(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 713 749**

(51) Int. CI.:

C12P 7/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2016 E 16425017 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 3208341**

(54) Título: **Proceso para propagar una levadura capaz de fermentar glucosa y xilosa**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.05.2019

(73) Titular/es:

VERSALIS S.P.A. (100.0%)
Piazza Boldrini, 1
20097 San Donato Milanese (MI), IT

(72) Inventor/es:

SABBATINI, FABIO

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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 propagar una levadura capaz de fermentar glucosa y xilosa

Antecedentes

La fermentación de azúcares monoméricos a alcohol por medio de levaduras es muy conocida desde hace miles de años. A saber, la cerveza se ha producido por casi todas las culturas y poblaciones en la historia de la humanidad. En el campo de los biocombustibles, las materias primas de primera generación que tienen un alto contenido en almidón, tal como el maíz, se han utilizado con éxito a escala industrial para producir etanol. Los procesos fermentativos de tecnología de primera generación aprovechan la facilidad para hidrolizar la materia prima para producir una mezcla hidrolizada que tiene una muy alta concentración de azúcares monoméricos de C6, predominantemente glucosa, y muy pocos o ningún inhibidor de levadura, tal como el ácido acético, Además, azúcares derivados de hemicelulosa, tales como xilosa, no están presentes en la materia prima de primera generación.

El uso de un hidrolizado de materia prima lignocelulósica presenta una serie de problemas exigentes, la mayoría de los cuales surgen al realizar el proceso a escala industrial. La mayoría de los problemas están relacionados con hacer que el proceso sea económicamente factible; otros están relacionados con las características específicas del hidrolizado de materia prima lignocelulósica que hace que el uso de un hidrolizado de materia prima lignocelulósica sea más difícil que en el caso de un hidrolizado de primera generación.

Un primer inconveniente en la fermentación de un hidrolizado de materia prima lignocelulósica es la presencia de azúcares monoméricos de C5, principalmente xilosa. Se sabe que la xilosa es difícil o imposible de convertir mediante enzimas naturales y levaduras, y las mezclas de enzimas y levaduras modificadas genéticamente especiales se han diseñado para convertir la porción hemicelulósica. Incluso con las levaduras modificadas genéticamente para poder fermentar tanto la glucosa como la xilosa, la conversión de la xilosa es lenta.

Un segundo inconveniente en la fermentación de un hidrolizado de materia prima lignocelulósica es la baja concentración de azúcar de un hidrolizado de materia prima lignocelulósica, que suele ser inferior a 100 g de azúcar total por Kg de hidrolizado sobre una base húmeda. A baja concentración de azúcar, la velocidad de absorción de azúcar por la levadura es lenta y, por lo tanto, se facilita la propagación de contaminantes biológicos, tales como las bacterias, que consumen una parte relevante de los azúcares disponibles para producir productos biológicos no deseados, tales como los ácidos lácticos. El problema se ve reforzado por la lenta velocidad de conversión de xilosa por la levadura. De este modo, a menudo se practica la esterilización del hidrolizado de materia prima lignocelulósica por medio de agentes químicos o bioquímicos, como los antibióticos, o por medio de agentes físicos, como el calor o la luz, lo que aumenta el costo total.

Un tercer inconveniente en la fermentación de un hidrolizado de materia prima lignocelulósica es la presencia de compuestos inhibidores en el hidrolizado. Los compuestos tales como el ácido acético, ácido fórmico, furfural, que se producen típicamente en el pretratamiento o hidrolización de la materia prima lignocelulósica, reducen la capacidad de la levadura para absorber los azúcares, o al menos la velocidad de absorción. La eliminación de compuestos inhibidores en varias etapas anteriores a la conversión de la levadura se practica a menudo aumentando nuevamente los costes totales.

Un problema importante en un proceso de fermentación de un hidrolizado de materia prima lignocelulósica es reducir la cantidad de levadura totalmente necesaria, lo que tiene un gran impacto en el coste del producto final. Para resolver el problema, generalmente se practica una etapa de propagación, en la que la levadura se inserta en un medio de propagación en condiciones que promueven el crecimiento de la levadura, permitiendo, por lo tanto, producir más células de levadura para ser utilizadas en un proceso de fermentación posterior. La propagación se puede realizar en modo discontinuo, alimentado por lotes y continuo. Si bien la propagación de una levadura en un medio de propagación que comprende azúcares sintéticos, tanto la xilosa como la glucosa, ha demostrado ser eficaz a escala de laboratorio, se han propuesto diferentes enfoques para propagar la levadura en un hidrolizado de materia prima lignocelulósica para reducir los costes del medio de propagación.

Típicamente, todo el proceso para convertir un hidrolizado de materia prima lignocelulósica en un producto de fermentación se separa en una o más etapas de propagación, seguido por una o más etapas de fermentación. Las etapas de propagación y fermentación están especializadas para producir un producto específico. La etapa de propagación se lleva a cabo para dedicar la cantidad máxima permitida de carbono en el medio de propagación para producir células de levadura, minimizando la cantidad de carbono convertido a otros productos, tales como etanol, que se consideran subproductos en la etapa de propagación. La etapa de fermentación se realiza en cambio para maximizar la cantidad de carbono en el medio de fermentación para producir etanol, que es el producto final de la fermentación, por medio de la levadura propagada en la etapa de propagación. La etapa de propagación se lleva a cabo en condiciones aeróbicas, por lo tanto, el aire a un alto flujo debe insertarse en el hidrolizado de materia prima lignocelulósica y el hidrolizado de materia prima lignocelulósica debe agitarse a alta intensidad para promover el contacto de la levadura con el aire. El hidrolizado de materia prima lignocelulósica se produce a menudo en forma de suspensión, por lo tanto es difícil y caro de agitar. La suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica se puede separar en un componente líquido que comprende agua y glucosa y xilosa solubles en agua, y un

componente sólido que comprende materia prima lignocelulósica pretratada insoluble en agua, que aumenta de nuevo los costes del proceso.

El documento de Patente WO2009155633A1 describe el uso de un sustrato que comprende material que contiene un compuesto de C5, en el crecimiento de la levadura *Saccharomyces* o la producción de un producto de levadura *Saccharomyces*, en el que el material que contiene el compuesto de C5 es: (a) un material que contiene el compuesto de C5 obtenido a partir del hidrolizado lignocelulósico; (b) un material que contiene el compuesto de C5 obtenido a partir de la fermentación del hidrolizado lignocelulósico; o (c) una mezcla de (a) y (b). La solicitud de Patente también describe un método para producir biomasa de levadura *Saccharomyces* o un producto de levadura *Saccharomyces* utilizando el sustrato, el método que comprende incubar un sustrato que comprende un material que contiene el compuesto de C5 con una levadura *Saccharomyces* en condiciones que causen el crecimiento de la levadura *Saccharomyces* o la producción del producto. Por lo tanto, la solicitud de Patente no dice nada sobre los problemas específicos y las soluciones relacionadas implicadas en la propagación de la levadura en un hidrolizado lignocelulósico.

El documento de Patente WO2014072232A1 describe un proceso para la propagación aeróbica de levaduras en la que la levadura se cultiva en un reactor, que comprende las etapas de: a) llenar el reactor con una fuente de carbono y una población de levadura inicial, b) opcionalmente hacer crecer la población de levadura inicial en el reactor en el modo de lotes, c) medir el pH en el reactor, d) añadir el hidrolizado lignocelulósico al reactor en modo de alimentación por lotes a una velocidad para establecer el pH en el reactor en un valor predeterminado, y e) después de una propagación suficiente, aislar la levadura del reactor. La fuente de carbono de la etapa a) puede ser hidrolizado lignocelulósico diluido, en donde la dilución del hidrolizado lignocelulósico se proporciona para reducir los efectos de los compuestos inhibidores del hidrolizado lignocelulósico. Controlar un crecimiento en modo de alimentación por lotes es difícil a escala industrial y aumenta los costes, así como mantener las condiciones aeróbicas en un proceso de propagación en un hidrolizado lignocelulósico, que requiere una fuerte agitación y un alto flujo de aire. Además, la solicitud de Patente no reconoce la presencia de contaminantes biológicos como críticos en la etapa de propagación. Es decir, se afirma que la contaminación por bacterias o levaduras nativas rara vez es un problema durante la propagación porque los tanques de propagación de levaduras son más pequeños y se pueden limpiar más fácilmente que los tanques de fermentación. Además de la limpieza, se pueden agregar productos antibacterianos para prevenir el crecimiento de microbios no deseados.

El documento de Patente US8450094 describe un método para propagar una levadura en un medio para la propagación, en el que se suministra xilosa al medio como una fuente de carbono para el crecimiento de la masa celular. Una primera masa celular se propaga bajo condiciones aeróbicas con un flujo de aire de al menos 1,0 volúmenes de aire por volumen de medio por minuto en una segunda masa celular, que se propaga opcionalmente en una etapa posterior en una tercera masa celular. El método secuencial descrito en la patente para producir una cantidad razonable de levadura necesita largos tiempos de propagación en condiciones favorables a los contaminantes biológicos, requiriendo por lo tanto la esterilización de la fuente de carbono.

Elìa Tomás-Pejó y Lisbeth Olsson “Influence of propagation strategy for obtaining robust *Saccharomyces cerevisiae* cells that efficiently co-ferment xylose and glucosa in lignocellulosic biomass hydrolysates” Microbial Biotechnology vol. 8 2015 pages 999-1005 describe que la adición del hidrolizado lignocelulósico durante la propagación de las células las adaptó a los inhibidores, dando como resultado células más tolerantes con fases de retardo más cortas y valores de crecimiento específico más altos en un medio mínimo que contiene ácido acético y vainillina que las células no adaptadas.

Por lo tanto, existe la necesidad de un proceso industrial para producir un producto de fermentación a partir de un hidrolizado de materia prima lignocelulósica en una forma de suspensión, en el que al mismo tiempo se produce la mayoría de la levadura necesaria. Se cree que el proceso descrito supera los inconvenientes mencionados anteriormente al utilizar una suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica, que proporciona una solución rentable para producir un producto de fermentación a partir de un hidrolizado de materia prima lignocelulósica a escala industrial.

