

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 116**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02	(2006.01)
C12P 19/14	(2006.01)
C12P 7/64	(2006.01)
C12N 1/14	(2006.01)
C12N 1/16	(2006.01)
C12N 1/20	(2006.01)
C12N 1/22	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2014 PCT/EP2014/077462**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15086780**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2014 E 14809887 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 3080286**

54 Título: **Método para producir aceite unicelular a partir de materiales lignocelulósicos**

30 Prioridad:

11.12.2013 EP 13196743

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.07.2019

73 Titular/es:

**NESTE OYJ (100.0%)
Keilaranta 21
02150 Espoo, FI**

72 Inventor/es:

**VAINIO, HEIDI;
SIPPONEN, MIKA;
LAAKSO, SIMO;
PASTINEN, OSSI;
LEHTOMÄKI, ILKKA;
KOSKINEN, PERTTU y
LAAMANEN, MIIA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 719 116 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

Método para producir aceite unicelular a partir de materiales lignocelulósicos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para producir lípidos microbianos. En particular, la presente invención se refiere a métodos para producir lípidos microbianos utilizando inhibidores obtenibles a partir de materiales lignocelulósicos para suprimir la proliferación de microorganismos no deseados en el caldo de fermentación.

10

Antecedentes de la invención

La lignocelulosa es el biopolímero más abundante en la tierra. La lignocelulosa es el principal componente estructural de las plantas leñosas y las plantas no leñosas, como la hierba. La biomasa lignocelulósica se refiere a la biomasa vegetal que se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina. Grandes cantidades de residuos lignocelulósicos se producen a través de la silvicultura, la madera y las industrias de pulpa y papel y las prácticas agrícolas (paja, rastrojos, bagazo, tamo) y muchas agroindustrias. También los desechos municipales contienen fracciones que se pueden considerar residuos de lignocelulosa, como desechos de papel o cartón, desechos de jardines o desechos de madera de la construcción. Debido a la alta abundancia y al bajo precio, los residuos lignocelulósicos son materiales preferidos para la producción de biocombustibles. Además, los cultivos energéticos dedicados a leña o herbáceos con productividad de biomasa han ganado interés como uso de biocombustibles.

15

20

La producción de biocombustibles, especialmente etanol, a partir de materiales lignocelulósicos mediante fermentaciones microbianas se ha estudiado ampliamente. El mayor desafío para la utilización de materiales lignocelulósicos para la producción microbiológica de biocombustibles o materias primas para biocombustibles radica en la complejidad del material de lignocelulosa y en su resistencia a la biodegradación. En la lignocelulosa, las fibras de celulosa (20-50 % del peso seco de la planta) están incrustadas en la matriz unida covalentemente de hemicelulosa (20-40 %), pectina (2-20 %) y lignina (10-20 %) formando una estructura muy resistente para la biodegradación. Además, los residuos de azúcar de la hemicelulosa contienen una mezcla variable de hexosas (por ejemplo, glucosa, manosa y galactosa) y pentosas (por ejemplo, arabinosa y xilosa) dependiendo de la biomasa.

25

30

El tratamiento previo del material lignocelulósico con alto rendimiento en azúcares que son utilizables por microorganismos representa uno de los mayores desafíos. Se requieren reducciones de costes significativas en los costes de las enzimas necesarias en la hidrólisis de polímeros de azúcar a monómeros de azúcar que son utilizables por los microorganismos deseados. Además, la producción económicamente viable de biocombustibles a partir de materiales lignocelulósicos requiere la conversión eficaz de todos los principales constituyentes de hidratos de carbono de este material complejo a biocombustibles.

35

La hidrólisis enzimática del material lignocelulósico se realiza normalmente en una etapa separada del proceso de producción de biocombustible mediante enzimas comerciales compradas y producidas fuera del proceso real de producción de biocombustible.

40

Ciertos microorganismos pueden producir lípidos a partir de moléculas orgánicas, tales como azúcares procedentes de la lignocelulosa. Ciertos microorganismos, normalmente levaduras, hongos o bacterias, pueden convertir eficazmente los azúcares C6 y C5 de materiales lignocelulósicos en aceite. El aceite producido por microorganismos heterótrofos a menudo se denomina aceite unicelular o aceite microbiano. El proceso de producción de aceite unicelular que utiliza microorganismos heterótrofos comprende cultivar microorganismos en biorreactores aireados, permitir que las células acumulen lípidos, recolectar células ricas en lípidos y recuperar el aceite de las células. Los lípidos basados en microorganismos (es decir, aceites unicelulares) se pueden utilizar como materias primas para la producción de biocombustibles tales como biodiésel, diésel renovable o bioqueroseno.

45

50

Los hidrolizados de lignocelulosa se han utilizado también en la producción de aceites unicelulares. La hidrólisis de lignocelulosa se ha llevado a cabo normalmente mediante el tratamiento previo del material lignocelulósico a azúcares monoméricos antes de la alimentación para bioprocesos.

55

La publicación de patente US2009217569 describe la producción de aceite unicelular a partir de diversos hidrolizados lignocelulósicos y de otros materiales, tales como paja, madera, residuos de la industria de la pulpa y papel, fibras recicladas, desechos municipales, biomasa de algas. La fabricación de biocombustibles comprende tratar el material de origen con agua, ácido o álcali y poner en contacto el filtrado o el precipitado con un microorganismo productor de lípidos. La publicación de patente US2009064567 describe la producción de aceite unicelular a partir de hidrolizados de material de celulosa para la producción de biodiésel y bioqueroseno mediante *Stramenopiles*. El documento US20090011480 describe la producción de aceite unicelular mediante algas y hongos cultivados de forma heterótrofa a partir de materiales lignocelulósicos despolimerizados, tales como paja, madera, desechos de plantas de celulosa, y pasto varilla. El documento CN101148630 describe la producción de aceite unicelular a partir de hidrolizados de hemicelulosa de paja de trigo, maíz o arroz, obtenidos mediante la explosión de vapor, por bacterias u hongos.

60

65

Además, en la técnica anterior se ha descrito la producción de lípidos directamente a partir de azúcares poliméricos en lignocelulosa, tal como xilano por Fall et al. (1984), o celulosa por Lin et al. (2010).

5 El documento WO2010042842 describe la producción de aceite unicelular a partir de hidrolizados de lignocelulosa mediante cultivo mixto de microorganismos capaces de degradar los azúcares poliméricos en lignocelulosa y al menos una especie de alga. El cultivo se cultiva en cultivos aeróbicos y anaeróbicos sucesivos, donde los ácidos grasos se producen a partir de azúcares y de productos de fermentación anaeróbica.

10 El documento WO2010006228 describe la producción secuencial de biocombustibles a partir de lignocelulosas. En la primera etapa, la fermentación anaeróbica con organismos capaces de producir alcoholes a partir de azúcares poliméricos en hidrolizados de lignocelulosa, en la segunda etapa, el medio de cultivo agotado, que posiblemente contenga al menos un producto de fermentación, se trata con algas para acumular aceites unicelulares.

15 Z. Ruan et al, Bioresource Technology, 110, 2012, págs. 198-205 enseña la producción de lípidos a partir de hidrolizados lignocelulósicos con *Mortierella isabellina* y analiza el efecto de los inhibidores.

20 La presencia de microbios contaminantes que no producen lípidos en el caldo de fermentación puede influir en la productividad y el rendimiento del aceite, ya que los microbios que no producen lípidos compiten con los microorganismos productores de aceite (microbios oleaginosos) en los azúcares de los hidrolizados de lignocelulosa y, por lo tanto, hacen que el proceso sea menos factible.

25 Por lo tanto, existe una necesidad de un método para controlar el cultivo de microorganismos en el proceso de producción de aceite unicelular de tal manera que se favorezca la proliferación de los microbios oleaginosos sobre la proliferación de microbios no oleaginosos.

Sumario de la invención

30 La producción de aceite unicelular se realiza normalmente mediante el cultivo de microbios productores de lípidos (microbios oleaginosos) en condiciones aeróbicas en presencia de un sustrato adecuado tal como azúcares lignocelulósicos, tales como azúcares hemicelulósicos, obtenidos mediante fraccionamiento de lignocelulosa. El fermentador aeróbico promedio generalmente tiene un volumen y una capacidad mucho más bajos que los fermentadores anaeróbicos y es más caro de utilizar. De ello se deduce que la demanda de un cultivo eficaz es mayor para la producción de aceite unicelular que depende del cultivo en condiciones aeróbicas. La contaminación del cultivo con microbios que no producen lípidos o solo lípidos en cantidades bajas puede reducir significativamente el rendimiento y la productividad del aceite unicelular. Por lo tanto, debe evitarse la presencia de microbios contaminantes durante el cultivo.

40 Un objetivo de la presente invención es, por lo tanto, proporcionar un método para la producción de aceite unicelular que agote o reduzca la cantidad de microbios contaminantes que no producen lípidos en el cultivo y, por lo tanto, favorezca la proliferación de microbios oleaginosos.

45 El fraccionamiento de lignocelulosa produce normalmente una fracción de hemicelulosa que contiene altas concentraciones de compuestos inhibidores, normalmente compuestos fenólicos. En la producción de aceites unicelulares, generalmente se requieren soluciones de azúcar altamente concentradas (jarabes). Por lo tanto, los hidrolizados de hemicelulosa necesitan ser concentrados. Los inhibidores no volátiles se concentran en hidrolizado cuando el líquido se concentra mediante evaporación.

50 Los productos de degradación se generan en el proceso de fraccionamiento de lignocelulosa. Algunos de estos productos de degradación actúan como inhibidores microbianos (tales como compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, furfural e hidroximetilfurfural). Los inventores han descubierto que mediante el ajuste de la concentración de estos inhibidores microbianos de acuerdo con la tolerancia de los microbios oleaginosos a dicho inhibidor, se puede suprimir la proliferación de los microbios contaminantes que no producen lípidos.

55 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para producir lípidos, que comprende las siguientes etapas

(i) proporcionar un medio de cultivo que comprende un hidrolizado lignocelulósico,

60 (ii) proporcionar un caldo de fermentación mediante la inoculación del medio de cultivo de (i) con un primer microbio, donde dicho primer microbio es un microbio oleaginoso, en el que dicho primer microbio es un microbio oleaginoso, que es capaz de acumular lípidos intercelulares de tal manera que los lípidos acumulan al menos el 15 % (p/p) de la biomasa total (por peso seco celular) del microbio cuando se cultiva en condiciones adecuadas,

65 (iii) incubar dicho medio inoculado con dicho primer microbio en condiciones aeróbicas que permiten que se acumulen los lípidos,

en el que dicho caldo de fermentación comprende al menos un inhibidor del crecimiento microbiano seleccionado del grupo que consiste en compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, furfural e hidroximetilfurfural, y

en el que dicho caldo de fermentación además comprende un segundo microbio no oleaginoso, cuya capacidad para acumular lípidos intercelulares es inferior al 15 % (p/p) de la biomasa total (por peso seco celular) cuando se cultiva en condiciones adecuadas,

en el que dicho al menos un inhibidor de crecimiento microbiano está presente en dicho caldo de fermentación a una concentración dentro del intervalo que permite que el primer microbio proliferé y/o produzca aceite e inhiba la proliferación de dicho segundo microbio en al menos un 20 %, y en el que la presencia del inhibidor de crecimiento microbiano inhibe la proliferación de dicho segundo microbio y favorece la proliferación de dicho primer microbio sobre dicho segundo microbio.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 presenta el rendimiento (peso seco celular (CDW, de sus siglas en inglés) (g/l), concentración de ácidos grasos (FA, de sus siglas en inglés) (g/l), peso seco celular (CDW) libre de grasa (g/l) y contenido de ácidos grasos (FA) (%) en biomasa microbiana) de la fermentación semicontinua con *Aspergillus oryzae* sobre hidrolizados de hemicelulosa y celulosa de paja de trigo.

La Figura 2 presenta el rendimiento del residuo sólido de la autohidrólisis de la paja de trigo.

La Figura 3 presenta la concentración de azúcar soluble total (g/l, eje y izquierdo) y sustancias inhibitoras microbianas potenciales; furfural, hidroximetilfurfural (HMF) y

compuestos fenólicos solubles (g/l, eje y derecha) en la fracción líquida obtenida de la autohidrólisis de paja de trigo con una consistencia del 10 % (g materia seca sólida de paja/g total).

Descripción detallada de la invención

El método de la invención utiliza materiales lignocelulósicos como materia prima para la producción de aceites unicelulares. El aceite unicelular producido se puede utilizar como materia prima para la producción de biocombustibles, tales como biodiésel, diésel renovable o combustible para aviones.

Definiciones

Inhibidor del crecimiento microbiano

En el contexto de la presente invención, el término "inhibidor microbiano" o "compuesto inhibidor" se refiere en el presente documento a los compuestos definidos en la reivindicación 1, procedentes de material lignocelulósico, es decir, productos de degradación de lignocelulosa que pueden inhibir el crecimiento de microorganismos. Dichos compuestos se generan normalmente en el fraccionamiento de lignocelulosa donde se producen azúcares lignocelulósicos. Dichos compuestos incluyen compuestos fenólicos (tales como ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, vainillina, fenol, guayacol, hidroquinona, catecol, ácido ferúlico, siringaldehído, ácido siringico), furfural, hidroximetilfurfural (HMF), ácidos orgánicos tales como (ácido acético, ácido fórmico y ácido levulínico) y extractivos (ácido caproico, ácido caprílico, ácido palmítico y ácido pelargónico). Los efectos inhibitorios del crecimiento de estos compuestos pueden depender de los microorganismos y de las condiciones de cultivo. Cuando los compuestos inhibitorios aparecen en mezclas, pueden tener efectos acumulativos, es decir, inhibir el crecimiento microbiano en concentraciones más bajas que sin la presencia de otro(s) compuesto(s) inhibidor(es).

La expresión "niveles optimizados de inhibidores de la fermentación" se refiere en el presente documento a una concentración de compuestos inhibitorios que permite el crecimiento y la producción de lípidos mediante microorganismos oleaginosos, pero inhibe el crecimiento de microorganismos contaminantes no oleaginosos.

