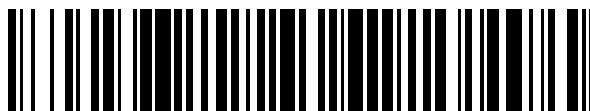


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 789 328**

51 Int. Cl.:

**C12P 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2016** **E 16425016 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020** **EP 3208340**

54 Título: **Proceso para la propagación de una levadura capaz de fermentar glucosa y xilosa**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.10.2020**

73 Titular/es:  
**VERSALIS S.P.A. (100.0%)**  
**Piazza Boldrini, 1**  
**20097 San Donato Milanese (MI), IT**

72 Inventor/es:  
**SABBATINI, FABIO**

74 Agente/Representante:  
**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 789 328 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Proceso para la propagación de una levadura capaz de fermentar glucosa y xilosa

## 5 Antecedentes

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

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

Un primer inconveniente en la conversión de un hidrolizado de materia prima lignocelulósica por medio de una levadura es la presencia de azúcares monoméricos C5, principalmente xilosa. Se sabe que la xilosa es difícil o imposible de convertir mediante enzimas y levaduras naturales, y se han diseñado cócteles enzimáticos y levaduras genéticamente modificados especiales para convertir la porción hemicelulósica. Incluso con levaduras genéticamente modificadas para ser capaces de fermentar glucosa y xilosa, la conversión de xilosa es lenta.

Un segundo inconveniente en la conversión de un hidrolizado de materia prima lignocelulósica por medio de una levadura es la baja concentración de azúcar de un hidrolizado de materia prima lignocelulósica, que es típicamente menos de 100 g de azúcares totales por kg de hidrolizado en forma húmeda. A bajas concentraciones de azúcar, la tasa de consumo de azúcar por parte de la levadura es lenta y, por lo tanto, facilita la propagación de contaminantes biológicos, tales como las bacterias, que consumen una porción relevante de los azúcares disponibles para producir bioproductos no deseados, tales como los ácidos lácticos. El problema se ve reforzado por la tasa de conversión lenta de xilosa por la levadura. De este modo, a menudo se practica la esterilización del hidrolizado de materia prima lignocelulósica por medio de agentes químicos o bioquímicos, tales como antibióticos, o por medio de agentes físicos, tales como calor o luz, aumentando los costes totales.

Un tercer inconveniente en la conversión de un hidrolizado de materia prima lignocelulósica por medio de una levadura es la presencia de compuestos inhibidores en el hidrolizado. Los compuestos como el ácido acético, el ácido fórmico, el furfural, que se producen típicamente en el pretratamiento o la hidrolización de la materia prima lignocelulósica, reducen la capacidad de la levadura para consumir azúcares, o al menos la tasa de consumo. A menudo se practica la eliminación de compuestos inhibidores en varias etapas posteriores a la conversión por la levadura, lo que nuevamente aumenta los costes totales.

Un cuarto inconveniente en la conversión de un hidrolizado de materia prima lignocelulósica por medio de una levadura, que típicamente requiere agitar el hidrolizado, es que el hidrolizado de materia prima lignocelulósica a menudo se produce en forma de suspensión, por lo que es difícil y costoso su agitación. La suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica puede separarse en un componente líquido que comprende agua y azúcares solubles en agua, y un componente sólido que comprende materia prima lignocelulósica pretratada insoluble en agua, aumentando nuevamente los costes del proceso.

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

El documento WO2009155633A1 divulga el uso de un sustrato que comprende un material que contiene compuestos C5, en el crecimiento de levadura *Saccharomyces* o la producción de un producto de levadura *Saccharomyces*, en el que el material que contiene compuestos C5 es: (a) material que contiene compuestos C5 obtenido a partir de hidrolizado lignocelulósico; (b) material que contiene compuestos C5 obtenido de la fermentación de hidrolizado lignocelulósico; o (c) una mezcla de (a) y (b). La solicitud de patente también divulga un método para producir biomasa

de levadura *Saccharomyces* o un producto de levadura *Saccharomyces* usando el sustrato, comprendiendo el método incubar un sustrato que comprende un material que contiene compuestos C5 con una levadura *Saccharomyces* en condiciones que causan el crecimiento de la levadura *Saccharomyces* o la producción del producto. Por lo tanto, la solicitud de patente no dice nada sobre problemas específicos y soluciones relacionadas involucradas en la propagación de levadura en un hidrolizado lignocelulósico.