Compendio

Esta especificación describe un proceso para producir un producto de fermentación a partir de una suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica que comprende agua, glucosa soluble en agua y xilosa soluble en agua y materia prima lignocelulósica pretratada insoluble en agua, comprendiendo dicho proceso las etapas de: crear un primer medio de conversión que comprende una primera porción de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica y una levadura capaz de convertir glucosa y xilosa a una levadura de propagación y un producto de fermentación; permitir que la levadura convierta al menos el 50 % de la glucosa soluble en agua y menos del 20 % de la xilosa soluble en agua del primer medio de conversión a una primera levadura propagada y una primera porción del producto de fermentación en una primera etapa de conversión que tenga una primera proporción de conversión de azúcar a células en un intervalo de 5 % a 25 %, en el que la primera proporción de conversión de azúcar a células es una proporción de porcentaje en peso de la glucosa y xilosa convertida a la levadura propagada en la primera etapa de conversión a la glucosa y xilosa solubles en agua totalmente convertidas en el primer medio de conversión, sobre una base de carbono; crear un segundo medio de conversión que comprende al menos una porción de la primera levadura propagada y una segunda porción de la suspensión de hidrolizado de materia prima

lignocelulósica; permitir que la levadura convierta al menos una porción de la glucosa y xilosa solubles en agua en el segundo medio de conversión a al menos una segunda levadura propagada y una segunda porción del producto de fermentación en una segunda etapa de conversión que tiene una proporción de la segunda conversión de azúcar a células que es menor que la proporción de la primera conversión de azúcar a células, en donde la proporción de la segunda conversión de azúcar a células es una proporción de porcentaje en peso de la glucosa y xilosa solubles en agua convertidas a la levadura propagada en la segunda etapa de conversión a la glucosa y xilosa solubles en agua totalmente convertidas en el segundo medio de conversión, sobre una base de carbono.

También se describe que la primera etapa de conversión puede comprender al menos una primera fase que es una fase aeróbica y una segunda fase que es una fase anaeróbica, en donde la fase aeróbica se lleva a cabo durante un tiempo en un intervalo de 3 horas a 12 horas.

Además se describe que la primera etapa de conversión se puede llevar a cabo durante un primer tiempo de conversión que es menor que el valor seleccionado del grupo que consiste en 30 horas, 20 horas, 15 horas, y 10 horas.

También se describe que la primera etapa de conversión se puede llevar a cabo insertando aire a un caudal que está en el intervalo seleccionado del grupo que consiste en 0,1 vvh a 10 vvh, de 0,1 vvh a 5 vvh, y de 0,5 vvh a 3 vvh.

Además se describe que la primera etapa de conversión se puede llevar a cabo mezclando el primer medio de conversión a una densidad de potencia de peso de menos de 100W/ton del primer medio de conversión sobre una base húmeda.

También se describe que la proporción de la primera conversión de azúcar en células puede estar en un intervalo seleccionado del grupo que consiste en del 5 % al 20 %, y del 10 % al 20 %.

Además se describe que la segunda etapa de conversión se puede llevar a cabo en condiciones anaeróbicas durante al menos el 80 % del segundo tiempo de conversión.

También se describe que la segunda etapa de conversión se puede llevar a cabo durante un segundo tiempo de conversión que es mayor que el primer tiempo de conversión y menor que un valor seleccionado del grupo que consiste en 72 horas, 60 horas, y 50 horas.

Además se describe que al menos el 80 % de la glucosa soluble en agua y la xilosa soluble en agua se pueden convertir en la segunda etapa de conversión.

También se describe que la proporción de la segunda conversión de azúcar en células puede ser mayor del 2 %.

Además se describe que la materia seca del primer y segundo medio de conversión puede ser menor del 30 % y mayor que un valor porcentual seleccionado del grupo que consiste en 5 %, 10 %, 15 % y 20 %.

También se describe que el primer medio de conversión y el segundo medio de conversión puede comprender además una fuente de nitrógeno.

Además se describe que no se pueden añadir vitaminas y/o oligoelementos al proceso.

También se describe que la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica no puede ser sometida a ninguna esterilización.

Además se describe que la primera etapa de conversión puede tener una densidad de levadura inicial entre 1×10^6 y 1×10^8 células de levadura por miligramo del primer medio de conversión sobre una base húmeda.

También se describe que la primera etapa de conversión puede tener una densidad de levadura final que está entre 1×10^7 y 1×10^9 células de levadura por miligramo del primer medio de conversión sobre una base húmeda.

Además se describe que la segunda etapa de conversión puede tener una densidad de levadura inicial que es mayor que la densidad de levadura inicial en la primera etapa de conversión.

También se describe que la primera etapa de conversión y la segunda etapa de conversión se pueden llevar a cabo en recipientes separados.

Además se describe que el producto de fermentación puede ser etanol.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es la curva de saturación de oxígeno en la primera etapa de conversión de dos ensayos experimentales a escala de laboratorio.

La Figura 2 es la curva de saturación de oxígeno en la segunda etapa de conversión de dos ensayos experimentales a escala de laboratorio.

Descripción detallada

Esta memoria descriptiva describe un proceso que comprende al menos dos etapas de conversión secuenciales de una suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica a un producto de fermentación por medio de una levadura, en donde al mismo tiempo en cada etapa una porción de la cantidad total de glucosa y xilosa solubles en agua del hidrolizado de materia prima lignocelulósica se convierten a células de levadura utilizadas en el proceso descrito. Las células de levadura producidas en la primera etapa de conversión se denominan una primera levadura propagada y luego se utilizan en la segunda etapa de conversión. En cada etapa, el producto de fermentación es, por lo tanto, el principal producto de conversión, pero la primera etapa de conversión se lleva a cabo en condiciones más favorables para la propagación de la levadura que en la segunda etapa de conversión. De este modo, en la primera etapa de conversión el porcentaje de la cantidad total de glucosa soluble en agua y xilosa soluble en agua convertidas a levadura es mayor que el porcentaje de la cantidad total de glucosa soluble en agua y xilosa soluble en agua convertidas a levadura en la segunda etapa de conversión. En cada etapa de conversión, existe una proporción de conversión de azúcar a células. La proporción de conversión de azúcar a células es la proporción de porcentaje en peso de la cantidad de glucosa soluble en agua y xilosa soluble en agua convertidas a levadura a la cantidad de glucosa soluble en agua y xilosa soluble en agua que se convierten totalmente en esa etapa sobre una base de carbono y expresada como un porcentaje, y no a la cantidad de glucosa y xilosa solubles en agua totalmente disponibles en la etapa. Para mayor claridad, la proporción de conversión de azúcar a células de la cantidad de glucosa y xilosa solubles en agua totalmente convertidas en la primera etapa de conversión puede ser menor que en la segunda etapa de conversión. Esto puede ocurrir, por ejemplo, en el caso de que la primera etapa de conversión se lleve a cabo para un primer tiempo de conversión que es más corto que el tiempo de conversión de la segunda etapa de conversión. Pero, en relación a la respectiva fracción convertida de glucosa y xilosa solubles en agua , la propagación de levadura en la primera etapa de conversión es más favorable que en la segunda etapa de conversión. La glucosa y xilosa solubles en agua que no se convierten en la primera etapa de conversión no se desperdician, ya que se introducen y se convierten preferiblemente en la segunda etapa de conversión.

Según un aspecto, el proceso descrito proporciona una solución que puede implementarse a escala industrial, superando los problemas que ocurren en una planta de conversión real.

Según otro aspecto, el proceso descrito permite producir la levadura necesaria la levadura necesaria para producir el producto de fermentación a partir de una pequeña cantidad de levadura reduciendo, de este modo, sensiblemente los costes de fermentación.

Según un aspecto adicional, en el proceso descrito la propagación de la levadura se produce sobre una suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica disponible ya en la planta de conversión, evitando así o reduciendo en gran medida los costes asociados con las costosas fuentes de carbono.

Según un aspecto adicional, el proceso descrito permite el uso de una suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica que puede contener contaminantes biológicos en un nivel no despreciable, sin el uso de ningún agente o procedimiento de esterilización.

Según un aspecto adicional, el proceso descrito se puede llevar a cabo sin el uso de vitaminas u otros nutrientes costosos.

En el contexto de la presente descripción, la expresión “convertir un azúcar soluble en agua” se utiliza para indicar un proceso para producir un producto general a partir de azúcar soluble en agua; el producto general comprende un producto de propagación, que es una nueva biomasa de levadura, y un producto de fermentación, tal como etanol.

Por “propagación de una levadura”, o “crecimiento de levadura”, o “producción de una levadura”, “conversión a una levadura”, y “conversión a una levadura propagada” se entiende el proceso para aumentar la cantidad de levadura, o de biomasa de levadura, obtenida alimentando una cantidad de levadura inicial con una fuente de carbono y opcionalmente otros nutrientes en las condiciones adecuadas. El aumento de la cantidad de biomasa de levadura o de levadura se produce al aumentar el número de células de levadura totalmente producidas, y puede verificarse determinando la densidad de las células al comienzo y al final de la etapa(s) de propagación o etapa(s) de conversión, o durante la etapa o etapas de propagación o conversión. La densidad celular se puede determinar contando las células de levadura presentes en muestras representativas del medio de conversión a diferentes tiempos de la etapa o etapas de propagación.

La levadura del proceso descrito es capaz de fermentar no solo glucosa, sino también xilosa. Como una levadura natural no es capaz normalmente de captar xilosa, la levadura utilizada en el proceso descrito es preferiblemente una levadura no natural o derivada de una levadura no natural.