Compuestos aromáticos, compuestos fenólicos

Hidrocarburo aromático se refiere en el presente documento a un compuesto que tiene una estructura de anillo, formado mediante enlaces covalentes entre los átomos de carbono, que contiene enlaces dobles y simples conjugados alternados en una estructura de anillo. Hidrocarburo aromático también puede referirse a un compuesto que tiene una estructura de anillo, formado mediante enlaces covalentes entre átomos de carbono y átomos no de carbono, que contiene enlaces dobles y simples conjugados alternados en una estructura de anillo.

La expresión "compuesto fenólico" se refiere en el presente documento a un compuesto que comprende al menos un grupo hidrocarburo aromático que contiene al menos un grupo hidroxilo (-OH) unido directamente al grupo hidrocarburo aromático. En la presente solicitud, la concentración de compuestos fenólicos se midió con análisis colorimétrico de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002). Dichos compuestos incluyen, pero no se limitan a, compuestos fenólicos tales como alcohol p-cumaril, alcohol coniferílico, alcohol sinapil, 4-hidroxiacetofenona, acetovanilona, acetosiringona, 4-hidroxibenzaldehído, vainillina, siringaldehído, ácido 4-

hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, fenol, guayacol, siringol, hidroquinona, catecol, 2-metilfenol, 3-metilfenol, 4-metilfenol, 2,6-dimetilfenol, 2,4-dimetilfenol, 4-etilfenol, 3,4-dihidroxibenzaldehído, 4-metilguayacol, 4-vinilfenol, 4-etil-2-metilfenol, 4-alilfenol, 3-metoxicatecol, 2,6-dimetoxi-4-metilfenol, alcohol vainillil, homovainillina, ácido homovainilínico, 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etanol, 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)aleno, éster metílico del ácido vainílico, 4-etil-2,6-dimetoxifenol, 4-metilcatecol, 4-etilguayacol, 4-propilfenol, 4-vinilguayacol, alcohol 4-hidroxibencílico, 3-hidroxi-2-metil-(4H)-piran-4-ona, 3,5-dihidroxi-2-metil-(4H)-piran-4-ona, 4-propenilfenol, 2,6-dimetoxi-4-propilfenol, alcohol dihidroconiferílico, homosiringaldehído, alcohol 3,5-dimetoxi-4-hidroxibencílico, 2,6-dimetoxi-4-propenilfenol, 1-(3,5-dimetoxi-4-hidroxifenil)etanol, aldehído coniferilo, siringilacetona, éster metílico del ácido siríngico, propiosiringona, siringil vinyl cetona, alcohol dihidrosinapílico, sinapaldehído, 2,6-dimetoxifenol, 1-(4-hidroxifenil)etanol, eugenol, 5-etilpirogalol, 4-propilguayacol, 1,4-dihidroxi-3-metoxibenceno, isoeugenol, éster metílico del ácido 4-hidroxibenzoico, guayacilacetona, 2,6-dimetoxi-4-vinilfenol, propiovainillona, guayacil vinyl cetona, 4-alil-2,6-dimetoxifenol, e incluyen todos sus posibles isómeros, lignina oligomérica y/o polimérica, taninos, polifenoles, mezclas de compuestos fenólicos, compuestos unidos covalentemente que comprenden compuestos no fenólicos y compuestos fenólicos.

La expresión "concentración de compuestos fenólicos" significa la concentración de compuestos (normalmente expresados como g/l) en solución acuosa, medida con el método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002).

Material lignocelulósico

Las expresiones "biomasa lignocelulósica" o "material lignocelulósico" deben incluir, pero no se limitan a, plantas leñosas o no leñosas, plantas herbáceas u otros materiales que contengan celulosa y/o hemicelulosa: Los materiales pueden ser residuos agrícolas (como paja de trigo, paja de arroz, tamo, cáscaras, rastrojos de maíz, bagazo de caña de azúcar, cogollos y hojas de caña de azúcar), cultivos energéticos dedicados (como pasto varilla, *Miscanthus*, *Arundo donax*, caña canaria, sauce, jacinto de agua, caña de energía, sorgo de energía.), materiales o residuos de madera (incluidos residuos o fracciones de aserraderos y pulpa y/o fábricas de papel, como hemicelulosa, lejía de sulfito gastado, fibra de desecho y/o fango primario), musgo o turba o desechos municipales de papel. La expresión material lignocelulósico comprende también materiales con bajo contenido de lignina, materiales tales como biomasa de macroalgas. Además, los materiales comprenden también fracciones de celulosa o hemicelulosa de prácticas industriales. La expresión material lignocelulósico abarca cualquier tipo de fracción de celulosa. De acuerdo con esta divulgación, las materias primas o ciertas fracciones, tales como hemicelulosa y/o celulosa, de materias primas de diferentes orígenes, especies de plantas o procesos industriales se pueden mezclar y utilizar como materias primas para cultivar la biomasa de microorganismos. Normalmente, el contenido de lignina en la lignocelulosa es superior al 5 %. La biomasa lignocelulósica también puede contener almidón, por ejemplo, en el caso de plantas enteras.

Hidrólisis

El término "hidrólisis" se refiere en el presente documento a la despolimerización mediante la adición de agua en enlaces glucosídicos o enlaces éster de hidratos de carbono no monoméricos a monómeros y oligómeros de azúcar o ácidos carboxílicos.

Hidrolizado

Los términos "hidrolizado" o "material hidrolizado" se refieren en el presente documento a material que ha sufrido hidrólisis.

Hidrolizado de lignocelulosa

La expresión "hidrolizado de lignocelulosa" se refiere en el presente documento a productos de hidrólisis de lignocelulosa o material lignocelulósico que comprende celulosa y/o hemicelulosa, oligosacáridos, mono- y/o disacáridos, ácido acético, ácido fórmico, otros ácidos orgánicos, furfural, hidroximetilfurfural, ácido levulínico, compuestos fenólicos, otros productos de hidrólisis y/o degradación formados a partir de lignina, celulosa, hemicelulosa y/u otros componentes de lignocelulosa, compuestos nitrogenados que se originan a partir de proteínas, metales y/o fragmentos de lignocelulosa no hidrolizados o parcialmente hidrolizados.

Tratamiento hidrotérmico

En el contexto de la presente invención, la expresión "tratamiento hidrotérmico" se refiere al tratamiento térmico de una suspensión acuosa de lignocelulosa a temperaturas superiores a 50 °C. El tratamiento hidrotérmico se puede llevar a cabo bajo presión en un reactor presurizado o a presión atmosférica en un reactor no presurizado. La presión en el reactor presurizado puede generarse mediante el vapor obtenido del agua cuando se calienta hasta el punto de ebullición o mediante la fase de gas a presión añadida. El tratamiento hidrotérmico se puede llevar a cabo en presencia de un catalizador o en ausencia de un catalizador. Tratamiento hidrotérmico en ausencia de un catalizador (también denominado "autohidrólisis" o "AH") para la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica sin catalizador agregado cuando la suspensión acuosa de biomasa lignocelulósica se somete a tratamiento hidrotérmico a temperaturas superiores a 120 °C bajo presión.

"Paja autohidrolizada" se refiere en el presente documento a la fracción sólida que se ha obtenido después de la autohidrólisis. La paja autohidrolizada puede haber sido sometida a lavado.

Explosión de vapor

5 En el contexto de la presente invención, la expresión "explosión de vapor" se refiere a un tratamiento, donde el material se calienta con vapor de alta presión (a temperaturas entre 110 °C y 250 °C, normalmente 140 - 230 °C) bajo una presión con o sin la adición de productos químicos (tales como ácidos) y el material se mantiene a la temperatura durante un cierto tiempo después del cual se libera la presión causando una descompresión explosiva del material. En este contexto, la explosión de vapor se aplica a materiales lignocelulósicos y, normalmente, produce una ruptura de la estructura rígida de las fibras de lignocelulosa, es decir, la desfibrilación de los haces de fibras de celulosa.

Tratamiento de deslignificación

15 "Tratamiento de deslignificación" se refiere en el presente documento a un tratamiento que elimina material no hidrato de carbono tal como lignina de la biomasa lignocelulósica. Tratamiento de deslignificación también se refiere a un tratamiento que elimina material no hidrato de carbono e hidrato de carbono como una mezcla de biomasa lignocelulósica.

Agente de deslignificación alcalina

25 En el contexto de la presente invención, la expresión "agente de deslignificación alcalina" se refiere a un compuesto químico o una mezcla de compuestos químicos que cuando se agregan al agua dan soluciones con una actividad de ion hidrógeno inferior a la del agua pura, es decir, un pH mayor que 7,0. El agente de deslignificación alcalina se puede seleccionar de un grupo de compuestos que comprenden, pero no se limitan a, hidróxidos, tales como LiOH (hidróxido de litio), NaOH (hidróxido de sodio), KOH (hidróxido de potasio), Ca(OH)₂ (hidróxido de calcio), NH₄OH (hidróxido de amonio) o compuestos que pueden formar iones hidróxido en agua como NH₃ (amoníaco) en estado líquido o gaseoso, carbonatos tales como HCO₃⁻ (ion bicarbonato), Li₂CO₃ (carbonato de litio), Na₂CO₃ (carbonato de sodio), K₂CO₃ (carbonato potásico), sulfuros tales como Na₂S (sulfuro de sodio) y los hidratos correspondientes.

Hidrólisis enzimática

35 En el contexto de la presente invención, la expresión "hidrólisis enzimática" se refiere al tratamiento enzimático del material lignocelulósico que comprende celulosa y/o hemicelulosa, oligosacáridos, donde las enzimas facilitan la hidrólisis de la celulosa y/o hemicelulosa, oligosacáridos para obtener mono- y/o disacáridos. Normalmente, el tratamiento de hidrólisis enzimática del material lignocelulósico se realiza sometiendo el material lignocelulósico a una mezcla de enzimas en presencia de agua o un tampón. La mezcla de enzimas consiste, normalmente, en, pero no se limita a, 1,4-β-glucanasas (endoglucanasas y exoglucanasas, o endocelulasas y exocelulasas), 1,4-β-glucosidasas (celobiasas) y enzimas que degradan la hemicelulosa (hemicelulasas, xilanasas, arabinasas, etc.).

Fracción de biomasa lignocelulósica

45 La "fracción de biomasa lignocelulósica" se refiere en el presente documento a cualquier fracción que se haya derivado de la biomasa lignocelulósica y, por lo tanto, puede estar libre de lignina.

Lípido o lípido microbiano

50 En el contexto de la presente invención, "lípido microbiano", "lípido" o "lípido intracelular" se refiere a una sustancia grasa, cuya molécula generalmente contiene, como una parte, una cadena de hidrocarburo alifática, que se disuelve en disolventes orgánicos no polares pero es poco soluble en agua. Los lípidos son un grupo esencial de moléculas grandes en células vivas. Los lípidos son, por ejemplo, grasas, aceites, ceras, ésteres de cera, esteroides, terpenoides, isoprenoides, carotenoides, polihidroxicanoatos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, alcoholes grasos, aldehídos grasos, ésteres de ácidos grasos, fosfolípidos, glucolípidos, esfingolípidos y acilglicerol, tales como triacilglicerol, diacilglicerol o monoacilglicerol. Los lípidos preferidos en la presente invención son grasas, aceites, ceras, acilglicerol y ácidos grasos y sus derivados, en particular triacilglicerol y ésteres de cera. En el contexto de la presente invención, los lípidos se sintetizan mediante, y se acumulan en, microbios (lípidos intracelulares).

60 En relación con esta invención, se utiliza aceite unicelular como sinónimo de lípidos y grasas.

El término "acilglicerol" se refiere a un éster de glicerol y ácidos grasos. Los acilglicerol se producen naturalmente como grasas y aceites grasos. Los ejemplos de acilglicerol incluyen triacilglicerol (TAG, triglicéridos), diacilglicerol (diglicéridos) y monoacilglicerol (monoglicéridos).

Azúcar

En el contexto de la presente invención, el término "azúcar" se refiere en el presente documento a hidratos de carbono oligoméricos, diméricos y monoméricos. En particular, el término azúcar se refiere a hidratos de carbono oligoméricos, diméricos y monoméricos solubles en agua procedentes de materiales lignocelulósicos. Por la expresión "azúcares poliméricos" se entiende los hidratos de carbono que están en forma polimérica y no son normalmente solubles en agua.

Rendimiento de azúcar

En el contexto de la presente invención, la expresión "rendimiento de azúcar" se refiere en el presente documento al rendimiento de hidratos de carbono oligoméricos, diméricos y monoméricos a partir de materiales particulares. En particular, la expresión rendimiento de azúcar se refiere al rendimiento de hidratos de carbono oligoméricos, diméricos y monoméricos solubles en agua procedentes de materiales lignocelulósicos.

Proceso de producción de aceite unicelular

"Proceso de producción de aceite unicelular" se refiere en el presente documento a un proceso, que comprende las etapas para formar o permitir el crecimiento de un microorganismo sintetizador de lípidos y permitir que la masa del organismo así obtenido produzca y/o almacene (acumule) lípidos, recuperar las células de la fase líquida y extraer o recuperar los lípidos de las células. En determinados casos, el aceite unicelular también puede ser extracelular, tal como excretado o liberado de las células en el medio de cultivo durante o después del cultivo.

Cultivo aeróbico

La expresión "cultivo aeróbico" o "fermentación aeróbica" se refiere a un cultivo en el que el microorganismo utiliza oxígeno como aceptor de electrones terminal para la generación de energía (es decir, el microorganismo utiliza la respiración aeróbica). Normalmente, en los biorreactores, el cultivo aeróbico se realiza mediante la adición de oxígeno o una mezcla de gases que contiene oxígeno (normalmente aire), es decir, el biorreactor está aireado. Cuando los microorganismos utilizan la respiración aeróbica en el cultivo, puede denominarse "cultivo en condiciones aeróbicas". Normalmente esto ocurre en biorreactores aireados.

