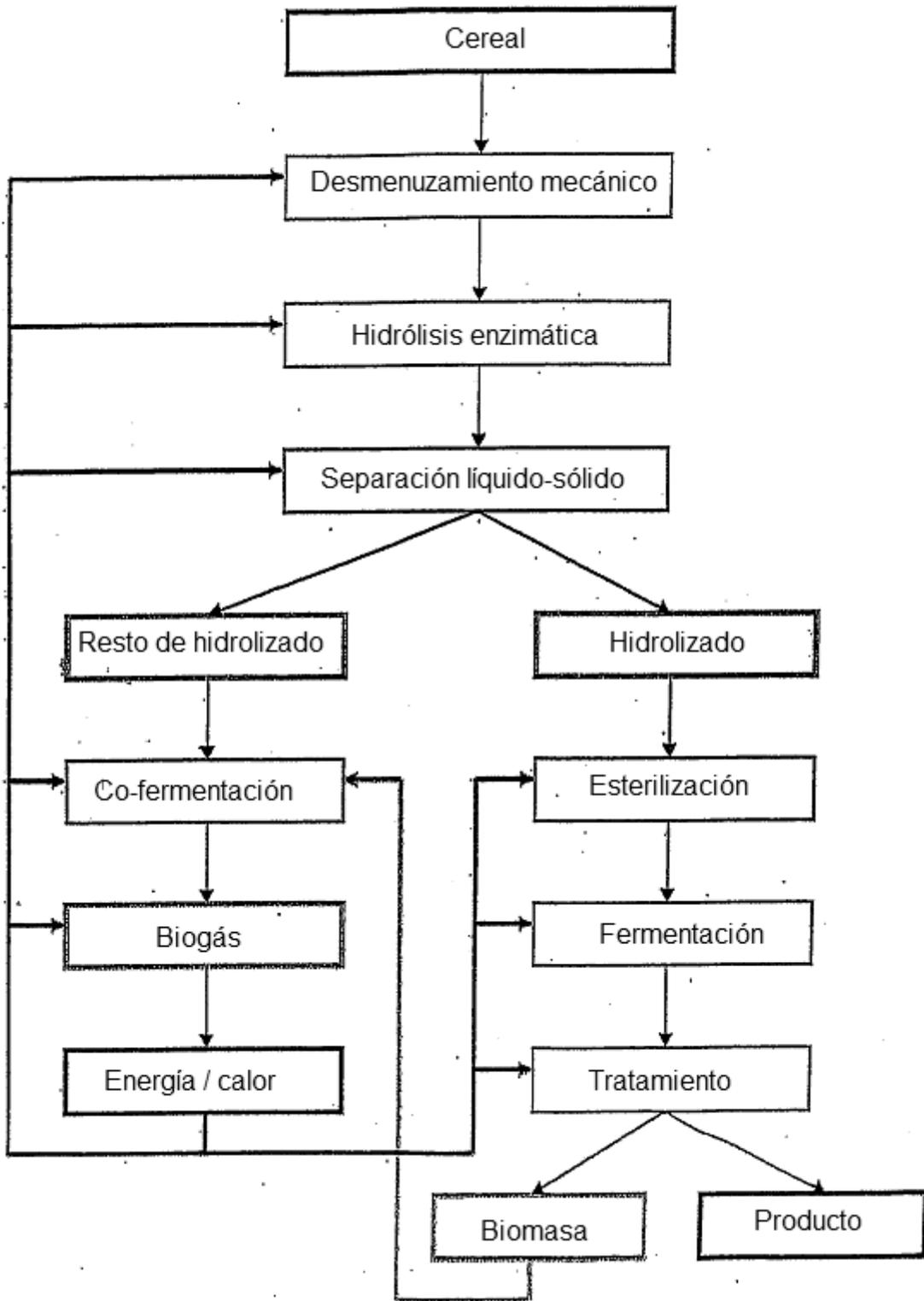
20 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los microorganismos se eligen de los géneros *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Ashbya*, *Escherichia*, *Aspergillus*, *Alcaligenes*, *Actinobacillus*, *Anaerobiospirillum*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* y *Clostridium*.

25 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que los microorganismos se eligen de las cepas de *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypii*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* o *Alcaligenes latus*, *Anaerobiospirillum succiniproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Lactobacillus delbrückii*, *Lactobacillus leichmanni*, *Propionibacterium arabinosum*, *Propionibacterium schermanii*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Clostridium propionicum* y *Clostridium acetobutylicum*.