El término levadura “no natural” significa que el organismo microbiano tiene al menos una alteración genética que no se encuentra normalmente en una cepa natural de las especies referenciadas, incluyendo cepas naturales de las especies referenciadas, para producir la levadura natural capaz de fermentar tanto glucosa como xilosa. Las alteraciones genéticas pueden incluir, por ejemplo, modificaciones que introducen ácidos nucleicos expresables que codifican polipéptidos metabólicos, otras adiciones de ácidos nucleicos, deleciones de ácidos nucleicos y/o otras alteraciones funcionales del material genético de levadura. Dichas modificaciones pueden incluir, por ejemplo, regiones codificantes

y fragmentos funcionales de las mismas, para polipéptidos heterólogos, homólogos o tanto heterólogos como homólogos para las especies referenciadas. Modificaciones adicionales pueden incluir, por ejemplo, regiones reguladoras no codificantes en las que las modificaciones alteran la expresión de un gen o un operón.

La levadura no natural de la presente descripción puede contener alteraciones genéticas estables, que se refiere a la levadura que puede propagarse durante más de cinco generaciones sin pérdida de la alteración. En general, las alteraciones genéticas estables incluyen modificaciones que persisten por más de 10 generaciones, las modificaciones particularmente estables persistirán por más de 25 generaciones y, más particularmente, las modificaciones genéticas estables estarán más de 50 generaciones, incluyendo indefinidamente.

La levadura de la presente descripción se puede seleccionar de cualquier género y especie de levadura conocidos. Las levaduras se describen, por ejemplo, por N. J. W. Kreger-van Rij, "The Yeast," Vol. 1 de Biology of Yeasts, Ch. 2, A. H. Rose y J. S. Harrison, Eds. Academic Press, London, 1987. En una realización la levadura se selecciona del grupo que consiste en *Saccharomyces, Zygosaccharomyces, Candida, Hansenula, Kluyveromyces, Debaromyces, Nadsonia, Lipomyces, Torulopsis, Kloeckera, Pichia, Schizosaccharomyces, Trigonopsis, Brettanomyces, Cryptococcus, Trichosporon, Aureobasidium, Lipomyces, Phaffia, Rhodotorula, Yarrowia,* y *Schwanniomyces.* Preferiblemente la levadura se selecciona de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

En el proceso descrito, la principal fuente de carbono utilizada es un hidrolizado en una forma de suspensión derivada de la materia prima lignocelulósica. Una descripción detallada de una materia prima lignocelulósica se puede encontrar en el documento de Patente WO2015028156A1, pag. 11-14. Una materia prima lignocelulósica preferida se selecciona del grupo de residuos agrícolas, en particular pajas tales como paja de trigo, paja de arroz, o bagazo, tal como bagazo de caña de azúcar. Las maderas duras y las maderas blandas también se benefician de este proceso. Opcionalmente, también se pueden utilizar otras fuentes de carbono tales como melaza o azúcares sintéticos, pero los azúcares monoméricos del hidrolizado de materia prima lignocelulósica son preferiblemente al menos el 80 % en peso, más preferiblemente al menos el 90 %, y lo más preferiblemente al menos el 95 % de las fuentes de carbono total utilizadas en el proceso. En una realización aún más preferida, el hidrolizado de materia prima lignocelulósica es la única fuente de carbono utilizada en el proceso descrito para la propagación de la levadura.

La suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica se deriva preferiblemente de la materia prima lignocelulósica por medio de un proceso de múltiples etapas que comprende pretratar la materia prima lignocelulósica para producir una materia prima lignocelulósica pretratada y someter la materia prima lignocelulósica pretratada a una hidrólisis enzimática. El pretratamiento aumenta la accesibilidad de los carbohidratos contenidos en ellos a la acción de las enzimas. Un pretratamiento preferido comprende tratar hidrotérmicamente la materia prima lignocelulósica con agua en fase de vapor en un reactor presurizado, y explotar con vapor la materia prima tratada hidrotérmicamente liberando rápidamente la presión aplicada a la materia prima. El tratamiento hidrotérmico se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura en un intervalo de 130 ºC a 230 ºC durante un tiempo de 1 minuto a 180 minutos. El reactor se presuriza preferiblemente mediante vapor a una presión de al menos 10 bares para obtener una ruptura efectiva de la materia prima.

En una realización, la materia prima lignocelulósica se somete a un proceso o etapa de remojo para eliminar una porción de compuestos no lignocelulósicos contenidos en el material de partida lignocelulósico sin procesar tal como sales inorgánicas, ceras, y ácidos orgánicos antes de tratarse hidrotérmicamente en el reactor presurizado. En la etapa o proceso de remojo, los contaminantes externos, tales como tierra, piedras y los residuos de la cosecha también pueden separarse. El proceso de remojo comprende preferiblemente introducir la materia prima lignocelulósica en un líquido de remojo que comprende agua a una temperatura de 20 ºC a 100 ºC, más preferiblemente de 40 ºC a 70 ºC y para un tiempo de remojo que es de 30 segundos a 30 minutos, más preferiblemente de 3 minutos a 15 minutos.

Opcionalmente, la materia prima lignocelulósica se somete a un tratamiento hidrotérmico preliminar en agua o un líquido que comprende agua para solubilizar una porción de los carbohidratos insolubles en agua contenidos en la materia prima lignocelulósica antes de introducirse en el recipiente del reactor presurizado. El tratamiento hidrotérmico preliminar se lleva a cabo en condiciones de presión en presencia de agua en una fase de vapor o líquida, o una mezcla de las mismas, a una temperatura de 100 ºC a 190 ºC, preferiblemente de 130 ºC a 180 ºC, y lo más preferiblemente de 140 ºC a 170 ºC. El tratamiento hidrotérmico preliminar se lleva a cabo durante un tiempo en un intervalo de 10 minutos a 3 horas, preferiblemente de 15 minutos a 3 horas, y lo más preferiblemente de 20 minutos a 60 minutos. El tratamiento hidrotérmico preliminar solubiliza principalmente el componente hemicelulósico de la materia prima lignocelulósica, que puede someterse a la degradación térmica a una temperatura más alta, y un líquido que comprende agua y polímeros y oligómeros de xilosa solubles en agua y opcionalmente otros azúcares derivados de hemicelulosa se separa así a partir de la materia prima lignocelulósica sólida.

La materia prima lignocelulósica pretratada se somete a hidrólisis enzimática para hidrolizar los azúcares poliméricos y oligoméricos a azúcares monoméricos, que comprenden glucosa y xilosa. La hidrólisis enzimática comprende poner en contacto la materia prima lignocelulósica pretratada en forma de suspensión con una enzima o composición enzimática en condiciones que promueven la actividad enzimática. De este modo, se proporciona una suspensión de la materia prima lignocelulósica pretratada mezclando la materia prima lignocelulósica pretratada con un líquido que comprende agua para tener un contenido de materia seca preferiblemente entre el 10 % y el 25 %;

opcionalmente, cuando se practica el tratamiento hidrotérmico preliminar, también se puede utilizar al menos una porción del líquido que comprende agua y los polímeros y oligómeros de xilosa solubilizados producidos en el mismo. La hidrólisis enzimática se lleva a cabo típicamente a un pH entre 4,5 y 5,0 a una temperatura entre 45 ºC y 55 ºC, y durante un tiempo de hidrólisis de 24 horas a 72 horas, bajo agitación de la mezcla.

La hidrólisis enzimática se puede llevar a cabo en una o más etapas. Preferiblemente, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo en dos etapas en recipientes de hidrólisis separados. En las primeras etapas de hidrólisis, que se realizan durante un tiempo entre 12 horas y 30 horas en un primer recipiente, se obtiene una hidrólisis parcial de la materia prima lignocelulósica pretratada para obtener la licuefacción de la materia prima lignocelulósica pretratada, obteniendo así una mezcla parcialmente hidrolizada que tiene una viscosidad inferior a la suspensión inicial. La mezcla parcialmente hidrolizada se mueve después a un segundo recipiente de hidrólisis, en donde una segunda etapa de hidrólisis se continua durante un tiempo entre 12 horas y 60 horas para obtener la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica, que comprende agua, materia prima lignocelulósica pretratada insoluble en agua residual y glucosa y xilosa solubles en agua que comprende glucosa y xilosa. La suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica puede comprender además otros azúcares monoméricos solubles en agua de C6 y C5, típicamente a concentración menor que la glucosa y xilosa, respectivamente.

Aún más preferiblemente, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo según las enseñanzas del documento de Patente WO2010113130. Una porción de la materia prima lignocelulósica pretratada insoluble en agua residual se puede separar de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica. La separación de la materia prima lignocelulósica pretratada insoluble en agua residual se puede obtener, por ejemplo, por decantación, centrifugación, o prensado del hidrolizado de materia prima lignocelulósica, o una combinación de las mismas. Sin embargo, incluso si la presencia de la materia prima lignocelulósica pretratada insoluble en agua residual en el proceso de propagación descrito puede dar lugar a problemas de mezcla, algunos de los azúcares monoméricos solubles en agua empapados en los sólidos residuales pueden retirarse en la etapa de separación, por lo que en una realización preferida no se practica la eliminación de sólidos.

El proceso o procesos descritos anteriormente para derivar la suspensión del hidrolizado de materia prima lignocelulósica a partir de la materia prima lignocelulósica son realizaciones ejemplares y preferidas para proporcionar la suspensión del hidrolizado de materia prima lignocelulósica utilizada como fuente principal de carbono para producir una producto de fermentación según el proceso descrito, y se entiende que no están destinados a limitar de ninguna manera el alcance de la invención.

La suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica puede tener un contenido de materia seca entre el 5 % y 30 %, preferiblemente entre el 10 % y el 20 %.

La suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica tiene una concentración de glucosa que puede ser de 20 g/Kg a 100 g/Kg de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica sobre una base húmeda, preferiblemente de 30 g/Kg a 70 g/Kg, y lo más preferiblemente de 40 g/Kg a 50 g/Kg.

La suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica tiene una concentración de xilosa que puede ser de 10 g/Kg a 40 g/Kg de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica sobre una base húmeda, preferiblemente de 15 g/Kg a 30 g/Kg, y lo más preferiblemente de 20 g/Kg a 25 g/Kg.

La suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica puede comprender además compuestos inhibidores seleccionados de la lista de ácido acético, ácido fórmico, furfural e hidroximetil furfural (5-HMF), que se forman en las etapas o procesos de pretratamientos e hidrólisis previos, e inhiben el crecimiento de la levadura, causando al menos un retraso en la velocidad de crecimiento.

Particularmente, el ácido acético puede tener una concentración que está en el intervalo de 2 g/Kg a 7 g/Kg de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica sobre una base húmeda.

La suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica puede contener además contaminantes biológicos, como ocurre típicamente en operaciones a escala industrial. Los contaminantes biológicos son organismos microbianos diferentes de las levaduras que deben propagarse según el proceso descrito, y cuya presencia es en general perjudicial para el rendimiento del proceso descrito, consumiendo una porción de los azúcares monoméricos totalmente disponibles para el crecimiento de la levadura deseada. Los contaminantes biológicos pueden comprender bacterias y hongos, así como levaduras diferentes de la levadura que se desea propagar, tal como levaduras de tipo nativo. La bacteria del ácido Láctico, en particular las especies *Lactobacillus*, son los principales contaminantes bacterianos. Las concentraciones de ácido láctico de las mezclas de fermentación se toman generalmente como una medida del grado de contaminación. La contaminación biológica se ha controlado mediante la esterilización del hidrolizado de materia prima lignocelulósica, los medios de conversión y los equipos implicados en el proceso, que pueden obtenerse añadiendo agentes antibacterianos, tales como antibióticos u otros agentes asépticos, o mediante procedimientos de esterilización, tales como la pasteurización, mediante la aplicación de agentes físicos, incluyendo entre otros, calor, luz y radiación, antes, entre o durante el transcurso de las series de fermentación/propagación. Por “esterilización” se considera en la presente memoria la reducción de la densidad de contaminantes biológicos por un factor de al menos 100. El uso de agentes antibacterianos y procedimientos de

esterilización, que introducen costes adicionales, se evita preferiblemente en los procesos descritos, al mismo tiempo que se mantiene el crecimiento de contaminantes biológicos en un nivel bajo razonable.

Preferiblemente, el hidrolizado de materia prima lignocelulósica no se somete a ninguna etapa o procedimiento de esterilización, lo que sería difícil y costoso de practicar a escala industrial.

Preferiblemente, no se utilizan agentes antibacterianos en el proceso descrito, ni se añaden al hidrolizado de materia prima lignocelulósica antes del proceso descrito.

El proceso descrito comprende al menos dos etapas de conversión, que se pueden llevar a cabo en un único recipiente o en dos recipientes separados. Para minimizar los costes, el recipiente o recipientes, preferiblemente, no se someten a ninguna esterilización y/o limpieza entre y/o durante las etapas de conversión. Preferiblemente, cada etapa de conversión se lleva a cabo en modo de lotes, en donde la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica se añade antes de comenzar la etapa de conversión, o al comienzo de la etapa de conversión.

Primero se crea un primer medio de conversión que comprende una primera porción de hidrolizado de materia prima lignocelulósica y una cantidad inicial de levadura. Para limitar el efecto del crecimiento competitivo de los contaminantes biológicos, en una realización preferida la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica se mantiene a una temperatura de 45 ºC a 55 ºC antes de utilizarse en el proceso descrito, y lo más preferiblemente a la temperatura de la hidrólisis enzimática o la etapa de hidrólisis enzimática final. A esta temperatura, la actividad de los contaminantes biológicos se reduce significativamente. La temperatura de la porción de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica utilizada en la primera etapa de conversión se reduce a la temperatura de la primera etapa de conversión, que está preferiblemente en el intervalo de 28 ºC a 35 ºC. Los intercambiadores de calor se pueden utilizar para enfriar la primera porción de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica a la temperatura de la primera etapa de conversión en el primer recipiente de conversión o antes de entrar al primer recipiente de conversión.

El agua o un líquido que comprende agua, y cantidades limitadas opcionales de fuentes de carbono adicionales diferentes de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica se pueden utilizar para alcanzar el contenido de materia seca deseado. Una de las ventajas ofrecidas por el proceso descrito es la posibilidad de ser conducido a una materia seca que es mayor que otros procesos conocidos que utilizan la suspensión de hidrolizado lignocelulósico como la principal fuente de carbono. El contenido de materia seca en peso del primer medio de conversión es preferiblemente menor del 30 %, ya que sería difícil de agitarse, y es preferiblemente mayor del 5 %, más preferiblemente mayor del 10 %, incluso más preferiblemente mayor del 15 %, lo más preferiblemente mayor del 20 %. El agua o el líquido que comprende agua se puede añadir a una temperatura que es menor que la temperatura de la primera conversión para enfriar la primera porción de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica.

Por consiguiente, la densidad de los contaminantes biológicos en el primer medio de conversión al comienzo de la primera etapa de conversión se puede mantener a un nivel razonable, que puede estar en el intervalo de 10^0CFU/ml a 10^6 CFU/ml, preferiblemente de 10^1CFU/ml a 10^5CFU/ml, y lo más preferiblemente de 10^2CFU/ml a 10^3CFU/ml del primer medio de conversión.

El primer medio de conversión puede comprender además una fuente de nitrógeno, típicamente urea, que es una fuente de nutrientes barata para la levadura, pero preferiblemente no contiene vitaminas y/o oligoelementos añadidos, que son utilizados típicamente a escala de laboratorio como suplementos de crecimiento pero son extremadamente costosos. Dicho en otras palabras, preferiblemente no se añaden vitaminas y/o oligoelementos a la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica y al medio de conversión durante el proceso o en las etapas antes del proceso.

Preferiblemente, el pH del primer medio de conversión se ajusta a un valor de 5,0 a 5,5, por ejemplo, mediante la adición por ejemplo de una cantidad adecuada de base (solución de NaOH). Si es necesario para mantener el pH en el intervalo deseado, se pueden añadir alícuotas adicionales de base durante la primera etapa de conversión.

La levadura se añade al primer medio de conversión, o a los componentes utilizados para formar el primer medio de conversión. En una realización, la levadura se añade a la primera porción de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica utilizada para formar el primer medio de conversión. La cantidad de levadura que se ponen en contacto con el primer medio de conversión variará según el volumen total del primer medio de conversión. La levadura puede ser una levadura fresca o puede ser una levadura producida en una etapa de propagación o conversión previa. Preferiblemente, en la primera etapa de conversión se añade una cantidad de levadura para tener una densidad de levadura inicial que esté entre 1×10^6 y 1×10^8 células de levadura por miligramo del primer medio de conversión sobre una base húmeda.

En la primera etapa de conversión, la levadura se mantiene en condiciones que promueven la conversión de la glucosa y xilosa solubles en agua del primer medio de conversión a una primera levadura propagada y una primera porción del producto de fermentación, en donde un cierto porcentaje de la glucosa y xilosa solubles en agua totalmente convertidas se dedica al crecimiento de la biomasa de levadura. De este modo, la primera etapa de conversión se caracteriza por una proporción de la primera conversión azúcar a células, que es la proporción de

porcentaje en peso para el peso de glucosa soluble en agua y xilosa soluble en agua convertidas a la primera levadura propagada a la cantidad total de glucosa y xilosa solubles en agua convertidas totalmente en el primer medio de conversión, sobre una base de carbono y dado que es una relación de porcentaje en peso, se expresa como un porcentaje. La proporción de la primera conversión de azúcar a células está en un intervalo de 5 % a 25 %, preferiblemente de 5 % a 20 %, y los más preferiblemente de 10 % a 20 %.

Para calcular la proporción de conversión de azúcar a células de una etapa de conversión, la cantidad de glucosa y xilosa solubles en agua totalmente convertidas se puede calcular restando la concentración de glucosa y xilosa solubles en agua presentes en el medio de conversión al final de la etapa de conversión a la concentración de glucosa y xilosa solubles en agua presentes en el medio de conversión al principio de la etapa de conversión. La concentración de azúcar se puede determinar por análisis de HPLC estándar. Sin duda, si algún componente se añade a o se elimina del medio de conversión durante la etapa de conversión, debe tenerse en cuenta en la determinación de la densidad como es bien conocido en las técnicas analíticas. Por ejemplo, se puede añadir agua en un momento determinado para diluir el medio de conversión, o se necesita una corrección del pH, o se añade azúcar adicional. En una realización preferida, la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica comprende además enzimas residuales de la etapa o etapas de hidrólisis, una parte de las cuales está todavía activa. Incluso si las condiciones de conversión no son las óptimas para la actividad enzimática, una porción de los carbohidratos insolubles en agua en la materia prima lignocelulósica pretratada insoluble en agua residual se puede hidrolizar a glucosa y xilosa solubles en agua adicionales que, por lo tanto, están disponibles para la levadura. También en este caso, la cantidad total de glucosa y xilosa convertidas por la levadura tendrán en cuenta la glucosa y xilosa solubles en agua adicionales, que se puede calcular a partir de la medida de la cantidad de azúcares insolubles en agua en la materia prima lignocelulósica pretratada insoluble en agua residual al final y al comienzo de la etapa de conversión. La glucosa y xilosa solubles en agua totalmente convertidas tendrán en cuenta también la absorción de azúcar por los contaminantes biológicos.

La densidad celular de levaduras en términos del número de células de levadura por unidad de volumen se puede determinar por recuento de células o, alternativamente, por medio de la medición de la transmitancia óptica. Una vez que se conoce la densidad de levadura, el peso medio de las células de levadura se puede calcular fácilmente midiendo el peso de las células de levadura en una muestra de referencia que tiene una densidad de levadura de referencia.

La proporción de conversión azúcar a células de una etapa de conversión se expresa sobre una base de carbono, que es como la proporción entre el carbono contenido en la biomasa de levadura sobre una base seca al final de la etapa de conversión al carbono contenido en la glucosa y xilosa soluble en agua totalmente convertidas sobre una base seca.