Operación aséptica

La expresión "operación aséptica" se refiere en el presente documento a la operación donde los sistemas de cultivo de microorganismos (por ejemplo, el fermentador) se han esterilizado antes del cultivo, y donde la operación se realiza de una manera que evita la contaminación (es decir, el crecimiento de microorganismos no deseados) de los sistemas de cultivo, por ejemplo, mediante el uso de agentes antimicrobianos no procedentes del tratamiento previo con lignocelulosa. "Operación no aséptica" se refiere a la operación realizada de otra manera que "operación aséptica"

Microbio oleaginoso o microorganismo productor de aceite

El microbio oleaginoso (también conocido como organismos productores de aceite) utilizado en la presente invención se selecciona del grupo de bacterias, cianobacterias, hongos tales como levaduras y hongos filamentosos, arqueas o microalgas. Los microorganismos pueden acumular fácilmente lípidos o se han modificado genéticamente para acumular lípidos o mejorar la acumulación de lípidos.

Preferentemente se utilizan organismos que son capaces de utilizar los azúcares C6 y C5. Preferentemente, los organismos son levaduras, hongos filamentosos o bacterias.

En el contexto de la presente invención, el microorganismo oleaginoso (microbio oleaginoso) se refiere a un microorganismo que es capaz de acumular lípidos intercelulares de manera que los lípidos acumulan al menos el 15 % (p/p) de la biomasa total (por peso seco celular) del microbio cuando se cultiva en condiciones adecuadas. En una realización preferida, el microbio oleaginoso es capaz de acumular al menos el 20 % (p/p) de la biomasa total del microbio (por peso seco celular).

Las cepas de microorganismos preferidas para los fines de la presente invención incluyen, pero sin limitación, las especies y géneros enumerados a continuación: El primer microbio es un microbio oleaginoso capaz de utilizar azúcares procedentes de materiales lignocelulósicos. Preferentemente, los organismos oleaginosos son capaces de utilizar azúcares C6 (azúcares de seis carbonos, tales como glucosa, manosa y galactosa) y azúcares C5 (tales como xilosa y arabinosa) en hidrolizados lignocelulósicos. De acuerdo con una realización de la invención, el organismo oleaginoso es capaz de utilizar hidratos de carbono poliméricos u oligoméricos en lignocelulosa o fracciones de la misma.

Las cepas fúngicas (filamentosas) preferidas son de especies de los géneros *Aspergillus* tales como *Aspergillus oryzae*, *Mortierella* tales como *Mortierella isabellina*, *Chaetomium*, *Claviceps*, *Cladosporidium*, *Cunninghamella*, *Emericella*, *Futilizarium*, *Glomus*, *Mucor*, *Pseudozyma*, *Pythium*, *Rhizopus*, tales como *Rhizopus oryzae*, *Tremella*,

Zygorhynchus, *Humicola*, *Cladosporium*, *Malbranchea*, *Umbelopsis* tales como *Umbelopsis isabellina* y *Ustilago*. Las especies de hongos más preferidas son de los géneros *Aspergillus* y/o *Mortierella*. Los hongos preferidos son aquellos hongos capaces de producir eficazmente lípidos.

- 5 Las cepas de levadura preferidas son aquellas que pertenecen a especies de géneros, *Geotrichum*, *Deparyomyces*, *Pachysolen*, *Galactomyces*, *Hansenula*, *Leucosporidium*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Waltomyces*, *Cryptococcus*, tales como *Cryptococcus curvatus*, *Rhodospiridium*, tales como *Rhodospiridium toruloides* o *Rhodospiridium fluviale*, *Rhodotorula*, tales como *Rhodotorula glutinis*, *Yarrowia*, tales como *Yarrowia lipolytica*, *Candida*, tales como *Candida curvata*, *Lipomyces* tales como *Lipomyces starkeyi* y *Trichosporon* tales como
- 10 *Trichosporon cutaneum* o *Trichosporon pullulans*. Las levaduras más preferidas son de los géneros *Lipomyces*, *Rhodospiridium* y *Cryptococcus*. Las levaduras preferidas son aquellas levaduras capaces de producir eficazmente lípidos.

- 15 Las bacterias preferidas son aquellas que pertenecen a las especies de los géneros *Rhodococcus*, *Acinetobacter* y *Streptomyces*. Las bacterias preferidas son aquellas bacterias capaces de producir eficazmente lípidos.

- 20 Las algas más preferidas son microalgas, tales como especies de microalgas de géneros que comprenden, *Brachiomonas*, *Cryptocodinium*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Hantzschia*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Nitzschia*, *Prototheca*, *Scenedesmus*, *Schizochytrium*, *Traustochytrium* y *Ulkenia*. Las microalgas preferidas son aquellas microalgas capaces de crecer heterotróficamente y producir eficazmente lípidos. Los organismos pertenecientes a los géneros *Schizochytrium*, *Traustochytrium* y *Cryptocodinium* y *Ulkenia* se denominan, a veces, hongos marinos.

- 25 De acuerdo con otra realización de la invención, los hidratos de carbono de la biomasa lignocelulósica están principalmente en forma monomérica y los organismos que no son capaces de utilizar hidratos de carbono oligoméricos o polímeros se utilizan para la producción de aceite unicelular. Dichos organismos productores de aceite se seleccionan del grupo de bacterias, cianobacterias, hongos tales como levaduras y hongos filamentosos, arqueas o microalgas. Los microorganismos pueden acumular fácilmente lípidos o se han modificado genéticamente para acumular lípidos o mejorar la acumulación de lípidos.

30 Masa unicelular que contiene lípidos

- "Masa unicelular que contiene lípidos" representa una masa unicelular y un micelio celular con un contenido de lípidos de al menos, preferentemente, al menos el 10 %, preferentemente, al menos el 15 % (p/p) o más de materia seca de la biomasa del microorganismo.

35

Recuperación de lípidos

- "Recuperación de aceite" o "Recuperación de lípidos" o "Lípido de recuperación a partir de un microbio oleaginoso" se refiere a un proceso, en el cual el lípido (lípido intracelular) se recupera mediante métodos mecánicos, químicos, termomecánicos o autocatalíticos o mediante una combinación de estos métodos a partir de las células del microorganismo. Como alternativa, "recuperación de aceite" puede significar la recuperación de lípidos producidos extracelularmente del caldo de cultivo (fermentación).

40

Masa celular residual

45

En el contexto de la presente invención, "masa celular residual" se refiere a una fracción de material sólido, semisólido o que fluye, que contiene microorganismos tratados para la recuperación de lípidos intracelulares.

Biocombustible

50

En el contexto de la presente invención, "biocombustible" se refiere a combustible sólido, líquido o gaseoso procedente principalmente de biomasa o desechos biológicos y es diferente de los combustibles fósiles, que proceden de los restos orgánicos de plantas y animales prehistóricos.

55

De acuerdo con la directiva de la UE 2003/30/EU, "biodiésel" se refiere a un éster metílico producido a partir de aceite vegetal o aceite animal, de calidad diésel para ser utilizado como biocombustible. De manera más amplia, el biodiésel se refiere a los ésteres alquílicos de cadena larga, como los ésteres metílicos, etílicos o propílicos, de aceites vegetales o aceites animales de calidad diésel. El biodiésel también se puede producir a partir de lípidos de microorganismos, por lo que los lípidos de microorganismos pueden originarse a partir de una bacteria, un hongo (levadura o un hongo filamentosos), un alga u otro microorganismo.

60

Diésel renovable

65

"Diésel renovable" se refiere a un combustible producido mediante un tratamiento con hidrógeno de lípidos de origen animal, vegetal o microorganismo, o sus mezclas, por lo que los lípidos de microorganismos pueden originarse a partir de una bacteria, un hongo (levadura o un hongo filamentosos), un alga u otro microorganismo. El diésel

renovable también se puede producir a partir de ceras procedentes de la biomasa mediante gasificación y síntesis de Fischer-Tropsch. Opcionalmente, además del tratamiento con hidrógeno, se pueden realizar isomerizaciones u otras etapas de procesamiento. El proceso del diésel renovable también se puede utilizar para producir combustible para aviones y/o gasolina. La producción de diésel renovable se ha descrito en las publicaciones de patente EP 1396531, EP1398364, EP 1741767 y EP1741768.

El biodiésel o el diésel renovable pueden mezclarse con combustibles fósiles. Aditivos adecuados, como conservantes y antioxidantes, pueden agregarse al producto combustible.

Lubricante

"Lubricante" se refiere a una sustancia, como grasa, lípidos o aceite que reduce la fricción cuando se aplica como recubrimiento de superficie a las partes móviles. Otras dos funciones principales de un lubricante son la eliminación de calor y la disolución de impurezas. Las aplicaciones de los lubricantes incluyen, pero sin limitación, usos en motores de combustión interna como aceites de motor, aditivos en combustibles, en dispositivos impulsados por aceite, como bombas y equipos hidráulicos, o en diferentes tipos de cojinetes. Normalmente, los lubricantes contienen el 75-100 % de aceite base y el resto son aditivos. Aditivos adecuados son, por ejemplo, detergentes, estabilizantes de almacenamiento, antioxidantes, inhibidores de corrosión, deshazadores, demulsionantes, agentes antiespumantes, cosolventes y aditivos de lubricidad (véase, por ejemplo, el documento US 7.691.792). El aceite base para lubricante puede provenir de aceite mineral, aceite vegetal, aceite animal o de una bacteria, hongo (levadura o un hongo filamentoso), un alga u otro microorganismo. El aceite base también puede provenir de ceras procedentes de la biomasa mediante gasificación y síntesis de Fischer-Tropsch. El índice de viscosidad se utiliza para caracterizar el aceite base. Normalmente, se prefiere un alto índice de viscosidad.

Los lípidos producidos de acuerdo con el método descrito en la presente invención se pueden utilizar como materia prima para la producción de biodiésel, diésel renovable, combustible para aviones o gasolina. El biodiésel consiste en ésteres metílicos de ácidos grasos, y se produce, normalmente, mediante transesterificación. En la transesterificación, los acilglicerol se convierten en ésteres de alquilo (metilo, etilo o propilo) de ácidos grasos de cadena larga. El diésel renovable se refiere al combustible producido mediante el tratamiento con hidrógeno (desoxigenación, hidrogenación o hidroprocesamiento del hidrógeno) de los lípidos. En el tratamiento con hidrógeno, los acilglicerol se convierten en alcanos correspondientes (parafinas). Los alcanos (parafinas) se pueden modificar adicionalmente mediante isomerización o mediante otras alternativas de proceso. El proceso del diésel renovable también se puede utilizar para producir combustible para aviones y/o gasolina. Además, el agrietamiento de los lípidos se puede realizar para producir biocombustibles. Además, los lípidos se pueden utilizar como biocombustibles directamente en ciertas aplicaciones.

Los lípidos producidos con el método también se pueden utilizar como aceites base para lubricantes (aceites lubricantes) o como material de partida para la producción de aceites base para lubricantes.

Materia seca

"DM" o "peso seco" se refiere en el presente documento a materia seca y es una medida de la masa de un material cuando se ha sometido a un tratamiento que, esencialmente, elimina el agua del material (es decir, el material está completamente seco).

Consistencia

"Consistencia" se refiere en el presente documento a la relación entre el peso seco de los sólidos y el peso total de la suspensión.

Método de producción de un lípido microbiano

La presente invención se refiere a un método para producir lípidos, que comprende las siguientes etapas

- (i) proporcionar un medio de cultivo que comprende un hidrolizado lignocelulósico,
- (ii) proporcionar un caldo de fermentación mediante la inoculación del medio de cultivo de (i) con un primer microbio, en el que dicho primer es un microbio oleaginoso, que es capaz de acumular lípidos intercelulares de tal manera que los lípidos acumulan al menos el 15 % (p/p) de la biomasa total (por peso seco celular) del microbio cuando se cultiva en condiciones adecuadas,
- (iii) incubar dicho medio inoculado con dicho primer microbio en condiciones aeróbicas que permiten que se acumulen los lípidos,

en el que dicho caldo de fermentación comprende al menos un inhibidor del crecimiento microbiano seleccionado del grupo que consiste en compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, furfural e hidroximetilfurfural, y en el que dicho caldo de fermentación además comprende un segundo microbio no oleaginoso, cuya capacidad para acumular lípidos intercelulares es inferior al 15 % (p/p) de la biomasa total (por peso seco celular) cuando se cultiva en condiciones adecuadas,

en el que dicho al menos un inhibidor del crecimiento microbiano está presente en dicho caldo de fermentación a

una concentración dentro del intervalo que permite que el primer microbio prolifere y/o produzca aceite e inhiba la proliferación de dicho segundo microbio en al menos un 20 %, y en el que la presencia del inhibidor del crecimiento microbiano inhibe la proliferación de dicho segundo microbio y favorece la proliferación de dicho primer microbio sobre dicho segundo microbio.

5 El método de la invención también se conoce como un proceso de producción de aceite unicelular. El método de la presente invención puede ser parte de un proceso para la producción de biocombustibles como se describe en el presente documento, donde el aceite o al menos parte del aceite se proporciona en forma de aceite microbiano mediante el método descrito en el presente documento.

10 De acuerdo con una realización preferida, el medio de cultivo comprende hidrolizados lignocelulósicos que comprenden celulosa y/o hemicelulosa. Tanto las fracciones de hemicelulosa como las de celulosa de la biomasa lignocelulósica se pueden utilizar como materias primas para la producción de aceite microbiano (aceite unicelular) en el mismo proceso (sistema de biorreactor). El proceso utiliza, preferentemente, microbios oleaginosos que son capaces de utilizar azúcares tanto C6 (por ejemplo, glucosa, manosa, galactosa) como C5 (por ejemplo, xilosa, arabinosa).

15 De acuerdo con otra realización, el medio de cultivo comprende azúcares hemicelulósicos procedentes de lignocelulosa. De acuerdo con otra realización más, los azúcares hemicelulósicos están al menos parcialmente en forma oligomérica cuando se alimenta a un proceso de producción de aceite unicelular.