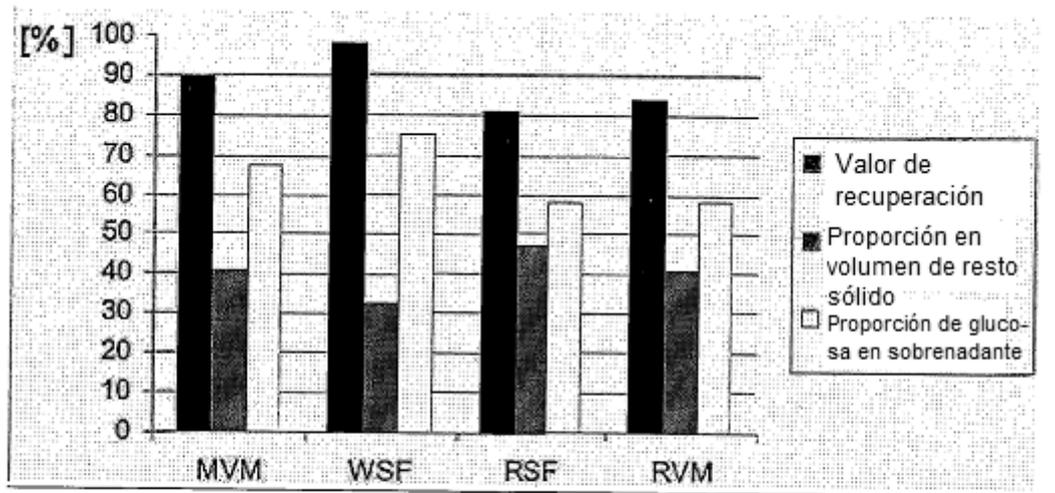


Figura 5:

Unidad del balance másico, resto sólido, proporción de glucosa en la hidrólisis

Figura 6:

Formación de gas a partir del resto de hidrolizado

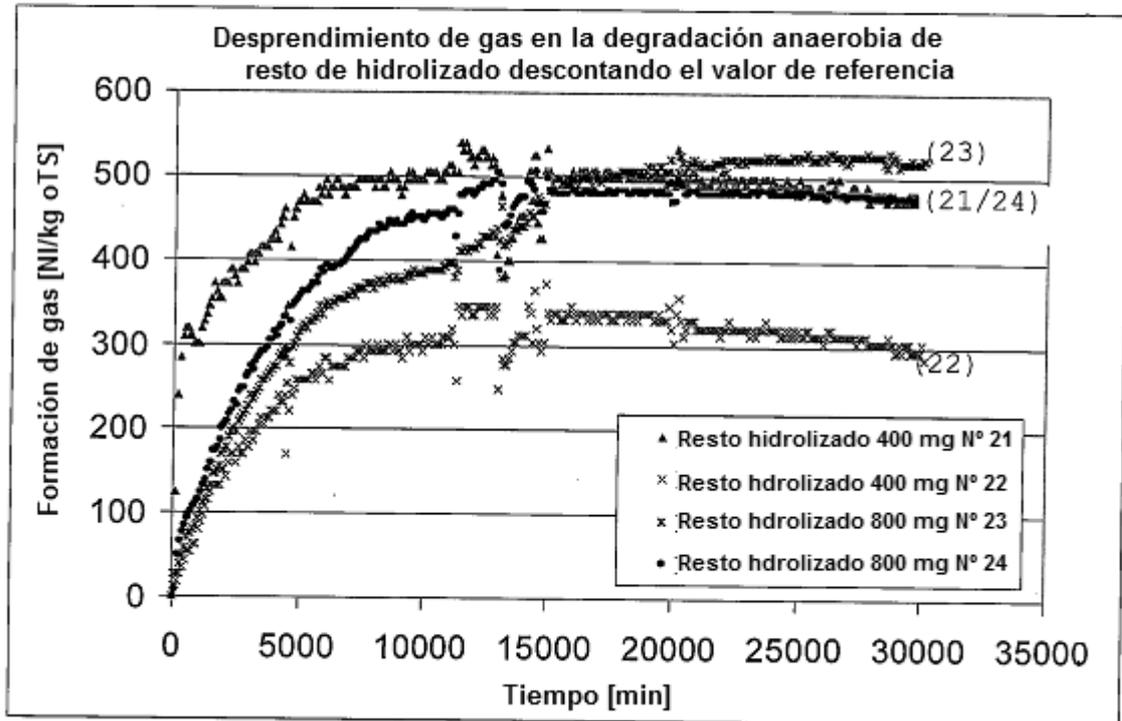


Figura 7:

Aumento de la presión en la co-fermentación