El carbono contenido en la glucosa y xilosa solubles en agua totalmente convertidas se puede derivar por el contenido de carbono en la glucosa y xilosa solubles en agua presentes en el medio de conversión al final y al comienzo de la etapa de conversión, medido mediante un análisis elemental estándar. Alternativamente, puede derivarse de la concentración de glucosa y xilosa solubles en agua convertidas por la levadura que están presentes en el medio de conversión al final y al comienzo de la etapa de conversión, considerando las fórmulas estequiométricas de la glucosa y xilosa solubles en agua.

El contenido de carbono en la levadura se puede medir mediante análisis elementar estándar de la levadura seca. Alternativamente, se puede considerar la conversión de la proporción azúcar a célula de referencia que se utiliza comúnmente en la técnica [véase, por ejemplo, The Alcohol Textbook, Fifth Edition, W. M. Ingledew et al., Nottingham University Press, Ethanol Technology Institute, 2009, p.133), que es 0,50 g de levadura sobre una base seca por gramo de azúcar. Por lo tanto, si 2 g de glucosa se convierten solo a levadura, se produce 1 g de levadura sobre una base seca. Por ejemplo, si 1 g de levadura se produce y 10 g de glucosa se convierten totalmente, la proporción de conversión azúcar a células es:

Proporción de conversión azúcar a células = (1 g de levadura x 2 g de glucosa por gramo de levadura)/10 g de glucosa = 20 %.

La misma proporción de conversión de referencia de 0,50 g de levadura sobre una base seca por gramo de azúcar es válida también en el caso de la xilosa. Por lo tanto, es suficiente medir el peso de levadura producida, sobre una base seca, y la cantidad de azúcares totales, incluyendo glucosa y xilosa, para calcular fácilmente la proporción de conversión de azúcar a células de cada etapa de conversión.

Como se sabe en la técnica, las condiciones aeróbicas mejoran la cantidad de levadura propagada producida. Las condiciones aeróbicas se caracterizan por una saturación de oxígeno media en el medio de conversión que es mayor del 10 %. La saturación de oxígeno es la proporción de la concentración de oxígeno disuelto (O_2) en el medio de conversión a la cantidad máxima de oxígeno que se disolverá en el medio de conversión a esa temperatura y presión bajo equilibrio estable. Por lo tanto, un flujo de oxígeno, aire u otra mezcla de gases que comprende oxígeno a un caudal de 1 vvm o mayor se inserta típicamente en el medio de conversión. Para promover la difusión de oxígeno en el medio de conversión, se proporciona también típicamente la agitación o mezclado del medio de conversión, que es difícil o costoso en materia seca alta, debido a la alta viscosidad del medio de conversión.

En el proceso descrito, la proporción de la primera conversión azúcar a células al final de la primera etapa de conversión se obtiene preferiblemente manteniendo las condiciones aeróbicas solo durante una parte de la primera etapa de conversión. Dicho en otras palabras, en relación a la saturación media de oxígeno en el medio de conversión, la primera etapa de conversión comprende al menos dos fases, una primera fase que es una fase aeróbica, seguida por una segunda fase que es una fase anaeróbica. En una realización preferida, la fase aeróbica es al comienzo de la primera etapa de conversión, y se alcanza insertando aire a un caudal moderado que está en un intervalo de 0,1 vvh a 10 vvh, preferiblemente de 0,1 vvh a 5 vvh, y lo más preferiblemente de 0,5 vvh a 3 vvh. La primera porción de suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica se introduce en el primer recipiente de conversión por gravedad desde una entrada localizada a una altura suficiente para crear burbujas en la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica o en el medio de conversión ya presente en el primer recipiente de conversión. La primera parte de suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica se puede introducir para formar una cascada para aprovechar la oxigenación natural de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica que tiene lugar durante la transferencia en el primer recipiente de conversión. El nivel inicial de saturación de oxígeno es alto, siendo preferiblemente superior al 40 %, y lo más preferiblemente superior al 80 %, y disminuye durante la primera etapa de conversión, debido al caudal de aire moderado. El caudal de aire moderado se utiliza para frenar la disminución natural del nivel inicial de saturación de oxígeno, para obtener una fase aeróbica que es preferiblemente de 3 horas a 12 horas, más preferiblemente de 5 horas a 10 horas, y lo más preferiblemente de 7 horas a 8 horas. Durante la primera etapa de conversión, el primer medio de conversión se mantiene bajo agitación moderada durante al menos una parte del primer tiempo de conversión para mejorar la difusión de oxígeno. La agitación puede alcanzarse mediante medios de mezcla mecánicos. La mezcla se proporciona para frenar y homogeneizar la disminución natural del nivel inicial de saturación de oxígeno, y una potencia moderada es suficiente para obtener las condiciones aeróbicas durante un tiempo en los intervalos deseados, incluso en el caso de una suspensión de materia seca alta. La potencia utilizada para agitar el primer medio de conversión se puede medir en términos de la potencia eléctrica utilizada para agitar una tonelada del primer medio de conversión sobre una base húmeda, que es una densidad de potencia de peso, y se utiliza preferiblemente en el proceso descrito una densidad de potencia de peso media de menos de 100 W/ton del primer medio de conversión sobre una base húmeda.

Las velocidades de absorción de glucosa y xilosa son un importante parámetro del proceso descrito, especialmente en el caso de que el hidrolizado de materia prima lignocelulósica comprenda algunos contaminantes biológicos y no se utilicen esterilización y agentes antibacterianos, ya que en estas condiciones se potencia el crecimiento de contaminantes biológicos. La absorción de glucosa por la levadura es favorita con respecto a la absorción de xilosa, por lo tanto la concentración de glucosa en el medio de conversión empezará a disminuir, mientras que la absorción de xilosa no procederá significativamente hasta que la concentración de glucosa disminuya por debajo de cierto valor crítico. A medida que disminuye la afinidad de la levadura a los azúcares restantes (glucosa y xilosa) en el medio de conversión, la velocidad de absorción total de glucosa y xilosa combinadas por la levadura disminuirá con el tiempo, lo que hará que el crecimiento competitivo de contaminantes biológicos sea favorable. Por lo tanto, en el proceso descrito, la primera etapa de conversión se prolonga durante un tiempo suficiente para consumir al menos el 50 % de la glucosa contenida en el medio de conversión inicial, y menos del 20 % de la xilosa contenida en el medio de conversión inicial. Se pretende que el consumo de glucosa y xilosa sea el consumo total que tiene lugar durante la etapa de conversión, y se pueda verificar midiendo la correspondiente concentración de azúcar en el medio de conversión. Por lo tanto, el consumo de glucosa y xilosa combinadas total que tiene lugar en la primera etapa de conversión incluye también la glucosa y xilosa combinadas absorbidas por los contaminantes biológicos, que se pretenden minimizar en el proceso descrito, y el azúcar finalmente convertido al producto de fermentación. Para mejorar el rendimiento del proceso en términos de biomasa de levadura producida, preferiblemente la primera etapa de conversión se lleva a cabo durante un primer tiempo de conversión suficiente para consumir al menos el 70 % de la glucosa del medio de conversión inicial, y lo más preferiblemente al menos el 80 %. Al mismo tiempo, para evitar que la velocidad de absorción de azúcar total alcance un valor crítico para el crecimiento competitivo de los contaminantes biológicos, preferiblemente la primera etapa de conversión se prolonga durante un primer tiempo de conversión suficiente para consumir menos del 10 % de la xilosa en el medio de conversión inicial, lo más preferiblemente menos del 5 %. También se observa que, mientras la cantidad total de xilosa consumida en la primera etapa de conversión es preferiblemente mayor de 0, en algunos casos la xilosa no se puede consumir apreciablemente al menos en la primera etapa de conversión. La primera etapa de conversión se puede llevar a cabo durante un tiempo de conversión de menos de 30 horas, pero preferiblemente menos de 20 horas, más preferiblemente menos de 15 horas, y lo más preferiblemente menos de 10 horas.

Al final de la primera etapa de conversión, se obtiene un primer caldo de conversión que comprende agua, una primera levadura propagada y una primera porción del producto de fermentación. La cantidad de la primera levadura propagada puede ser de 5 a 15 veces la cantidad inicial correspondiente de levadura, como resultado de las condiciones aeróbicas impuestas durante una parte del primer tiempo de conversión. Los mismos intervalos preferidos se aplican a la densidad celular de levaduras. Preferiblemente, en la primera etapa de conversión la densidad de levadura final está entre 1×10^7 y 1×10^9 células de levadura por miligramo del primer medio de conversión sobre una base húmeda. El primer caldo de conversión comprende además glucosa y xilosa solubles en agua no consumidas por la levadura y materia prima lignocelulósica pretratada insoluble en agua residual.

La primera levadura propagada se utiliza después en una segunda etapa de conversión para convertir una segunda

porción de suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica. En comparación con la primera etapa de conversión, la segunda etapa de conversión se centra en la producción del producto de fermentación, pero al mismo tiempo convierte una pequeña cantidad de glucosa y xilosa solubles en agua a una segunda biomasa de levadura. Al contrario de la primera etapa de conversión, la segunda etapa de conversión convierte la mayoría de la glucosa y xilosa solubles en agua disponibles, y posiblemente toda la glucosa y xilosa solubles en agua, por lo tanto se necesita un segundo tiempo de conversión más largo que el primer tiempo de conversión. La segunda etapa de conversión se realiza para alcanzar un mayor rendimiento de conversión de azúcar que en la primera etapa de conversión y la segunda biomasa de levadura se produce, por lo tanto, para mantener el segundo tiempo de conversión tan bajo como sea posible, limitando el crecimiento de los contaminantes biológicos. La segunda etapa de conversión se realiza para tener una proporción de la segunda conversión azúcar a células que sea menor que la proporción de la primera conversión de azúcar a células. La proporción de la segunda conversión de azúcar a células es preferiblemente mayor del 2 %. Incluso si se puede añadir una cantidad limitada de levadura externa al proceso descrito en la segunda etapa de conversión, se prefiere que solo la primera levadura propagada, o al menos una porción de la misma, sea utilizada. El segundo tiempo de conversión es mayor que el primer tiempo de conversión y preferiblemente menos de 72 horas, más preferiblemente menos de 60 horas, y lo más preferiblemente menos de 50 horas. En cualquier caso, se desea que al menos el 80 % de la glucosa y xilosa solubles en agua totalmente disponibles en el segundo medio de conversión se conviertan en la segunda etapa de conversión.