20 De acuerdo con una realización preferida, la fracción hemicelulósica se separa primero del material lignocelulósico. La separación se puede realizar con cualquier método, preferentemente mediante tratamiento hidrotérmico, autohidrólisis y/o explosión de vapor con o sin adición de ácidos, lo que da como resultado una fracción líquida que contiene azúcares hemicelulósicos y una fracción sólida que contiene celulosa y lignina. La fracción líquida contiene, normalmente, compuestos que inhiben el crecimiento de microorganismos, compuestos que se producen en el proceso de fraccionamiento de lignocelulosa. Estos compuestos son producción de degradación de lignocelulosa, como lignina y azúcares, y comprenden compuestos fenólicos, compuestos de furano (furfural y derivados del mismo) y ácidos orgánicos (principalmente ácido acético, ácido fórmico). También la fracción sólida que contiene celulosa y lignina contiene compuestos inhibidores, dependiendo de la extensión del lavado. El medio de cultivo que comprende una corriente líquida de la etapa de fraccionamiento que consiste en azúcares de hemicelulosa se puede alimentar al cultivo sin hidrólisis enzimática de oligómeros de azúcar, o alternativamente la corriente de hemicelulosa que contiene oligómeros de azúcar se puede alimentar a hidrólisis enzimática para producir monómeros de azúcar antes de utilizarse en cultivo de microbios. La fracción sólida de celulosa-lignina se alimenta a un tratamiento enzimático para disolver celulosa y hemicelulosa residual (no disuelta en la etapa de fraccionamiento) a monómeros de azúcar para la producción de aceite microbiano.

25 El lípido se acumula, normalmente, como lípidos intracelulares dentro del microbio oleaginoso (denominado primer microbio), sin embargo, el lípido microbiano también puede secretarse o al menos parcialmente secretarse al caldo de fermentación del cual se puede recuperar. Por lo tanto, en una realización, el método comprende además una etapa de recuperación del lípido acumulado de dicho primer microbio (microbio oleaginoso). En otra realización, el lípido se recupera del caldo de fermentación. La recuperación de los lípidos se puede llevar a cabo de varias maneras como se explica en el presente documento.

30 La etapa de incubación (iii) (cultivo) se puede realizar como cualquier cultivo aeróbico adecuado, incluido el cultivo discontinuo, semicontinuo o continuo.

35 Cuando el medio de cultivo, el fermentador (biorreactor) o los sistemas conectados con los fermentadores no hayan sido esterilizados, se pueden establecer cultivos de microbios contaminantes. Se deduce que cuando tales microbios contaminantes no son microbios oleaginosos, pueden competir con los microbios oleaginosos en el sustrato disponible y, por lo tanto, reducir el rendimiento de lípidos en la producción.

40 Estos microbios contaminantes (referidos a un segundo microbio) no son deseados y deben evitarse o suprimirse en el sistema. Mediante la introducción de un inhibidor microbiano al cual el microbio oleaginoso es tolerante, el establecimiento de microbios contaminantes (segundo microbio) se evita o suprime en el sistema, donde este último es sensible o, al menos, menos tolerante a dicho inhibidor microbiano.

45 Cuando el hidrolizado lignocelulósico ha sido esterilizado en caliente, normalmente, contendrá una o más especies de microbios no oleaginosos, que, por lo tanto, no son deseados en el cultivo y se encuentran dentro de la definición del segundo microbio. Dicho segundo microbio es un microbio no oleaginoso.

50 En una realización de la presente invención, el segundo (microbio no oleaginoso) se introduce o se ha establecido en el sistema de producción, por ejemplo, el fermentador y así contaminará el caldo de fermentación. Por lo tanto, el caldo de fermentación además comprende un segundo microbio, que es intolerante a dicho al menos un inhibidor del crecimiento microbiano. Alternativamente, el segundo microbio se introduce durante la preparación para el cultivo, por ejemplo, con el hidrolizado lignocelulósico. Por consiguiente, el segundo microbio está presente en el medio de

cultivo proporcionado en la etapa (i) o contaminado el caldo de fermentación en la etapa (ii) o (iii) o está presente en el biorreactor.

5 El objetivo de la presente invención es, por lo tanto, evitar que estos microbios contaminantes (referidos a un segundo microbio) se establezcan en el sistema. Esto se logra mediante la introducción de al menos un inhibidor del crecimiento microbiano al cual el microbio oleaginoso (primer microbio) es tolerante o al menos más tolerante y los microbios contaminantes (segundo microbio) son intolerantes o, al menos, menos tolerantes que el primer microbio.

10 Es evidente a partir de la descripción anterior que si el primer microbio es "tolerante" a un inhibidor del crecimiento microbiano, significa que dicho primer microbio (el microbio productor de aceite), es capaz de proliferar y/o producir aceite incluso en presencia de dicho inhibidor del crecimiento microbiano. Además, es evidente que "intolerante" en el contexto de, por ejemplo, un segundo microbio (contaminante), significa que dicho segundo microbio será inhibido en su crecimiento, tal como se evita que prolifere en un medio que comprende una concentración suficiente de dicho inhibidor del crecimiento microbiano.

15 A partir de los métodos y datos descritos en la sección de ejemplo, también es evidente para los expertos cómo probar la capacidad de cualquier microbio productor de aceite para proliferar y/o producir aceite a un nivel razonable en presencia de un inhibidor del crecimiento microbiano. Y además, también es evidente para el experto en la materia, basándose en los métodos y los datos presentados en los ejemplos, cómo probar cualquier segundo microbio (potencialmente contaminante) para determinar qué tan intolerante es para dicho inhibidor del crecimiento microbiano y, por lo tanto, cuál es la concentración exacta de dicho inhibidor del crecimiento microbiano necesaria en los medios para inhibir la proliferación (crecimiento) de dicho segundo microbio. Por lo tanto, el conocimiento y los métodos están disponibles para probar la capacidad de un primer microbio productor de aceite para superar a los segundos microbios contaminantes en condiciones en las que el medio comprende un inhibidor del crecimiento microbiano, en cantidades como se definen en esta solicitud, o como se define en experimentos como los descritos en la sección de ejemplos.

25 Tolerante significa, por lo tanto, que el microbio tolerante es capaz de superar al microbio intolerante en presencia del inhibidor del crecimiento microbiano.

30 El intervalo de tolerancia es, por lo tanto, el intervalo de concentración de un determinado inhibidor microbiano dentro del cual un primer microbio particular es capaz de proliferar y producir aceite a un nivel que no difiere más del 50 % del nivel de proliferación o producción cuando el inhibidor del crecimiento microbiano no está presente en el medio.

35 Como se puede ver en los métodos y datos presentados en los ejemplos, el intervalo de tolerancia se puede determinar fácilmente utilizando estos métodos. De manera análoga, "fuera del intervalo de tolerancia" del segundo microbio simplemente significa que mediante la utilización de los métodos descritos en los ejemplos, la persona experta puede determinar si la concentración de un inhibidor del crecimiento microbiano está fuera del intervalo de tolerancia de un segundo microbio determinado. Estar fuera del intervalo de tolerancia significa que dicha concentración de un inhibidor del crecimiento microbiano inhibe el crecimiento o la proliferación de dicho segundo microbio en al menos un 20 %, tal como al menos un 30 %, o un 40 %, o al menos un 50 % cuando se compara con el mismo medio son dicho inhibidor del crecimiento microbiano.

40 Puede ser necesario controlar la concentración del inhibidor del crecimiento microbiano y, posteriormente, ajustar la concentración de dicho inhibidor del crecimiento microbiano en un reactor durante el crecimiento o la producción, ya que algunos microorganismos causarán un aumento o una disminución en las concentraciones de, por ejemplo, compuestos fenólicos en el medio. Por lo tanto, "ajustar la concentración" significa que la concentración se ajustará en consecuencia para que aún se encuentre dentro del intervalo deseado dentro del intervalo tolerable para el primer microbio y sin el intervalo tolerable para el segundo microbio.

50 Los presentes inventores han descubierto que los compuestos (tales como compuestos fenólicos) presentes en el hidrolizado lignocelulósico pueden funcionar como inhibidores microbianos en el método de la presente invención. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, dicho al menos un inhibidor del crecimiento microbiano está presente en el medio de cultivo proporcionado en la etapa (i), tal como en el hidrolizado lignocelulósico del medio de cultivo. Los compuestos inhibidores del crecimiento microbiano también se pueden agregar durante el cultivo junto con el hidrolizado lignocelulósico, como en el cultivo semicontinuo.

55 De acuerdo con la presente invención, el microbio oleaginoso (primer microbio) es tolerante o al menos parcialmente tolerante al inhibidor microbiano presente durante el cultivo. El segundo microbio, por otro lado, es intolerante al inhibidor microbiano o, al menos, menos tolerante al inhibidor microbiano que el primer microbio, lo que permite que la concentración del inhibidor microbiano se ajuste de tal manera que las condiciones del microbio oleaginoso sean más favorables que las del segundo microbio.

60 En una realización de la presente invención, dicho al menos un inhibidor del crecimiento microbiano está presente en dicho caldo de fermentación en una concentración dentro del intervalo de tolerancia de dicho primer microbio y fuera del intervalo de tolerancia de dicho segundo microbio. En una realización adicional, el método comprende además una etapa de añadir dicho al menos un inhibidor del crecimiento microbiano o ajustar la concentración de dicho al menos un inhibidor del crecimiento microbiano en el caldo de fermentación.

65

El método de la invención permite la producción eficaz de aceite microbiano sin la necesidad de esterilizar el medio de cultivo antes de hacer el caldo de fermentación mediante la inoculación con el microbio oleaginoso. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, el método no se realiza en condiciones asépticas. En una realización adicional, el medio de cultivo que comprende hidrolizado lignocelulósico proporcionado en la etapa (i) no se ha esterilizado. En otras palabras, en una realización, el método de la invención se lleva a cabo como un proceso no aséptico (operación no aséptica).

La esterilización de biorreactores y medios de cultivo también requiere más energía y un diseño de reactor más costoso en comparación con los sistemas de biorreactores que no incluyen la esterilización. Por lo tanto, evitar la esterilización puede mejorar la eficacia de los costes del cultivo al permitir una operación menos costosa y menores costes de inversión.

Los presentes inventores han descubierto que, en particular, los compuestos fenólicos tales como el compuesto fenólico presente en el hidrolizado lignocelulósico, que sigue como un proceso de fraccionamiento del material lignocelulósico, es particularmente útil como inhibidor microbiano en el método de la presente invención. La ventaja de utilizar esta clase de inhibidores es que se introduce con el hidrolizado lignocelulósico y la concentración se puede ajustar para que se encuentre dentro de la ventana de tolerancia del microbio oleaginoso (primer microbio) y fuera de la ventana de tolerancia del segundo microbio (microbio no oleaginoso) en el caso de que este último sea parcialmente tolerante al inhibidor microbiano.

El método de la presente invención utiliza preferentemente microbios oleaginosos que son altamente tolerantes a los inhibidores basados en lignocelulosa, lo que proporciona una ventana más grande para ajustar la concentración del inhibidor microbiano en el caldo de fermentación.

El inhibidor se selecciona de compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, furfural e hidroximetilfurfural, que están presentes en las fracciones de hemicelulosa y/o celulosa. La concentración puede ajustarse para alcanzar un nivel en el que se suprima el crecimiento de microorganismos contaminantes (microbios no oleaginosos) sin afectar o, al menos, sin afectar significativamente el crecimiento del microbio oleaginoso. Se deduce que dado que el método preferible utiliza inhibidores microbianos presentes en el hidrolizado lignocelulósico, entonces el hidrolizado no se ha sometido a una etapa de eliminación de los inhibidores microbianos del hidrolizado. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, el medio de cultivo que comprende un hidrolizado lignocelulósico proporcionado en la etapa (i) no se ha sometido a un proceso de desintoxicación para eliminar dicho al menos un inhibidor del crecimiento.

En una realización de la presente invención, el al menos un inhibidor del crecimiento microbiano es el grupo de compuesto fenólico, tal como el grupo total de compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado lignocelulósico (medido como fenoles totales por volumen, por ejemplo, g/l). En una realización adicional, la concentración de dichos compuestos fenólicos en dicho caldo de fermentación es al menos 1 g/l. La concentración se puede alcanzar mediante el ajuste de la concentración del medio de cultivo para alcanzar la concentración deseada en el caldo de fermentación. Los compuestos fenólicos se analizan con el método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002), que indica la cantidad total de compuestos fenólicos en un líquido.

En una realización adicional, la concentración de dichos compuestos fenólicos en dicho caldo de fermentación está en el intervalo de 1 g/l a 7 g/l o superior (medio de crecimiento). De acuerdo con una realización de la invención, la concentración de compuestos fenólicos en el caldo de fermentación está entre 7 y 10 g/l, de acuerdo con otra realización, la concentración está entre 10 y 20 g/l, y de acuerdo con todavía otra realización, la concentración de compuestos fenólicos está entre 20 y 50 g/l. Aún en otra realización, la concentración de dichos compuestos fenólicos en dicho caldo de fermentación está dentro del intervalo de 1 g/l a 5 g/l, preferentemente, dentro del intervalo de 1 g/l a 3 g/l.

El contenido del inhibidor microbiano en el hidrolizado lignocelulósico (fracciones de celulosa y hemicelulosa) y/o en el caldo de fermentación se puede ajustar de varias maneras para alcanzar la concentración deseada en el caldo de fermentación.

La concentración de inhibidor en la corriente de hemicelulosa líquida se puede ajustar mediante el cambio de las condiciones (tales como temperatura, retraso (tiempo de retención), pH, contenido de materia seca), por ejemplo, el factor de gravedad, en la etapa del proceso de fraccionamiento de lignocelulosa utilizada para la licuefacción de hemicelulosa (al menos parcial), tal como en el tratamiento hidrotérmico, autohidrólisis y/o explosión de vapor con o sin adición de ácidos. Mediante la evaluación de las condiciones en el fraccionamiento de lignocelulosa, los compuestos inhibidores se pueden ajustar para dar como resultado cierto nivel de compuestos inhibidores en la corriente líquida que contiene hemicelulosa.

Como alternativa, la concentración de inhibidores microbianos en la corriente de azúcar hemicelulósica se ajusta mediante la purificación de la corriente de hemicelulosa mediante cualquier método conocido, que incluye, pero sin limitación, adsorción, absorción, filtración, separación de un soluto, calcificación, evaporación, extracción o tratamiento enzimático.