Un segundo medio de conversión se crea a partir de al menos una porción de la primera levadura propagada y una segunda porción de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica. El procedimiento utilizado para formar el segundo medio de conversión es similar al procedimiento para formar el primer medio de conversión, y las mismas realizaciones preferidas se aplican a *mutatis mutandis* para la creación el segundo medio de conversión. En una realización preferida, la primera levadura propagada no se separa del primer caldo de conversión antes de utilizarse para crear el segundo medio de conversión, y al menos una parte del primer caldo poblado y la segunda porción de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica se mezclan juntas en un segundo recipiente de conversión para formar el segundo medio de conversión. La glucosa y xilosa solubles en agua remanentes que no se han convertido en la primera etapa de conversión están, por lo tanto, disponibles para ser convertidas en la segunda etapa de conversión y no se desperdician. En esta realización, el segundo medio de conversión al comienzo de la segunda etapa de conversión comprenderá además la primera porción del producto de fermentación producido en la primera etapa de conversión. Preferiblemente, la cantidad del primer caldo de conversión y la segunda porción de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica se seleccionan para tener una densidad de levadura inicial en la segunda etapa de conversión que es mayor que la densidad de levadura inicial en la primera etapa de conversión. Se prefiere una densidad de levadura inicial alta para reducir el segundo tiempo de conversión. La densidad de levadura inicial en la segunda etapa de conversión puede estar entre 1 x 10^6 y 1 x 10^8 células de levadura por miligramo del segundo medio de conversión sobre una base húmeda. El primer caldo de conversión y la segunda porción de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica están preferiblemente en una relación en peso sobre una base húmeda que es de 1:2 a 1:10, y lo más preferiblemente de 1:3 a 1:8.

Como en la primera etapa de conversión, también en la segunda etapa de conversión la segunda porción de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica se mantiene preferiblemente a una temperatura de 45 ºC a 55 ºC antes de ser usada para crear el segundo medio de conversión, para limitar el efecto del crecimiento competitivo de los contaminantes biológicos.

Por lo tanto, la densidad de los contaminantes biológicos en el segundo medio de conversión al comienzo de la segunda etapa de conversión se puede mantener a un nivel razonable, que puede estar en el intervalo de 10^0CFU/ml a 10^6CFU/ml, preferiblemente de 10^1CFU/ml a 10^5CFU/ml, y lo más preferiblemente de 10^2CFU/ml a 10^3CFU/ml del segundo medio de conversión.

Para mantener la proporción de la segunda conversión de azúcar a células baja, la segunda etapa de conversión se lleva a cabo en condiciones anaeróbicas, o predominantemente en condiciones anaeróbicas, es decir, las condiciones anaeróbicas se mantienen durante al menos el 80 % del segundo tiempo de conversión. Si está presente, una fase aeróbica puede estar presente preferiblemente al comienzo de la segunda etapa de conversión. Es decir, similarmente a la primera etapa de conversión, la segunda porción de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica y/o el primer caldo poblado se introducen preferiblemente en el primer recipiente de conversión por gravedad desde una entrada localizada a una altura suficiente para crear burbujas en la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica y/o el medio de conversión ya presente en el segundo recipiente de conversión. La suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica se puede introducir para formar una cascada para aprovechar la oxigenación natural de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica que tiene lugar durante la transferencia en el segundo recipiente de conversión. Preferiblemente, no se introduce aire en la segunda etapa de conversión.

Durante la segunda etapa de conversión, el segundo medio de conversión se puede mantener bajo agitación moderada durante al menos una parte del segundo tiempo de conversión para mejorar la homogeneidad de la suspensión. La agitación se puede lograr mediante medios de mezcla mecánicos. La mezcla se proporciona para frenar y homogeneizar la disminución natural del nivel inicial de saturación de oxígeno. La potencia utilizada para agitar el segundo medio de conversión. Se utiliza preferiblemente una densidad de potencia de peso media de menos de 100W/ton del segundo medio de conversión sobre una base húmeda.

La segunda etapa de conversión produce un segundo caldo de fermentación en una forma de suspensión, que comprende agua, el producto de fermentación y la materia prima lignocelulósica pretratada insoluble en agua residual. El producto de fermentación se puede separar y recuperar del segundo caldo de fermentación.

Experimental

Preparación de hidrolizado de materia prima lignocelulósica

Se seleccionó paja de trigo para probar el proceso descrito.

Primero, la materia prima se sometió a un proceso de pretratamiento, aplicando un tratamiento hidrotérmico preliminar a una temperatura de 158 ºC durante 65 minutos, con una primera solubilización del material de partida. El proceso generó una suspensión de materia prima pretratada, que se separó en una porción líquida, que comprende principalmente xilooligómeros, y una porción sólida por medio de una prensa. La porción sólida se sometió a un tratamiento hidrotérmico con vapor a 204 ºC durante 4 minutos, seguido por una explosión de vapor, para generar una materia prima lignocelulósica pretratada sólida.

La materia prima lignocelulósica pretratada sólida y la porción líquida que comprende xilooligómeros se mezclaron en un biorreactor, y se añadió agua para obtener una suspensión de materia prima lignocelulósica pretratada que tiene un contenido de materia seca del 15 % en peso, el pH se ajustó a 5,0±0,2 mediante la adición de NaOH, después la suspensión de materia prima lignocelulósica pretratada se sometió a hidrólisis enzimática.

Se añadió una mezcla enzimática comercial CTec3 de Novozymes, capaz de hidrolizar azúcares tanto de C6 como de C5, correspondiente a una dosis de 7 % mg de proteína por gramos de glucanos en la materia prima lignocelulósica pretratada y la suspensión se hidrolizó a 50 ºC bajo agitación continua durante 72 horas.

El hidrolizado de materia prima lignocelulósica resultante fue una suspensión, que tiene una materia seca del 15 % en peso, que comprende una fracción líquida y una materia prima lignocelulósica pretratada insoluble en agua residual.

La suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica se mantuvo a la temperatura de 50 ºC hasta su uso en los siguientes experimentos de propagación. No se introdujeron antibióticos.

Experimentos de conversión

El proceso descrito se probó tanto a escala de laboratorio como a escala industrial. Los experimentos se llevaron a cabo sin ninguna esterilización entre las etapas de conversión, y entre experimentos.

Escala de laboratorio

Primer experimento de laboratorio

En la primera etapa de conversión, el primer medio de conversión se formó insertando un volumen de 1,2l de suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica caliente en un primer biorreactor y suplementando con una disolución de urea a 1,5 g/l. El pH se fijó a 5,2±0,1 mediante control con NaOH. No se utilizaron vitaminas ni otros nutrientes. El medio de conversión se enfrió a 32 ºC antes de insertar la levadura. La materia seca fue aproximadamente del 15 %. La composición sobre una base húmeda del primer medio de conversión, que corresponde aproximadamente a la composición de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica, se recoge en la Tabla 1. Las composiciones se dan en términos de los componentes solubles en agua que son relevantes para el proceso y la materia prima lignocelulósica pretratada insoluble en agua residual se separa en sus principales componentes (glucanos insolubles, xilanos insolubles y lignina y otros insolubles). Acido acético, ácido fórmico, furfural, hidroximetil furfural son compuestos inhibidores de la propagación de la levadura.

El ácido láctico se produce por contaminación bacteriana y, por lo tanto, se considera como un marcador de la presencia bacteriana. Por lo tanto, una cierta contaminación biológica estaba presente en el hidrolizado de materia prima lignocelulósica.

La primera etapa de conversión se realizó bajo agitación para mezclar el medio de cultivo con un impulsor a 300 rpm en configuración continua, insertando un flujo de aire de 1VVh. VVh corresponde al volumen de gas que fluye por volumen de medio de conversión por hora.

La densidad celular de levaduras se determinó por recuento celular (cámara de recuento celular de Neubauer) y la composición del primer medio de conversión se analizó por HPLC para determinar la concentración de glucosa y xilosa residuales y los compuestos críticos para la propagación de levadura. Ambas medidas se realizaron al comienzo y al final de la etapa de conversión.

Una levadura modificada genéticamente comercial CIluX™2 distribuida por Leaj Technologies, capaz de fermentar glucosa y xilosa, se insertó en el primer medio de conversión a una densidad de levadura inicial de 1,3 x 10^7 células de levadura por miligramo del primer medio de conversión, que corresponden a 0,2 g de levadura sobre una base seca por gramo del primer medio de conversión.

La primera etapa de conversión se realizó para un primer tiempo de conversión de 14 horas para tener en cuenta la fase de retardo inicial necesaria para permitir que la levadura se adapte al medio de conversión. La saturación de oxígeno, pO_2, se midió durante la etapa de conversión mediante una sonda de pO_2 Mettler Toledo InProbe 6820 insertada en el medio de conversión después de la calibración y se recoge en la Figura 1. La pO_2 se mantuvo en un nivel casi estable próximo a aproximadamente el 70 % durante aproximadamente 3 horas, lo que indica que la levadura estuvo casi inactiva como se esperaba durante la fase de retardo, después disminuye progresivamente al 10 % en aproximadamente 6,5 horas.

Una concentración celular de levaduras de 1,5 x 10^8 células de levadura por miligramo se logró en el primer caldo de conversión. Los resultados del crecimiento se evaluaron calculando un factor de crecimiento, que es la proporción entre la concentración de células de levadura al final y al comienzo de la conversión. Un factor de crecimiento de aproximadamente 11,5 se obtuvo en la primera etapa de conversión, que corresponde a aproximadamente 2 g de levadura sobre una base seca por Kg del primer medio de conversión.

La composición del primer caldo de conversión se recoge en la Tabla 1. A pesar de la presencia de enzimas remanentes de la etapa de hidrólisis previa, la alta concentración de azúcar en el caldo de conversión inhibe la hidrólisis adicional de los azúcares oligoméricos y los glucanos y xilanos insolubles.

Aproximadamente 33,9 g/Kg de glucosa se convirtieron (que corresponden a aproximadamente 76 % de la glucosa inicial) y aproximadamente 1,3 g/Kg de xilosa (que corresponden a aproximadamente 7 % de la xilosa inicial) se consumieron en la primera etapa de conversión. Teniendo en cuenta la proporción de conversión de referencia de 0,50 g de levadura por gramo de azúcar, aproximadamente 4,2 gramos de azúcar del primer medio de conversión se convirtieron de esta manera a levadura, por Kg de medio de cultivo, con una proporción de conversión azúcar a célula de aproximadamente el 11 %.

La concentración de ácido láctico no se incrementó significativamente, lo que indica que la propagación de los contaminantes bacterianos estaba en niveles razonables. Se produjo también una cierta cantidad de etanol.

Tabla 1. Composición del medio de conversión inicial (t = 0) y los caldos de conversión (t = 14 h, t = 6 h) de los experimentos a escala de laboratorio.

		Concentración [g/Kg]							
		Primer experimento a escala de laboratorio				Segundo experimento a escala de laboratorio			
		Primera etapa de conversión		Segunda etapa de conversión		Primera etapa de conversión		Segunda etapa de conversión	
		t = 0 h	t = 14 h	t = 0 h	t = 48 h	t = 0 h	t = 6 h	t = 0 h	t = 48 h
Componentes solubles en agua	glucosa	44,49	10,6	34,64	0,01	38,08	12,77	33,98	0,11
	xilosa	17,86	16,57	16,54	0,8	18,09	17,07	15,97	0,73
	glicerol	0,29	1,79	0,63	1,95	0,71	1,54	0,44	1,96
	Ácido fórmico	0,71	0,85	0,87	0,55	0,93	0,7	0,8	0,9
	Ácido láctico	0,19	0,22	0,24	0,27	0,2	0,24	0,26	0,26
	Ácido acético	2,49	2,18	2,24	1,82	2,44	2,14	2,24	1,85
	etanol	0	16,75	3,35	27,09	3,78	15,46	3,09	27,18
	5-HMF	0,06	0,01	0,04	0	0,04	0,02	0,04	0
	furfural	0,05	0	0,04	0	0,02	0	0,03	0
	Oligómeros de glucosa	7,44	5,38	7,38	5,21	7,03	6,82	7,32	5,80
	Oligómeros de xilosa	5,68	4,82	5,72	5,33	5,51	5,23	5,59	4,90
Componentes insolubles en agua	Glucanos insolubles	18,62	18,60	18,63	15,51	18,62	18,65	18,63	16,89
	Xilanos insolubles	2,46	2,46	2,46	2,45	2,46	2,45	2.46	2,24
	Lignina y otros insolubles	49,8	50,4	49,8	50,1	49,9	50,0	49,8	50,1

En la segunda etapa de conversión, una alícuota de 960 ml de hidrolizado de materia prima lignocelulósica caliente se introdujo en un segundo biorreactor, idéntico al primer biorreactor, se enfrió a aproximadamente 32 ºC, después un volumen de 240 ml del primer caldo de conversión se añadió para formar el segundo medio de conversión. El pH se fijó a 5±0,1 mediante una disolución de NaOH y se suplementó con una disolución de urea a 1,0 g/l. De este modo, en la segunda etapa de conversión, el volumen del primer caldo de conversión fue aproximadamente de 1:5 el volumen total del segundo medio de conversión. La composición del segundo medio de conversión se recoge en la Tabla 1. Se observa que el segundo medio de conversión contiene algo de etanol del primer caldo de conversión diluido con suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica fresca; la concentración de etanol fue lo suficientemente baja para no crear problemas a la segunda etapa de conversión. La concentración de glucosa y xilosa iniciales fueron más bajas que en la primera etapa de conversión, ya que se consumieron algunos azúcares.

La densidad de levadura inicial fue de aproximadamente $3,2 \times 10^7$ células de levadura por miligramo del segundo medio de conversión, que corresponde a aproximadamente 0,5 g de levadura sobre una base seca por gramo del segundo medio de conversión. La concentración de PO_2 de la segunda etapa de conversión, recogida en la Figura 1, disminuye del 50 % al 10 % en aproximadamente 2 horas.

La segunda conversión se llevó a cabo durante 48 horas en ausencia de flujo de aire, en una configuración continua, manteniendo una temperatura de 32 ºC bajo agitación a 300 rpm. En la segunda etapa de conversión, la hidrólisis enzimática de la materia prima lignocelulósica pretratada insoluble en agua residual se continuó mediante las enzimas contenidas en el hidrolizado de materia prima lignocelulósica y algunos azúcares adicionales se pusieron a disposición de la levadura.

Una concentración celular de levadura de $1,6 \times 10^8$ células de levadura por miligramo se alcanzó en el segundo caldo de conversión, se obtuvo de este modo un factor de crecimiento de aproximadamente 5, que corresponde a aproximadamente 2,5 g de levadura sobre una base seca por Kg del segundo medio de conversión.

Las composiciones del segundo caldo de conversión muestran que casi todos los azúcares monoméricos en el segundo medio de conversión se consumieron por la levadura propagada, así como azúcares monoméricos adicionales hidrolizados en la segunda etapa de conversión, que mantuvieron su capacidad de fermentación tanto de glucosa como de xilosa. Aproximadamente 55 g de azúcares/Kg del primer medio de conversión fueron, por lo tanto, convertidos a levadura, con una proporción de conversión de azúcar a célula de aproximadamente del 9 %.

La contaminación bacteriana fue muy baja o insignificante, como lo demuestra la concentración de ácido láctico que fue estable.

La eficiencia de todo el proceso de conversión se describe típicamente por medio del factor de conversión de azúcar a etanol sobre una base de carbono. Como se sabe en la técnica, el factor de conversión azúcar a etanol ideal es 0,51. Esto corresponde a la conversión máxima de azúcares a etanol, sin propagación de levadura, como se describe mediante las formulaciones estequiométricas. El factor de conversión de azúcar a etanol total es aproximadamente 0,43, lo que muestra que el proceso descrito alcanza un rendimiento de etanol alto con una cantidad muy baja de levadura externa al proceso.

Segundo experimento de laboratorio

El segundo experimento se realizó como en el primer experimento, pero la alícuota remanente del primer caldo de conversión en el primer experimento se utilizó como inóculo en vez de levadura seca fresca. Además, la primera etapa de conversión se llevó a cabo durante 6 horas, ya que la levadura ya estaba adaptada al medio de conversión. La composición del medio y los caldos de conversión se recogen en la Tabla 1. El contenido de glucosa en el primer medio de conversión fue ligeramente menor que en el primer experimento, ya que se convirtió algo de glucosa en la alícuota residual del primer experimento. Además, algo de etanol estuvo presente incluso a nivel no problemático. La pO_2 de la primera etapa de conversión se recoge en la Figura 1. La pO_2 de la segunda etapa de conversión fue casi idéntica a la etapa correspondiente del primer experimento.

Principales parámetros y resultados de la primera etapa de conversión:

Densidad de levadura inicial: $5,3 \times 10^7$ células de levadura por miligramo

Densidad celular de levadura final: $1,7 \times 10^8$ células de levadura por miligramo

Factor de crecimiento: aproximadamente 3,2

Peso de levadura producida: 1,8 g de levadura sobre una base seca por Kg

Azúcar total convertida: 26 g/Kg

Proporción de conversión azúcar a célula: 13,4 %

Principales parámetros y resultados de la segunda etapa de conversión:

Densidad de levadura inicial: 3,4 x 10^7 células de levadura por miligramo

Densidad celular de levadura final: 1,5 x 10^8 células de levadura por miligramo

Factor de crecimiento: aproximadamente 4,4

Peso de levadura producido: 1,8 g de levadura sobre una base seca por Kg

Azúcar total convertida: 59 g/Kg

Proporción de conversión azúcar a célula: 8 %

Factor de conversión de azúcar a etanol total del proceso completo: 0,43

Validación a escala industrial

El proceso de conversión se probó en un equipo a escala industrial. El procedimiento utilizado fue transpuesto de experimentos a escala de laboratorio.

La primera etapa de conversión se llevó a cabo en un recipiente cilíndrico. La agitación se proporcionó mediante un impulsor coaxial a los ejes del recipiente, girados a 38 rpm.

La segunda etapa de conversión se llevó a cabo en un segundo recipiente cilíndrico. La agitación se proporcionó mediante un impulsor coaxial a los ejes del recipiente, girados a 20 rpm.

La pO_2 se midió por medio de un conjunto de sondas dispuestas en diferentes posiciones dentro del medio de conversión.

Las curvas de pO_2 muestran perfiles similares a los experimentos a escala de laboratorio.

El primer recipiente de conversión se llenó con 350 m^3 del primer medio de cultivo y la primera etapa de conversión se llevó a cabo en 18 horas. La segunda etapa de conversión se llevó a cabo durante 60 horas en 1200 m^3 del segundo medio de cultivo total, que se formó según la proporción 4:1 (hidrolizado fresco:primer caldo convertido).

Ambos experimentos a escala de laboratorio se escalaron a escala industrial.