Generalmente, la corriente de azúcar que contiene principalmente azúcares hemicelulósicos (corriente rica en C5) procedente de la etapa de fraccionamiento de lignocelulosa que da como resultado la licuefacción de hemicelulosa (al menos parcialmente) contiene mayores cantidades de compuestos inhibidores, tales como compuestos fenólicos, ácidos orgánicos (tales como ácido acético y ácido fórmico), furfural y/o hidroximetilfurfural que la corriente de azúcar (corriente rica en C6) de la hidrólisis enzimática de la fracción sólida que contiene celulosa y lignina.

La concentración de inhibidor microbiano en la corriente de azúcar utilizada en el cultivo puede ajustarse mediante la mezcla de la corriente de azúcar hemicelulósica (corriente rica en C5) y la corriente de azúcar celulósica (corriente rica en C6). La mezcla de la corriente de azúcar hemicelulósica y celulósica se puede hacer en cualquier proporción para lograr la concentración apropiada de inhibidores en el cultivo que permita el crecimiento de organismos productores de aceite, pero evite o inhiba significativamente el crecimiento de organismos contaminantes (no es capaz de una producción eficaz de aceite).

Se pueden realizar tratamientos para líquidos procedentes del tratamiento previo con lignocelulosa que también dan como resultado una mayor concentración de inhibidores o un aumento de la concentración de ciertos inhibidores y la eliminación de otros inhibidores, lo que puede ser ventajoso. Por ejemplo, la evaporación del líquido del tratamiento previo que contiene hidratos de carbono hemicelulósicos puede dar como resultado el aumento de la concentración de inhibidores no volátiles (tales como compuestos fenólicos) y la disminución de la concentración de inhibidores volátiles tales como furfural, ácido acético y ácido fórmico. Por lo tanto, parte de los compuestos volátiles, como el furfural, se pueden eliminar durante la concentración de hidratos de carbono.

Generalmente, en la producción de aceite unicelular se utilizan azúcares concentrados. En la concentración de corrientes de azúcar procedentes del fraccionamiento de lignocelulosa y la hidrólisis enzimática, se utiliza normalmente la evaporación. La evaporación da como resultado la concentración de compuestos no volátiles, por ejemplo, compuestos fenólicos, en el concentrado de azúcar. Preferentemente, los organismos se utilizan en la producción de aceite unicelular que tolera altas concentraciones de compuestos fenólicos.

De acuerdo con una realización preferida, las corrientes de azúcar del fraccionamiento de lignocelulosa que contiene hemicelulosa y celulosa se concentran antes de ser alimentadas al proceso de producción de aceite unicelular, pero no se realiza ninguna otra etapa de purificación. De este modo, la cantidad óptima de inhibidores que permite el crecimiento de microorganismos oleaginosos pero inhibe el crecimiento de microorganismos contaminantes no oleaginosos se logra ajustando las condiciones en el fraccionamiento de lignocelulosa, mediante evaporación de corrientes de azúcar lignocelulósicas y mediante la mezcla de la corriente rica en azúcar de hemicelulosa (jarabe C5) y la corriente rica en azúcar de celulosa (jarabe C6) en el caldo de fermentación.

El tratamiento enzimático tiene un largo tiempo de retención (normalmente de 1 a 3 días) y, por lo tanto, es propenso a la contaminación microbiana que causa la pérdida de azúcar y problemas en la producción de aceite microbiano (fermentación aeróbica). De acuerdo con una realización preferida, la fracción de celulosa + lignina de la etapa de fraccionamiento que da como resultado al menos una licuefacción parcial de hemicelulosa se lava solo hasta el punto de permitir el tratamiento enzimático pero inhibe el crecimiento de microorganismos contaminantes en la hidrólisis enzimática y, por lo tanto, disminuye las pérdidas de azúcar.

La cantidad de compuestos inhibidores en la fracción sólida proveniente del fraccionamiento de lignocelulosa que contiene celulosa se puede ajustar mediante el grado de lavado de la fracción de celulosa sólida antes de la hidrólisis enzimática, o mediante el cambio de las condiciones del proceso (tales como temperatura, retraso (tiempo de retención), pH), en el proceso de fraccionamiento lignocelulósico produciendo la fracción sólida de celulosa y lignina.

Hidrolizado lignocelulósico utilizado por el método de la invención

El hidrolizado de lignocelulosa utilizado por el método de la presente invención es un producto de hidrólisis de lignocelulosa o material lignocelulósico. El hidrolizado de lignocelulosa se puede obtener mediante uno o más tratamientos de lignocelulosa o material lignocelulósico, incluido la hidrólisis (tratamiento hidrotérmico y/o autohidrólisis), explosión de vapor con o sin adición de ácidos, una o más etapas de deslignificación, por ejemplo, deslignificación con un agente de deslignificación alcalina. El hidrolizado de lignocelulosa utilizado por el método de la invención puede ser un producto de cualquier método de fraccionamiento de lignocelulosa en el que las hemicelulosas se disuelven al menos parcialmente.

El hidrolizado de lignocelulosa se puede obtener mediante autohidrólisis como primer paso. La autohidrólisis se realiza normalmente con un contenido de materia seca del 5 al 40 %, a temperaturas entre 140 y 240 °C durante 1-120 minutos sin la adición de compuestos ácidos, lo que da como resultado una solución del 5 al 40 % del contenido de materia seca de material lignocelulósico, incluidos los hidratos de carbono hemicelulósicos. Normalmente, la extracción con agua caliente disuelve del 30 al 100 % de los carbohidratos hemicelulósicos del material lignocelulósico, preferentemente más > 50 %, más preferentemente > 70 %, más preferentemente > 80 %, incluso más preferentemente > 90 %. Los hidratos de carbono de hemicelulosa disueltos están al menos parcialmente en forma oligomérica. Más normalmente, la autohidrólisis se realiza a un contenido de materia seca del 10-30 % a 160-

220 °C, dependiendo de la materia prima lignocelulósica. Después de la autohidrólisis, las fases sólida y líquida se separan mediante cualquier método, tal como filtración, por ejemplo, filtración a presión, o mediante una prensa de tornillo. La fracción sólida se puede lavar para eliminar la hemicelulosa disuelta de la fase sólida.

5 De acuerdo con otra realización de la invención, el hidrolizado de lignocelulosa es un producto del tratamiento de la lignocelulosa con vapor o explosión de vapor con o sin adición de compuestos ácidos, en general a temperaturas entre 110 y 250 °C, más normalmente a temperaturas entre 140 y 230 °C. El tratamiento da como resultado la disolución de hidratos de carbono hemicelulósicos. Opcionalmente, el material sólido de la explosión de vapor se lava para recuperar los hidratos de carbono hemicelulósicos disueltos.

10 De acuerdo con otra realización más de la invención, el hidrolizado de lignocelulosa es un producto del tratamiento de la lignocelulosa con amonio para disolver los hidratos de carbono hemicelulósicos que contienen oligómeros. De acuerdo con una realización de la invención, la expansión de la fibra de amonio (AFEX, de sus siglas en inglés) o la percolación de reciclaje de amoniaco se utiliza con una temperatura entre 60 °C y 220 °C.

15 Durante el tratamiento del material lignocelulósico, otros compuestos orgánicos distintos de los hidratos de carbono, como los compuestos fenólicos (tales como el ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, vainillina, fenol, guayacol, hidroquinona, catecol, ácido ferúlico, siringaldehído, ácido siringico), furfural, hidroximetilfurfural (HMF), ácido acético, ácido fórmico y ácido levulínico, se forman y liberan normalmente en el tratamiento y se disuelven en fase líquida junto con los hidratos de carbono hemicelulósicos. Además, se pueden liberar sustancias extractivas como el ácido caproico, el ácido caprílico, el ácido palmítico y el ácido pelargónico.

20 Los compuestos fenólicos, furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético y ácido fórmico son normalmente inhibidores del crecimiento microbiano. Las concentraciones de los compuestos que causan la inhibición del crecimiento dependen del microorganismo. Algunos microorganismos productores de aceite, preferentemente hongos, más preferentemente hongos filamentosos, son altamente tolerantes a los compuestos inhibidores, tales como compuestos fenólicos, furfural, HMF, ácido acético y ácido fórmico, formados en el tratamiento previo de lignocelulosa (es decir, hidrólisis, fraccionamiento).

25 Como se menciona en el presente documento, los inhibidores microbianos generados durante el fraccionamiento del material lignocelulósico para obtener el hidrolizado de lignocelulosa son particularmente útiles como inhibidores microbianos en el método de la presente invención.

30 La utilización de organismos de producción oleaginosa que son altamente tolerantes a estos compuestos inhibidores es favorable, ya que puede disminuir la necesidad y complejidad de las operaciones unitarias para la eliminación de inhibidores y además disminuir o prevenir el crecimiento de microorganismos contaminantes en el proceso de fermentación aeróbica en la producción de aceite unicelular.

40 **Primer microbio**

En una etapa del método, el medio de cultivo que comprende un hidrolizado lignocelulósico se inocula con un primer microbio, que es un microbio productor de lípidos (microbio oleaginoso). En una realización de la presente invención, el primer microbio (microbio oleaginoso) se selecciona de la lista que consiste en hongos filamentosos, levaduras, bacterias y algas o bacterias. Preferentemente se utilizan organismos que son capaces de utilizar los azúcares C6 y C5.

50 El microbio oleaginoso puede ser capaz de producir lípidos por naturaleza o el microbio oleaginoso puede haber obtenido la capacidad de producir lípidos por modificación genética, lo que aumenta la producción de lípidos intracelular y la capacidad del microbio para acumular lípidos intracelulares.

En el contexto de la presente invención, el primer microbio (el microbio oleaginoso) se refiere a un microorganismo que es capaz de acumular lípidos intercelulares de manera que los lípidos acumulan al menos el 15 % (p/p) de la biomasa total (por peso seco celular) del microbio cuando se cultiva en condiciones adecuadas. De este modo, dicho primer microbio (microbio oleaginoso) es capaz de producir y acumular más del 15 % de su peso como lípido (por peso seco celular). En una realización preferida, el primer microbio (microbio oleaginoso) es capaz de acumular al menos el 20 % (p/p) de la biomasa total del microbio (por peso seco celular).

60 De ello se deduce que los microbios que no están dentro de la definición anterior con respecto a su capacidad para acumular lípidos intercelulares se consideran microbios no oleaginosos y, por lo tanto, no se desean durante la incubación. En el contexto de la presente invención, el segundo microbio se refiere a un microbio no oleaginoso, es decir, la capacidad del segundo microbio para acumular lípidos intercelulares es inferior al 15 % (p/p) de la biomasa total (por peso seco celular) cuando se cultiva en condiciones adecuadas.

65 En una realización de la presente invención, el primer microbio (microbio oleaginoso) se selecciona del grupo que consiste en *Mortierella*, *Aspergillus*, *Lipomyces*, *Rhodospiridium* y *Cryptococcus*. Los inventores han descubierto que las especies de estos géneros son particularmente tolerantes al inhibidor microbiano presente en el hidrolizado

lignocelulósico, como los compuestos fenólicos descritos en el presente documento.

Los microbios no oleaginosos (segundo microbio) incluyen bacterias no oleaginosas que incluyen, pero no se limitan a, *Bacillus spp.* y *Pseudomonas spp.* Por lo tanto, en una realización de la presente invención, el segundo microbio se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus spp.* tal como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas spp.* tal como *Pseudomonas fluorescens*. Los inventores han descubierto que estos microbios no oleaginosos son intolerantes a los inhibidores microbianos presentes en el hidrolizado lignocelulósico, en particular los compuestos fenólicos del hidrolizado lignocelulósico.

De acuerdo con otra realización de la invención, el segundo microbio no oleaginoso se selecciona de entre levaduras no oleaginosas, hongos filamentosos no oleaginosos, o microalgas no oleaginosas.

Se deduce que cuando el segundo microbio (microbios no oleaginosos) es intolerante a los inhibidores microbianos en forma de compuestos fenólicos del hidrolizado lignocelulósico, entonces los microbios oleaginosos (primer microbio) se seleccionan preferentemente de los microbios oleaginosos, que son particularmente tolerantes a los compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado lignocelulósico.

Por lo tanto, en una realización de la presente invención, el primer microbio (microbio oleaginoso) se selecciona del grupo que consiste en *Mortierella*, *Aspergillus*, *Lipomyces*, *Rhodospodium* y *Cryptococcus* y el al menos un inhibidor del crecimiento microbiano del grupo de compuesto fenólico, tal como el grupo total de compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado lignocelulósico (medido como la concentración de fenoles totales por volumen de caldo de fermentación, por ejemplo, como g/l), y, preferentemente, la concentración de dichos compuestos fenólicos en dicho caldo de fermentación es al menos 1 g/l, tal como dentro del intervalo de 1 g/l a 7 g/l o superior (medio de crecimiento). Aún en otra realización, la concentración de dichos compuestos fenólicos en dicho caldo de fermentación está dentro del intervalo de 1 g/l a 5 g/l, preferentemente, dentro del intervalo de 1 g/l a 3 g/l. De acuerdo con una realización de la invención, la concentración de compuestos fenólicos en el caldo de fermentación está entre 7 y 10 g/l, de acuerdo con otra realización, la concentración está entre 10 y 20 g/l, y de acuerdo con todavía otra realización, la concentración de compuestos fenólicos está entre 20 y 50 g/l.

30 Caldo de fermentación

El caldo de fermentación proporcionado en el método para producir lípidos de acuerdo con la presente invención comprende un hidrolizado lignocelulósico, al menos un inhibidor del crecimiento microbiano como se define en la reivindicación 1, un microbio oleaginoso, en el que dicho microbio oleaginoso es tolerante a dicho inhibidor(es) del crecimiento microbiano, y un segundo microbio no oleaginoso. Preferentemente, dicho al menos un inhibidor del crecimiento microbiano está presente en el hidrolizado lignocelulósico como un compuesto generado mediante el tratamiento previo de fraccionamiento del material lignocelulósico para obtener el hidrolizado lignocelulósico.

El contenido del inhibidor microbiano en el hidrolizado lignocelulósico (fracciones de celulosa y hemicelulosa) y/o en el caldo de fermentación se puede ajustar, por lo tanto, para alcanzar la concentración deseada en el caldo de fermentación. Preferentemente, el al menos un inhibidor microbiano es el compuesto fenólico del hidrolizado lignocelulósico y el microbio oleaginoso es un microbio oleaginoso tolerante a los compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado lignocelulósico.