Principales parámetros y resultados de la primera etapa de conversión:

	Condiciones del primer experimento a escala de laboratorio	Condiciones del segundo experimento a escala de laboratorio
Conversión de glucosa	84 %	97 %
Conversión de xilosa	15 %	13 %
Proporción de conversión azúcar a célula:	17 %	20 %

Principales parámetros y resultados de la segunda etapa de conversión:

Proporción de conversión azúcar a célula:	12 %	15 %

El consumo medio de energía eléctrica fue aproximadamente de 90 W/ton del primer medio de conversión sobre una base húmeda sobre el proceso completo.

Se llevaron a cabo diferentes series, con un consumo medio de energía eléctrica de menos de 100 W/ton del primer medio de conversión. En algunos casos se alcanzó un consumo medio de energía eléctrica de menos de 80 W/ton.

La validación a escala industrial muestra que el proceso descrito puede alcanzar un alto rendimiento de etanol con una mínima cantidad de levadura externa al proceso, baja contaminación bacteriana y muy bajo consumo de energía.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir un producto de fermentación a partir de una suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica que comprende agua, glucosa soluble en agua y xilosa soluble en agua y materia prima lignocelulósica pretratada insoluble en agua, comprendiendo dicho proceso las etapas de:

crear un primer medio de conversión que comprende una primera porción de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica y una levadura capaz de convertir la glucosa y xilosa a una levadura de propagación y un producto de fermentación;

permitir a la levadura convertir al menos el 50 % de la glucosa soluble en agua y menos del 20 % de la xilosa soluble en agua del primer medio de conversión a una primera levadura propagada y una primera porción del producto de fermentación en una primera etapa de conversión llevada a cabo durante un primer tiempo de conversión y que tiene una proporción de la primera conversión azúcar a células en un intervalo del 5 % al 25 %, en donde la proporción de la primera conversión azúcar a células es una proporción de porcentaje en peso de la glucosa y xilosa convertida a la levadura propagada en la primera etapa de conversión a la glucosa y xilosa solubles en agua totalmente convertidas en el primer medio de conversión, sobre una base de carbono;

crear un segundo medio de conversión que comprende al menos una porción de la primera levadura propagada y una segunda porción de la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica;

permitir a la levadura convertir al menos una porción de la glucosa y xilosa solubles en agua en el segundo medio de conversión a al menos una segunda levadura propagada y una segunda porción del producto de fermentación en una segunda etapa de conversión llevada a cabo durante un segundo tiempo que es mayor que el primer tiempo de conversión y que tiene una proporción de una segunda conversión azúcar a células que es menor que la proporción de la primera conversión de azúcar a células, en donde la proporción de la segunda conversión de azúcar a células es una proporción de porcentaje en peso de la glucosa y xilosa solubles en agua convertidas a la levadura propagada en la segunda etapa de conversión a la glucosa y xilosa solubles en agua totalmente convertidas en el segundo medio de conversión, sobre una base de carbono.

2. El proceso de la reivindicación 1, en donde la primera etapa de conversión comprende al menos una primera fase que es una fase aeróbica y una segunda fase que es una fase anaeróbica, en donde la fase aeróbica se realiza durante un tiempo en un intervalo de 3 horas a 12 horas.

3. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la primera etapa de conversión se realiza durante un primer tiempo de conversión que es menor de 30 horas.

4. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la primera etapa de conversión se realiza insertando aire a un caudal que está en el intervalo seleccionado de 0,1 vvh a 10 vvh.

5. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la primera etapa de conversión se realiza mezclando el primer medio de conversión a una densidad de potencia de peso de menos de 100W/ton del primer medio de conversión sobre una base húmeda.

6. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en donde la proporción de la primera conversión azúcar a células está en el intervalo de 5 % a 20 %.

7. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la segunda etapa de conversión se lleva a cabo durante un segundo tiempo de conversión que es menor de 72 horas.

8. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la segunda etapa de conversión se lleva a cabo en condiciones anaeróbicas durante al menos el 80 % del segundo tiempo de conversión.

9. El proceso de la reivindicación 8, en donde al menos el 80 % de la glucosa y xilosa solubles en agua se convierten en la segunda etapa de conversión.

10. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en donde la proporción de la segunda conversión azúcar a células es mayor del 2 %.

11. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el primer medio de conversión y el segundo medio de conversión tienen un contenido en materia seca que es menor del 30 % y mayor del 5 %.

12. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el primer medio de conversión y el segundo medio de conversión comprenden además una fuente de nitrógeno.

13. El proceso de la reivindicación 12, en donde no se añaden al proceso vitaminas y/o oligoelementos.

14. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, en donde la suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica no se somete a ninguna esterilización.

15. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la primera etapa de conversión tiene una densidad de levadura inicial entre 1 x 10^6 y 1 x 10^8 células de levadura por miligramo del primer medio de conversión sobre una base húmeda.

16. El proceso de la reivindicación 15, en donde la primera etapa de conversión tiene una densidad de levadura final que está entre 1 x 10^7 y 1 x 10^9 células por miligramo del primer medio de conversión sobre una base húmeda.

17. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, en donde la segunda etapa de conversión tiene una densidad de levadura inicial que es mayor que la densidad de levadura inicial en la primera etapa de conversión.

18. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde la primera etapa de conversión y la segunda etapa de conversión se llevan a cabo en recipientes separados.

19. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde el producto de fermentación es etanol.

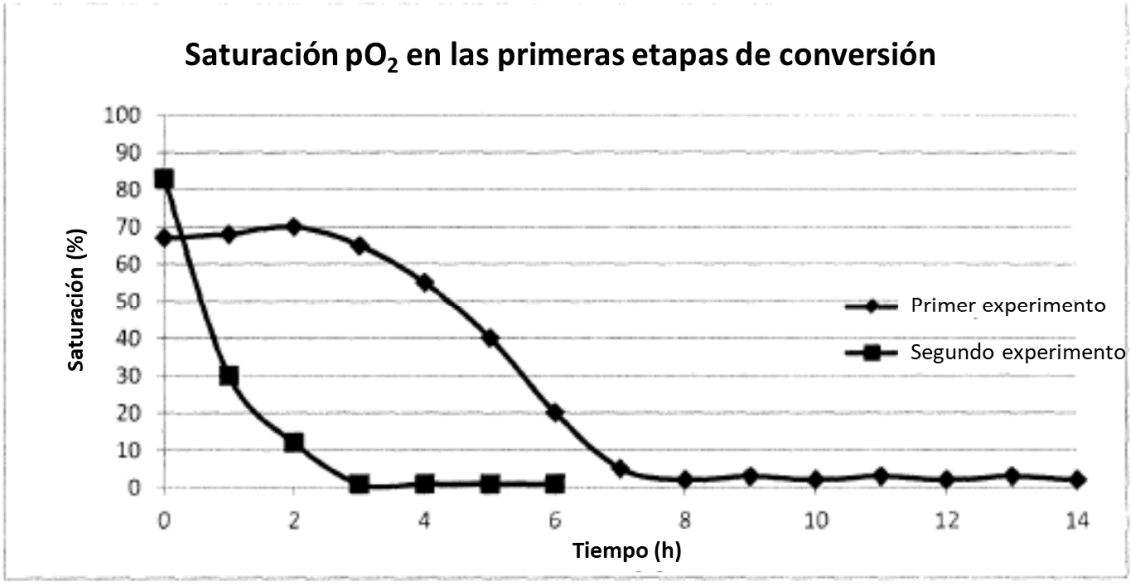

FIGURA 1. Saturación de oxígeno en las primeras etapas de conversión

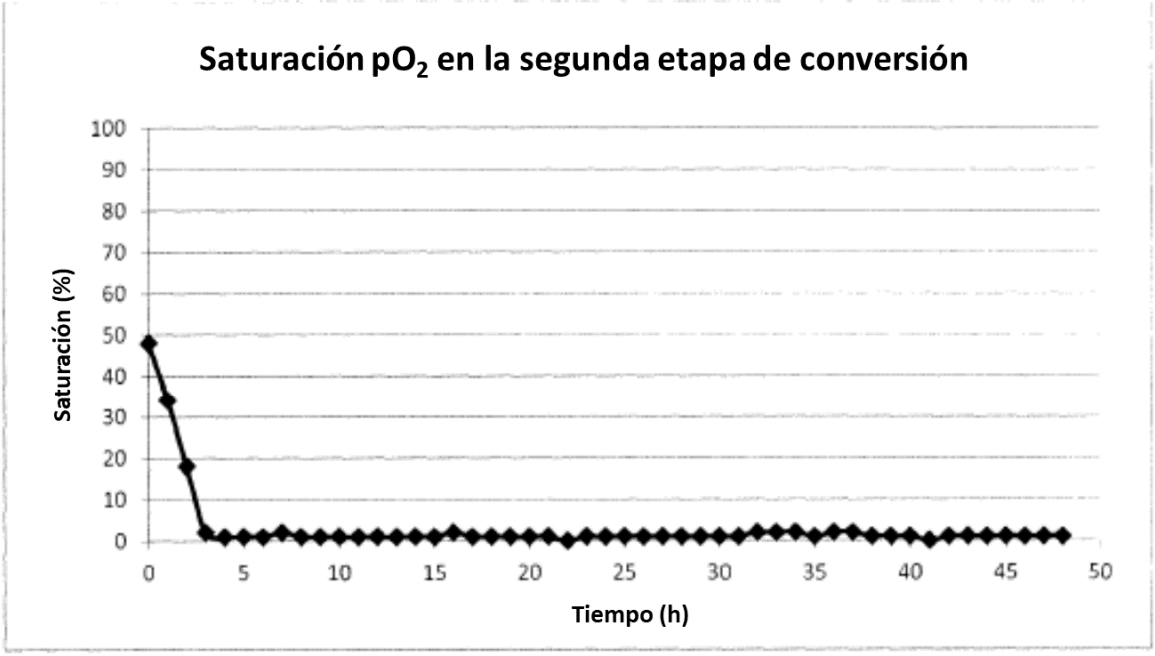

FIGURA 2. Saturación de oxígeno en la segunda etapa de conversión del experimento a escala de laboratorio