45 Ejemplos

Preparación de hidrolizados lignocelulósicos para cultivos.

Líquido A de autohidrólisis

Se preparó el líquido A de autohidrólisis sometiendo la paja de trigo a un tratamiento de autohidrólisis a 195 °C seguido de una explosión de vapor a temperatura y presión ambiente. Después de la autohidrólisis, el material se suspendió en agua del grifo para separar los azúcares hemicelulósicos en disolución. La separación de los líquidos de los sólidos se realizó mediante filtración a presión de la suspensión formando una fase líquida que contenía hemicelulosa y, una fase sólida que contenía celulosa y lignina. La fase líquida (que contenía azúcares hemicelulósicos parcialmente en forma oligomérica) se concentró para obtener un líquido A de autohidrólisis utilizado en el cultivo. El líquido A de autohidrólisis contenía 112 g/l de azúcares según el análisis mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y 13 g/l de compuestos fenólicos según el análisis con el método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002).

En el experimento de cultivo, el hidrolizado se diluyó con agua para obtener la concentración deseada en el caldo de cultivo.

Líquido B de autohidrólisis

Se preparó líquido B de autohidrólisis a partir de paja de trigo con un tratamiento que consistió en lavar la paja seguido de autohidrólisis. La primera paja de trigo (38,1 kg de DM) se lavó en un tanque de reactor agitado de 500 dm³ con agua a 80 °C. La primera fracción sólida se separó de la primera fracción líquida en un filtro Seitz. La primera fracción sólida (34,7 kg de DM) se cargó manualmente en un reactor de 500 dm³ y se mezcló con agua para dar una suspensión con una consistencia del 8,6 %. La suspensión se calentó hasta 175 °C (9,8 bar) y la presión se liberó abriendo la válvula conectada al reactor. La segunda fracción líquida se separó de la segunda fracción sólida en una centrifuga decantadora. La segunda fracción sólida se lavó en suspensión una vez con agua y la tercera fracción líquida se separó de la fracción sólida lavada (se obtuvieron 128 kg con un contenido de materia seca del 16,9 %). Las fracciones líquidas segunda y tercera se combinaron, se pasaron a través del filtro de bolsa y el filtrado obtenido (514 kg) se trató con carbón activado (4,1 kg) a temperatura ambiente. El líquido tratado con carbón activado se clarificó y se concentró en un evaporador de película descendente para dar 23,8 kg de líquido de autohidrólisis concentrado con un contenido de materia seca del 16,3 % y una sustancia seca refractométrica a 18 °Bx. El líquido concentrado de autohidrólisis se concentró de nuevo mediante evaporación para dar un líquido B de autohidrólisis con un pH de 4,8 y un contenido de materia seca del 44,6 %, de los cuales el contenido total de hidratos de carbono comprendía el 78,1 % (p/p). El contenido de hidratos de carbono se determinó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) después de la hidrólisis ácida diluida (ácido sulfúrico al 4 % p/p, 121 °C, 1 h) de la muestra. La concentración de compuestos fenólicos fue de 31 g/l según el análisis basado en el método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002).

Después de esto, se utilizó el líquido de autohidrólisis (que contiene azúcares hemicelulósicos parcialmente en forma oligomérica) en experimentos de cultivo como tales.

Líquido C de autohidrólisis

La reacción de autohidrólisis para la paja de trigo y el posterior aislamiento de oligosacáridos de hemicelulosa se llevó a cabo para producir una fracción líquida para la fermentación y una fracción sólida susceptible de hidrólisis enzimática. Para conseguir esto, se mezclaron 35,7 kg de paja de trigo (contenido de materia seca del 89,8 %) con 240 kg de agua dando una suspensión con una consistencia del 11,6 % en un tanque de reactor agitado de 500 dm³. La suspensión se calentó hasta 180 °C, seguido de enfriamiento hasta por debajo de 100 °C. La suspensión tratada hidrotérmicamente se descargó del reactor y la primera fracción líquida se separó de la fracción sólida utilizando una centrifuga decantadora. La fracción sólida se lavó en suspensión en agua ácida ajustada a pH 4 con ácido fosfórico. La fracción sólida se separó de la segunda fracción líquida en una centrifuga decantadora. La primera y segunda fracciones líquidas se combinaron y se concentraron en un evaporador de película descendente para dar 18,3 kg de líquido de autohidrólisis concentrado formando líquido C de autohidrólisis que contiene azúcares de hemicelulosa parcialmente en forma oligomérica y con un contenido de materia seca del 42 % y una sustancia seca refractométrica a 38 °Bx. La fracción sólida lavada (96,7 kg con un contenido de materia seca del 23,0 %) se utilizó como material de alimentación para la hidrólisis enzimática para producir hidrolizado de celulosa para el cultivo.

Parte de los compuestos fenólicos que contenía el líquido concentrado de autohidrólisis se eliminó tratando el líquido mediante la adición de 40 g/l de carbón activado, mezclando suavemente durante 20 horas a 4 °C y finalmente filtrando el carbono con un paño de filtración de 400 µm. Este líquido se utilizó en el ejemplo 3 (líquido C de autohidrólisis purificado). En el ejemplo 4, el hidrolizado se utilizó como tal, sin purificación.

El hidrolizado enzimático de la fracción de celulosa de la paja de trigo se preparó a partir de la fracción sólida que contenía celulosa (después del lavado) del experimento de autohidrólisis en el que se preparó el líquido C de autohidrólisis. La fracción sólida lavada del tratamiento de autohidrólisis que forma el líquido C de autohidrólisis (17,3 kg con un contenido de materia seca del 23,1 %) se pesó en un tanque de reactor agitado de 40 dm³ y se mezcló con 14,7 kg de agua y 10 ml de NaOH al 50 % (p/p) para dar una suspensión con una consistencia del 12,5 % y a pH 5. El reactor se calentó y se mantuvo a 50 °C y 216 ml de mezcla de enzimas que comprendía 82 % de celulosa (Econase CE, Roal Oy), 10 % de celobiasa (Novozyme 188, Sigma/Novozymes) y 7 % de xilanasa (GC140, Genencor). Durante el tratamiento enzimático, la suspensión se agitó periódicamente durante 5 min tres veces por hora. Después de 48 horas de tiempo de residencia, la suspensión se complementó con una mezcla enzimática fresca que representaba el 10 % de la dosis inicial de la enzima y que tenía proporciones similares de enzimas individuales. Después de 72 h de tiempo de residencia a 50 °C, la fracción líquida se separó de la fracción sólida mediante filtración utilizando una prensa hídrica. La fracción sólida se lavó una vez con agua y la fracción líquida se separó de nuevo de la fracción sólida. Las fracciones líquidas se combinaron y se concentraron mediante evaporación a presión reducida. El concentrado de hidrolizado celulósico (1,57 kg) contenía 220 g/l de azúcar total.

El hidrolizado de celulosa que contenía azúcares monoméricos se utilizó como tal en el cultivo.

Líquido D de autohidrólisis

Se preparó una suspensión mediante la mezcla de 10,5 kg de paja de trigo molida (contenido de materia seca del 92,7 %) y 54,1 kg de agua del grifo en un recipiente de 100 dm³. Después de almacenar a temperatura ambiente durante 18 h, se pesaron 64,2 kg de la suspensión en un reactor de autoclave agitado cilíndrico horizontal de 250

dm³. El reactor se cerró y se calentó durante 75 min a 140 °C, se mantuvo a 140 °C durante 5 h y se enfrió a temperatura ambiente durante 30 min. La suspensión tratada hidrotérmicamente se descargó manualmente del reactor, y la primera fracción líquida se separó del primer sólido mediante filtración. La primera fracción sólida se lavó dos veces con agua del grifo y se prensó utilizando una prensa hídrica que dio una fracción sólida lavada. La fracción sólida lavada (20,9 kg) tenía un contenido de materia seca del 42,7 %. La primera fracción líquida se combinó con las aguas de lavado y se concentró en un evaporador de película descendente hasta un contenido de materia seca del 11,5 % (p/p). El líquido concentrado, Líquido D de autohidrólisis, contenía un 49,3 % de azúcar total de la materia seca total del líquido concentrado según se determinó después de la hidrólisis ácida diluida (ácido sulfúrico al 4 % p/p, 121 °C, 1 h) mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Las proporciones relativas de xilosa anhidra, arabinosa anhidra, glucosa anhidra y galactosa anhidra del contenido total de azúcar fueron 57 %, 19 %, 13 % y 11 %, respectivamente.

Después de esto, se utilizó el líquido D de autohidrólisis que contiene azúcares hemicelulósicos parcialmente en forma oligomérica en experimentos de cultivo como tales.

Ejemplo 1 - El efecto del ácido acético y ácido fórmico en el crecimiento de hongos

Los experimentos se realizaron utilizando una cepa fúngica *Aspergillus oryzae* productora de lípidos. A partir del hongo esporulante que creció en placas de PDA, se realizó una suspensión de esporas mediante la adición de 12 ml de agua estéril y las esporas se rasparon con un bucle de inoculación al líquido. La suspensión de esporas se utilizó para la inoculación de medios.

Los componentes base del medio se presentan en la tabla 1. Todos ellos contenían estos nutrientes básicos y una pequeña cantidad de celulosa fina para evitar que los hongos se agrupen.

Tabla 1: Composición básica del medio

	g/l
Celulosa	2
Extracto de malta	30
Peptona	3

El medio se hizo utilizando agua del grifo.

Los ácidos orgánicos se agregaron de modo que la concentración del ácido fórmico y acético solo fue de 0, 1, 3, 5 y 7 g/l, y para los dos ácidos juntos 0, 1, 3, 5, 7 y 9 g/l. Después de esto, el pH del medio se ajustó a 5,5-6,0 utilizando NaOH 3 M. El medio se distribuyó en lotes de 50 ml en matraces Erlenmayer de 250 ml. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min. Después de enfriar, cada matraz se inoculó utilizando 0,5 ml de suspensión de esporas mencionada anteriormente. Para cada concentración, se realizaron cultivos paralelos. Los cultivos se incubaron con agitación a 160 rpm a 28 °C durante 5 días. El crecimiento se observó diariamente con un microscopio, y al final del cultivo se determinaron los contenidos de biomasa y lípidos.

El contenido de biomasa se determinó mediante la filtración al vacío de todo el contenido del matraz y el lavado de la biomasa con 50 ml de agua destilada. Después de esto, las tortas de biomasa se congelaron y se secaron durante la noche en un secador por congelación. A partir de la biomasa seca, se analizó el contenido de lípidos de acuerdo con Suutari et al. (1990). Los lípidos en las muestras primero se hidrolizaron en ácidos grasos libres, que se saponificaron en sales de sodio de los mismos y luego se metilaron en ésteres metílicos. Los ésteres metílicos grasos se analizaron mediante cromatografía gaseosa.

Resultados: En todos los matraces, independientemente de la concentración de ácido, el crecimiento comenzó casi al mismo tiempo. Las concentraciones de biomasa y lípidos también fueron muy similares. Sobre la base de estos resultados, se podría afirmar que los ácidos analizados, separados o en conjunto, no tuvieron ningún efecto sobre el crecimiento de hongos o la producción de lípidos. Las concentraciones de biomasa y lípidos se presentan en la tabla 2.

Tabla 2: Concentraciones de biomasa y contenido de lípidos en diferentes concentraciones de ácido.

Concentración de ácido acético g/l	Concentración de biomasa g/l	Contenido de lípidos (% del peso seco celular)
0	12,4	20,1
1	12,4	19,8
3	11,4	20,7
5	11,1	21,2
7	11,5	24,3

Concentración de ácido fórmico (g/l)	Concentración de biomasa g/l	Contenido de lípidos (% del peso seco celular)
0	12,9	18,9
1	12,5	19,5
3	12,0	19,5
5	11,2	15,9
7	10,9	19,8

Concentración tanto de ácido acético como fórmico (g/l)	Concentración de biomasa g/l	Contenido de lípidos (% del peso seco celular)
0	12,9	18,9
1	12,4	20,3
3	11,6	18,1
5	11,0	22,0
7	10,4	17,4
9	9,5	15,9

Ejemplo 2 - El efecto inhibitor de los compuestos fenólicos

5 Los experimentos se realizaron utilizando cepas de hongos y levaduras *Aspergillus oryzae*, *Mortierella isabellina* y *Lipomyces starkeyi*. Se analizaron dos hidrolizados lignocelulósicos diferentes del tratamiento de autohidrólisis de lignocelulosa que contenían azúcares hemicelulósicos y cantidades notables de compuestos fenólicos, líquido A de autohidrólisis y líquido B de autohidrólisis. Los compuestos fenólicos se determinaron de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu con ácido gálico como estándar (Waterhouse, 2002).

15 A partir del hongo esporulante que creció en placas de PDA, se realizó una suspensión de esporas mediante la adición de 12 ml de agua estéril y las esporas se rasparon con un bucle de inoculación al líquido. La suspensión de esporas se utilizó para la inoculación de medios.

Los componentes base del medio se presentan en la tabla 3. Todos ellos contenían estos nutrientes básicos y una pequeña cantidad de celulosa fina para evitar que los hongos se agrupen.

Tabla 3: Composición del medio de crecimiento

	g/l
glucosa	20
Extracto de malta	30
peptona	3

20 El medio se hizo utilizando agua del grifo.

25 El líquido A o B de autohidrólisis se agregó para que la concentración de compuestos fenólicos fuera de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 g/l. Después de esto, el pH del medio se ajustó a 6,5 utilizando NaOH 3 M. El medio se distribuyó en lotes de 50 ml en matraces Erlenmayer de 250 ml. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min. Después de enfriar, cada matraz se inoculó utilizando 0,5 ml de suspensión de esporas mencionada anteriormente en el caso de los hongos, y con la levadura se utilizó la suspensión de levadura precultivada. Para cada concentración, se realizaron cultivos paralelos. Los cultivos de hongos se incubaron con agitación a 160 rpm y las levaduras a 160 rpm, todos a 28 °C durante 5 días. El crecimiento se observó dos veces al día con un microscopio, y al final del cultivo se determinaron los contenidos de biomasa.

35 El contenido de biomasa fúngica se determinó mediante la filtración al vacío de todo el contenido del matraz y el lavado de la biomasa con 50 ml de agua destilada. Después de esto, las tortas de biomasa se congelaron y se secaron durante la noche en un secador por congelación y se determinó el contenido de biomasa.

40 El contenido de biomasa de levadura se determinó mediante la medición en tubos pre-ponderados de 7 ml de suspensión de crecimiento de prueba, muestras paralelas de cada matraz. Las muestras se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos, después de lo cual se eliminó el sobrenadante, se agregaron 7 ml de agua destilada, el contenido del tubo se mezcló bien y se repitió la centrifugación. Luego se eliminó el agua de lavado y se congelaron tanto los gránulos de biomasa como los sobrenadantes. Posteriormente, las muestras de biomasa se liofilizaron y se

determinó el contenido de biomasa.

Resultados:

- 5 Mediante las observaciones microscópicas se pudo ver que cuando la concentración fenólica aumentaba, el tiempo necesario para que comenzara el crecimiento creció un poco más con algunos microbios. Los cultivos se controlaron dos veces en un día, por lo que no es posible determinar el momento exacto en que comenzó el crecimiento, pero se pueden hacer estimaciones aproximadas. Con la levadura *L. starkeyi* y el hongo *A. oryzae* no hubo un retraso notable en ninguna de las concentraciones fenólicas analizadas, y todas crecían después de un día de incubación.
- 10 El hongo *M. isabellina*, por otro lado, comenzó el crecimiento más lentamente cuando la concentración fenólica aumentó por encima de 4 g/l.

- 15 *A. oryzae* podría crecer incluso en la concentración fenólica más alta probada: 7 g/l, pero el contenido de biomasa disminuyó cuando la concentración fenólica creció más. *L. starkeyi* y *M. isabellina* podrían crecer hasta una concentración de 6 g/l, en 7 g/l no se detectó crecimiento. De manera similar a *A. oryzae*, el contenido de biomasa disminuyó cuando la concentración fenólica creció más. No se detectaron diferencias entre los diferentes hidrolizados de la inhibición de la autohidrólisis. En la siguiente tabla, se proporciona el contenido de biomasa para los microbios analizados en diversas concentraciones fenólicas.

20 Tabla 4: Contenido de biomasa para los microbios analizados en diferentes concentraciones fenólicas.

Microbio	Líquido de autohidrólisis	Concentración fenólica (g/l)	Concentración de biomasa (g/l)
<i>Mortierella isabellina</i>	A	0	12,4
<i>Mortierella isabellina</i>	A	1	10,7
<i>Mortierella isabellina</i>	A	2	10,4
<i>Mortierella isabellina</i>	A	3	7,4
<i>Mortierella isabellina</i>	A	4	5,1
<i>Mortierella isabellina</i>	A	5	1,5
<i>Mortierella isabellina</i>	A	6	0
<i>Mortierella isabellina</i>	A	7	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	0	15,0
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	1	15,4
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	2	13,2
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	3	11,4
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	4	11,8
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	5	11,2
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	6	11,1
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	7	7,6
<i>Lipomyces starkeyi</i>	A	0	14,7
<i>Lipomyces starkeyi</i>	A	2	13,8
<i>Lipomyces starkeyi</i>	A	3	10,1
<i>Lipomyces starkeyi</i>	A	4	8,5
<i>Lipomyces starkeyi</i>	A	5	3,7
<i>Lipomyces starkeyi</i>	A	6	0,6
<i>Mortierella isabellina</i>	B	0	12,54
<i>Mortierella isabellina</i>	B	2	7,7709
<i>Mortierella isabellina</i>	B	3	6,4339
<i>Mortierella isabellina</i>	B	4	4,9039
<i>Mortierella isabellina</i>	B	5	3,8129
<i>Mortierella isabellina</i>	B	6	0,6259
<i>Mortierella isabellina</i>	B	7	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	B	0	14,9

(continuación)

Microbio	Líquido de autohidrólisis	Concentración fenólica (g/l)	Concentración de biomasa (g/l)
<i>Aspergillus oryzae</i>	B	3	9,5
<i>Aspergillus oryzae</i>	B	4	8,0
<i>Aspergillus oryzae</i>	B	5	6,8
<i>Aspergillus oryzae</i>	B	6	6,8
<i>Aspergillus oryzae</i>	B	7	5,3
<i>Lipomyces starkeyi</i>	B	0	14,7
<i>Lipomyces starkeyi</i>	B	2	10,4
<i>Lipomyces starkeyi</i>	B	4	6,5
<i>Lipomyces starkeyi</i>	B	5	5,6
<i>Lipomyces starkeyi</i>	B	6	3,3

Ejemplo 3 - Crecimiento de hongos y producción de lípidos en azúcares de hidrolizado de celulosa y hemicelulosa de paja de trigo

- 5 Los experimentos se realizaron utilizando una cepa fúngica *A. oryzae* productora de lípidos. A partir del hongo esporulante que creció en placas de PDA, se realizó una suspensión de esporas mediante la adición de 12 ml de agua estéril y las esporas se rasparon con un bucle de inoculación al líquido. Se utilizaron directamente 24 ml de la suspensión de esporas para la inoculación del fermentador. La composición del medio se presenta en la tabla 5. Se utilizó en el cultivo líquido C de autohidrólisis purificado (solución de hemicelulosa) y el hidrolizado de celulosa del mismo experimento. El cultivo se realizó en Biostat B más 5 l de fermentador en un volumen de 3 l, y se ajustó durante este tiempo la agitación a 500 rpm, el pH se mantuvo en 5,5 con NaOH 3 M, la aireación fue de 1 vvm y la temperatura a 35 °C durante el crecimiento, en la producción de lípidos, se redujo a 28 °C.

Tabla 5: Composición del medio de crecimiento

Componentes del medio	Concentración (g/l)
Azúcares hemicelulósicos	20
Extracto de levadura	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5
MgCl * 6 H ₂ O	1,5
K ₂ HPO ₄	0,8
KH ₂ PO ₄	1,5
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,3

- 15 Después de la inoculación, pasaron aproximadamente 30 horas antes de que el hongo comenzara a crecer activamente. Durante el cultivo, la solución de hemicelulosa se añadió en pequeños lotes y, después de 95 horas de cultivo, las alimentaciones se cambiaron a hidrolizado celulósico. Durante el cultivo, en total se agregaron 236 g de hemicelulosa y 484 g de hidrolizado de celulosa. Parte de los azúcares añadidos se dejó sin utilizar al final de la fermentación. Después de 167 h, cuando terminó el cultivo, había 16 g/l de biomasa, de los cuales el 43 % eran lípidos (Figura 1). Se pudo concluir que la producción de aceite microbiano a partir de azúcares de celulosa y hemicelulosa de paja de trigo fue exitosa. Al comienzo de la fermentación, la concentración fenólica era de 4 g/l, y al final de 6 g/l (un cálculo basado en la cantidad original de hemicelulosa). Por lo tanto, también podría afirmarse que el crecimiento de hongos y la producción eficaz de lípidos se lograron a pesar de las altas concentraciones de inhibidores.

Ejemplo 4 - El crecimiento de bacterias contaminantes en una solución hemicelulósica que contiene compuestos fenólicos

- 30 Los experimentos se realizaron con las bacterias *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*. Los componentes base del medio se presentan en la tabla 6. Todos ellos contenían estos nutrientes básicos y solución de hemicelulosa que contenía compuestos fenólicos, de modo que la concentración final de compuestos fenólicos era de 0, 1, 2 y 3 g/l. El líquido C de autohidrólisis (solución de hemicelulosa) se utilizó en el cultivo y contenía 160 g/l de azúcares basados en el análisis de HPLC, DW 460 g/l y 33 g/l de compuestos fenólicos basados en el análisis con el método Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002).

Tabla 6: Composición del medio de crecimiento

	g/l
glucosa	20
Extracto de malta	30
peptona	3

El medio se hizo utilizando agua del grifo.

5 El líquido C de autohidrólisis (solución de hemicelulosa) se agregó para que la concentración de compuestos fenólicos fuera de 0, 1, 2 y 3 g/l. Después de esto, el pH del medio se ajustó a 6,5 utilizando NaOH 3 M. El medio se distribuyó en lotes de 50 ml en matraces Erlenmayer de 250 ml. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min. Después de enfriar, cada matraz se inoculó utilizando 0,5 ml de suspensión de bacterias precultivadas. Para cada concentración, se realizaron cultivos paralelos. Los cultivos se incubaron con agitación a 250 rpm, a 28 °C durante 5 días. El crecimiento se observó diariamente con un microscopio, y al final del cultivo se determinaron los contenidos de glucosa. Las muestras de concentración de azúcar se realizaron mediante centrifugación de la biomasa, diluyendo el sobrenadante en 10 con agua destilada y se realizó un análisis de HPLC.

Resultados:

15 Basándose en las observaciones del microscopio, se pudo ver que ambas bacterias crecieron solo en los matraces que no contenían compuestos fenólicos. Al final del cultivo, solo en los matraces que no contenían compuestos fenólicos, se consumieron todos los azúcares. En los matraces que contenían compuestos fenólicos, estaba presente la misma cantidad de azúcares que al principio. Se podría concluir que incluso en pequeñas concentraciones, los compuestos fenólicos inhiben eficazmente el crecimiento de muchas bacterias contaminantes. 20 Se puede concluir que el crecimiento de bacterias contaminantes se puede inhibir o prevenir mediante el uso de hidrolizados lignocelulósicos que contienen compuestos inhibidores, tales como compuestos fenólicos, en concentraciones que no inhiben significativamente el crecimiento de levaduras oleaginosas y hongos filamentosos (ejemplos 2, 3 y 6).

25 **Ejemplo 5 - Control de las contaminaciones con la ayuda de compuestos fenólicos y tratamiento de calor rápido**

Los experimentos se realizaron utilizando una cepa fúngica *A. oryzae* productora de lípidos. A partir del hongo esporulante que creció en placas de PDA, se realizó una suspensión de esporas mediante la adición de 12 ml de agua estéril y las esporas se rasparon con un bucle de inoculación al líquido. Se utilizaron 0,5 ml de la suspensión de esporas para cada inoculación en matraz. La composición del medio se presenta en la tabla 9.

35 El líquido de autohidrólisis que contenía compuestos fenólicos, líquido A de autohidrólisis (solución de hemicelulosa), se agregó de modo que la concentración final en los medios fuera de 3,5 g/l. Después de esto, el pH del medio se ajustó a 6,5 utilizando NaOH 3 M. El medio se distribuyó en lotes de 50 ml en matraces Erlenmayer de 250 ml. El extracto de levadura en el presente documento se utilizó como fuente para los microbios contaminantes habituales.

Tabla 9: Composición del medio de crecimiento

	g/l
Glucosa	40
Fenólicos	3,5
Extracto de levadura	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,0
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1,0
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,2

40 La mitad de los medios preparados de esta manera se calentaron rápidamente a 80 °C y luego se enfriaron. Para el resto de los medios, no se realizó tratamiento térmico. La mitad de los matraces tratados de manera diferente se inocularon con 0,5 ml de suspensión de esporas de *A. oryzae*. La otra mitad de los matraces se dejaron sin inocular. Asimismo, se hicieron dos matraces del medio descrito anteriormente sin adición de compuestos fenólicos. Se trató térmicamente a 80 °C y se inoculó como otros cultivos. Todos los cultivos se incubaron a 28 °C y con agitación a 160 rpm durante 7 días. El crecimiento microbiano se verificó diariamente con microscopio.

Resultados:

Después de 1 día de incubación, se observó que el hongo creció en todos los medios que se inocularon con la suspensión de esporas. En los matraces que no se trataron térmicamente con esporas y no contenían compuestos fenólicos, había una cantidad notable de diferentes bacterias y levaduras contaminantes. Ninguno de los medios que contenían compuestos fenólicos estaba contaminado. Después de 2 días de incubación en los matraces que no fueron inoculados ni tratados con calor, la levadura contaminante comenzó a crecer. Al final de los cultivos, el hongo creció bien en todos los matraces que se inocularon con esporas. No se detectaron microbios contaminantes entre ellos. En los matraces no inoculados y que no fueron tratados térmicamente, también se detectó una contaminación bacteriana además de las levaduras mencionadas anteriormente. Contrariamente a esto, los matraces que no contenían inóculos pero que se trataron con calor permanecieron libres de crecimiento hasta el final de los experimentos.

Basándose en estos resultados, el tratamiento térmico a 80 °C junto con la adición de compuestos fenólicos parecería poder mantener los cultivos a base de hemicelulosa libres de los microbios contaminantes más comunes. Por otro lado, se debe tener en cuenta que, sin compuestos fenólicos, el medio de crecimiento sin tratamiento térmico se contamina fácilmente, por lo que, desde el punto de vista de la higiene, ambas operaciones requieren la adición de compuestos fenólicos y un ligero tratamiento de calor.

Ejemplo 6 - Producir aceite microbiano en azúcares hemicelulósicos

Los experimentos se realizaron utilizando una cepa fúngica *A. oryzae* productora de lípidos. A partir del hongo esporulante que creció en placas de PDA, se realizó una suspensión de esporas mediante la adición de 12 ml de agua estéril y las esporas se rasparon con un bucle de inoculación al líquido. Se utilizaron 24 ml de la suspensión de esporas para la inoculación de 6 matraces. La composición del medio se presenta en la tabla 10. Los matraces inoculados se incubaron a 30 °C con agitación a 160 rpm durante 1 día, y luego se utilizaron para la inoculación del fermentador.

Tabla 10: Composición del medio de inoculación, pH ajustado a 5,5.

	g/l
Azúcares hemicelulósicos	40
Extracto de levadura	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,2

Se utilizó el líquido D de autohidrólisis (que contenía azúcares hemicelulósicos parcialmente en forma oligomérica) y contenía 4,2 g/l de compuestos fenólicos según el análisis con el método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002). El cultivo se realizó en Biostat B más 5 l de fermentador en un volumen de 3 l, y se ajustó durante este tiempo la agitación a 400 rpm, el pH se mantuvo en 5,5 con NaOH 3 M, la aireación fue de 1 vvm y la temperatura 30 °C. La composición del medio se presenta en la tabla 11.

Tabla 11: La composición del medio de fermentación

Componentes del medio	Concentración (g/l)
Azúcares hemicelulósicos	60
Extracto de levadura	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
MgCl * 6 H ₂ O	1,0
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1,0
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,2

Resultados:

Durante el cultivo, se añadió la solución hemicelulósica en pequeños lotes. En total se añadieron 150 g de hemicelulosa. Parte de los azúcares añadidos se dejó sin utilizar al final de la fermentación. Después de 142 h, cuando terminó el cultivo, había 14 g/l de biomasa, de los cuales el 21 % eran lípidos. Se pudo concluir que la producción de aceite microbiano a partir de azúcares hemicelulósicos de trigo (parcialmente en forma oligomérica) fue exitosa. En la fermentación, la concentración de compuestos fenólicos fue de 2,8 g/l. Por lo tanto, también podría

afirmarse que el crecimiento de hongos y la producción de lípidos fueron posibles a pesar de las altas concentraciones de inhibidores.

Ejemplo 7 - Efecto del furfural sobre el crecimiento microbiano

5

Condiciones de cultivo

Se cultivaron dos cepas de hongos *Aspergillus oryzae* TKK-4 y *Mortierella isabellina* TKK-1 y una cepa de levadura *Lipomyces starkeyi* TKK-1 en matraces en un medio estándar (Tabla 12) con adición de furfural. Los microorganismos se cultivaron durante 6 días a 28 °C con 160 rpm (para hongos) y 250 rpm (para levaduras). Se agregó celulosa para ayudar al hongo a crecer con una mejor morfología. Se añadió furfural en diferentes cantidades en el medio (0-4 g/l) y se observó el crecimiento de los microorganismos.

10

Tabla 12. Componentes del medio.

Componente del medio	g/l
Extracto de malta	30
Peptona	3
Dextrosa monohidrato	20
Celulosa	2

15

Resultados

Después de una semana, *A. oryzae* TKK-4 creció en 0,5 g/l de furfural, pero concentraciones más altas ($\geq 0,75$ g/l) inhibieron completamente el crecimiento. *M. isabellina* TKK-1 no creció en ≥ 1 g/l de furfural, pero después de 4-6 días se observó algún crecimiento en 0,8 g/l. *L. starkeyi* TKK-1 fue más tolerante con el furfural. Creció en 1,2 g/l de furfural después de unos días. La concentración de inhibidores fue $\geq 1,8$ g/l. La tabla 13 muestra las concentraciones de peso seco para los cultivos en matraces con la concentración de furfural de 0 - 1,2 g/l.

20

Tabla 13. La concentración de peso seco medida después de 6 días de cultivo en los hongos *A. oryzae* TKK-4 y *M. isabellina* TKK-1 y la levadura *L. starkeyi* TKK-1, cuando la concentración de furfural fue de 0-1,2 g/l.

25

	<i>A. oryzae</i> TKK-4	<i>M. isabellina</i> TKK-1	<i>L. starkeyi</i> TKK-1
Furfural (g/l)	DW (g/l)		
0	18,02	16,17	14,46
0,1	18,18		
0,2	16,54	7,02	
0,3	13,53		
0,4	11,58	13,80	
0,6		14,96	14,79
0,8		9,28	
1,2			14,39

Ejemplo 8 - Autohidrólisis (con pH pre-ajustado) de paja de trigo

Se preparó una suspensión mediante la mezcla de 20 g de paja de trigo previamente molida para pasar una malla de 1 mm y 180 g de agua. La suspensión se ajustó con ácido acético a pH 4,5. La suspensión se transfirió a un reactor autoclave que luego se calentó de forma no isotérmica con una camisa de calentamiento a una temperatura entre 170 °C y 200 °C con agitación continua. Los datos de temperatura durante el calentamiento se registraron y se utilizaron para calcular la gravedad de la autohidrólisis. El reactor se enfrió a aproximadamente 50 °C y la suspensión se recuperó manualmente para la filtración. La fracción líquida se separó de la fracción sólida y se midieron el furfural y el hidroximetilfurfural (HMF) en la fracción líquida utilizando HPLC. La concentración total de azúcar (g/l) en la fracción líquida se determinó después de una hidrólisis ácida diluida que convierte los azúcares oligoméricos y polímeros en monosacáridos. La fracción sólida se lavó con agua (0,5 dm³) y se prensó.

30

35

El residuo sólido obtenido se pesó, se tomó una muestra para determinar la materia seca y se calculó el rendimiento del residuo sólido (%) como la relación en peso del residuo sólido a la paja de trigo pesada al tratamiento de autohidrólisis (100 %*g de paja de trigo seco/g de residuo sólido seco). Las sustancias fenólicas solubles en el líquido se determinaron utilizando el método de Folin-ciocalteu con guayacol como estándar.

40

Los resultados mostrados en la Figura 2 y la Figura 3 resumen los resultados. El rendimiento del residuo sólido

- disminuyó con la gravedad de la autohidrólisis con un rendimiento del 67 % en la gravedad más alta (Log (R0) = 4,4) (Fig. 2). La concentración de azúcares de monosacáridos en la fracción líquida primero aumentó y luego disminuyó al aumentar la gravedad de la autohidrólisis. La concentración máxima de azúcar (23,1 g/l) se obtuvo cuando la gravedad de la autohidrólisis fue Log (R0) = 3,8. Más allá de esta gravedad de autohidrólisis, la concentración de azúcar en la fracción líquida disminuyó drásticamente y la concentración de furfural y HMF aumentó repentinamente, alcanzando una concentración de 4,8 g/l y 0,3 g/l, respectivamente. En contraste con la generación repentina de furfural y HMF, la concentración de compuestos fenólicos solubles aumentó progresivamente desde 0,5 g/l hasta 2,0 g/l con el aumento de la gravedad de la autohidrólisis.
- 10 Este ejemplo muestra que las condiciones óptimas de autohidrólisis en términos de gravedad de autohidrólisis (Log (R0)) se pueden seleccionar para evitar la formación excesiva de furfural, HMF y compuestos fenólicos solubles mientras se maximiza la concentración de monosacáridos en la fracción líquida.

Referencias

- 15 Suutari, M., Liukkonen, K. ja Laakso, S., Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids, J. Gen. Microbiol. 136 (1990) 1496-1474.
- 20 Waterhouse AL. 2002. Determination of total phenolics. En: Wrolstad RE, Acree TE, An H, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Sporns P, editores. Current protocols in food analytical chemistry. 1ª ed. Nueva York: John Wiley & Sons, Inc. p I1.1.1-I1.1.8.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir lípidos, que comprende las siguientes etapas

- 5 (i) proporcionar un medio de cultivo que comprende un hidrolizado lignocelulósico,
 (ii) proporcionar un caldo de fermentación mediante la inoculación del medio de cultivo de (i) con un primer
 microbio, donde dicho primer microbio es un microbio oleaginoso, que es capaz de acumular lípidos
 intercelulares de tal manera que los lípidos acumulan al menos el 15 % (p/p) de la biomasa total (por peso seco
 celular) del microbio cuando se cultiva en condiciones adecuadas,
 10 (iii) incubar dicho medio inoculado con dicho primer microbio en condiciones aeróbicas que permiten que se
 acumulen los lípidos,

en donde dicho caldo de fermentación comprende al menos un inhibidor del crecimiento microbiano seleccionado del
 grupo que consiste en compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, furfural e hidroximetilfurfural, y

- 15 en donde dicho caldo de fermentación además comprende un segundo microbio no oleaginoso, cuya capacidad para
 acumular lípidos intercelulares es inferior al 15 % (p/p) de la biomasa total (por peso seco celular) cuando se cultiva
 en condiciones adecuadas, en donde dicho al menos un inhibidor del crecimiento microbiano está presente en dicho
 caldo de fermentación a una concentración dentro del intervalo que permite que el primer microbio prolifere y/o
 produzca aceite e inhiba la proliferación de dicho segundo microbio en al menos un 20 %, y
 20 en donde la presencia del inhibidor del crecimiento microbiano inhibe la proliferación de dicho segundo microbio y
 favorece la proliferación de dicho primer microbio sobre dicho segundo microbio.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho segundo microbio está presente en el medio de
 cultivo proporcionado en la etapa (i) o contamina el caldo de fermentación en las etapas (ii) o (iii).

- 25 3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una etapa de
 añadir dicho al menos un inhibidor del crecimiento microbiano o ajustar la concentración de dicho al menos un
 inhibidor del crecimiento microbiano en el caldo de fermentación.

- 30 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que al menos un inhibidor del
 crecimiento microbiano es el grupo de compuestos fenólicos medidos como concentración de fenoles totales por
 volumen de caldo de fermentación.

- 35 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la concentración de dichos compuestos fenólicos en dicho
 caldo de fermentación es al menos 1 g/l.

6. El método de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, en el que la concentración de dichos compuestos fenólicos
 en dicho caldo de fermentación está en el intervalo de 1 g/l a 7 g/l.

- 40 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la concentración de dichos
 compuestos fenólicos en dicho caldo de fermentación está dentro del intervalo de 1 g/l a 5 g/l, preferentemente,
 dentro del intervalo de 1 g/l a 3 g/l.

- 45 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho primer microbio se
 selecciona de hongos filamentosos, levaduras, bacterias o algas.

9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho primer microbio se
 selecciona de *Mortierella*, *Aspergillus*, *Lipomyces*, *Rhodospiridium* o *Cryptococcus*.

- 50 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que dicho segundo microbio no es
 oleaginoso y está seleccionado de bacterias, levaduras, hongos filamentosos o microalgas.

11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que dicho segundo microbio es
 una bacteria seleccionada de *Bacillus* spp. o *Pseudomonas* spp.

55

Figura 1

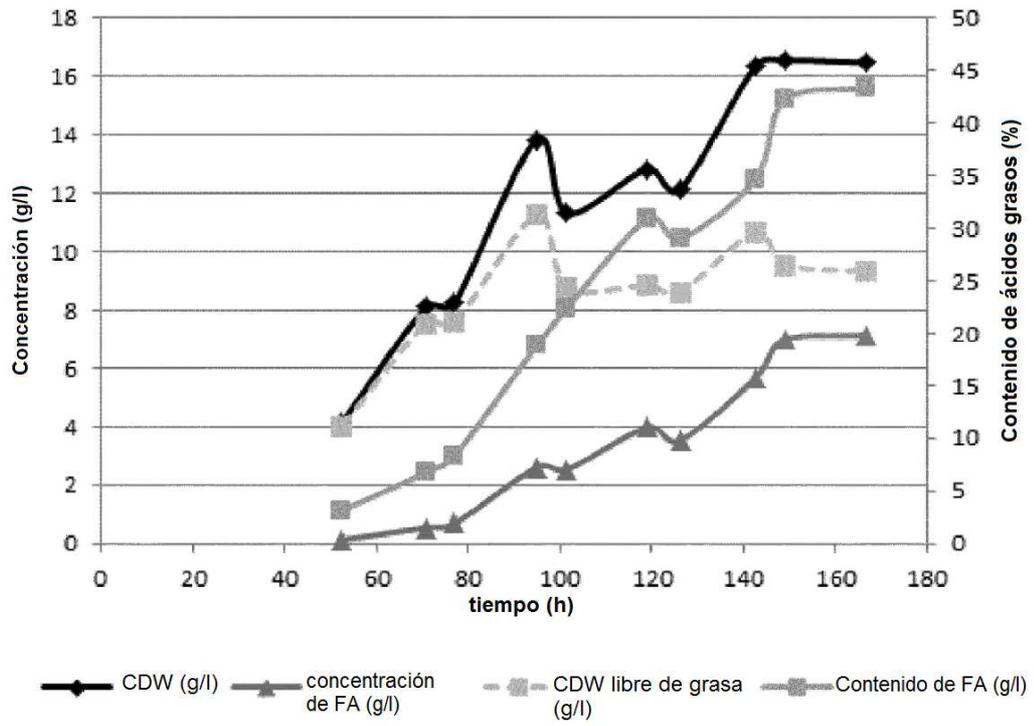


Figura 2

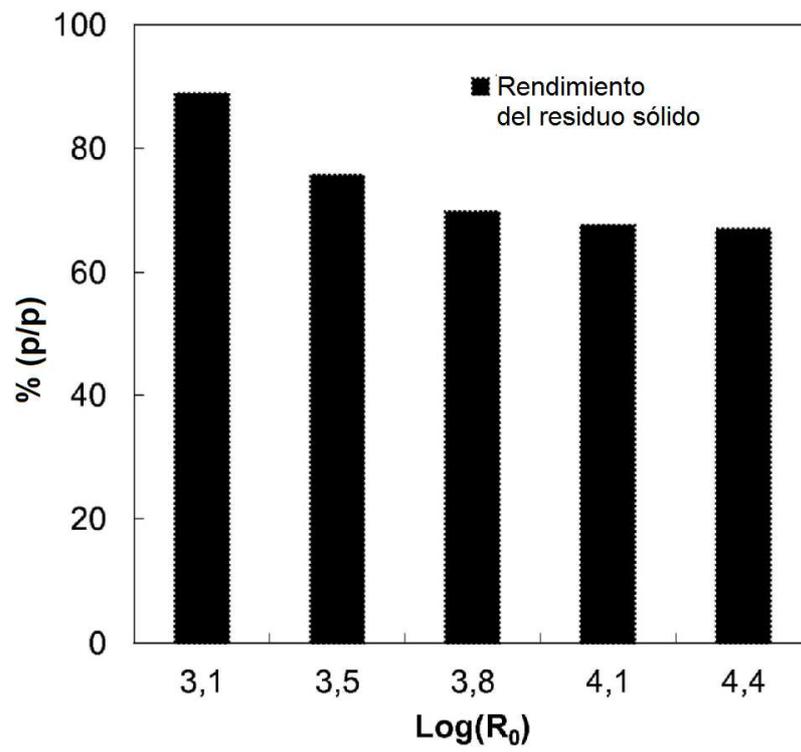


Figura 3