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

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

Elia Tomás-Pejó y Lisbeth Olsson "Influence of the propagation strategy for obtaining robust *Saccharomyces cerevisiae* cells that efficiently co-ferment xylose and glucose in lignocellulosic biomass hydrolysates" *Microbial Biotechnology* volumen 8, 2015, páginas 999-1005, revelan que la adición de hidrolizado lignocelulósico durante la propagación de las células las adaptan a los inhibidores, dando como resultado células más tolerantes con fases de retraso más cortas y tasas de crecimiento específicas más altas en medio mínimo que contiene ácido acético y vainillina que las células no adaptadas.

Por lo tanto, existe la necesidad de un proceso para propagar una levadura en un hidrolizado de materia prima lignocelulósica que pueda usarse a escala industrial. Se cree que el proceso divulgado supera los inconvenientes mencionados anteriormente al usar un hidrolizado de materia prima lignocelulósica, proporcionando una solución para propagar una levadura en un hidrolizado de materia prima lignocelulósica a escala industrial.

#### Resumen

Se divulga un proceso para propagar una levadura capaz de fermentar glucosa y xilosa de un hidrolizado de materia prima lignocelulósica, comprendiendo dicho proceso propagar la levadura durante al menos un primer y segundo ciclo de propagación. El primer ciclo de propagación ( $P_n$ , donde  $n = 1$ ) comprende las etapas de: poner en contacto la levadura a una densidad inicial de levadura con un primer medio de cultivo que comprende una primera porción del hidrolizado de materia prima lignocelulósica; y permitir que la levadura se propague para crear un primer caldo poblado que comprende agua y una primera levadura propagada, en el que al menos el 50% de la glucosa y menos del 20% de la xilosa en el primer medio de cultivo se consumen en el primer ciclo de propagación. El segundo ciclo ( $P_2$ ,  $n = 2$ ) comprende las etapas de: separar el primer caldo poblado en al menos una primera porción eliminada y una primera porción residual, en el que tanto la primera porción residual como la primera porción eliminada comprenden parte de la primera levadura propagada; poner en contacto la primera porción residual con un segundo medio de cultivo que comprende una segunda porción del hidrolizado de materia prima lignocelulósica; y permitir que la levadura se propague para crear un segundo caldo poblado que comprende agua y una segunda levadura propagada, en el que al menos el 50% de la glucosa y menos del 20% de la xilosa en el segundo medio de cultivo se consumen en el segundo ciclo de propagación.

El proceso divulgado puede comprender además ciclos de propagación posteriores  $P_n$ , en el que  $n$  es un número entero mayor que 2 y es uno (1) mayor que el número del ciclo del ciclo inmediatamente anterior ( $n-1$ ), comprendiendo cada ciclo de propagación  $P_n$  las etapas de: separar el caldo poblado del  $P_{n-1}$  en al menos una porción eliminada del  $P_{n-1}$  y una porción residual del  $P_{n-1}$ , en la que tanto la porción residual del  $P_{n-1}$  como la porción eliminada del  $P_{n-1}$  comprenden algo de la levadura propagada del  $P_{n-1}$ ; poner en contacto la porción residual del caldo poblado de al menos uno de los ciclos anteriores y un medio de cultivo del  $P_n$  que comprende una porción del  $P_n$  del hidrolizado de materia prima lignocelulósica; y permitir que la levadura se propague para crear un caldo poblado del  $P_n$ , en el que al

menos el 50% de la glucosa y menos del 20% de la xilosa en el medio de cultivo del  $P_n$  se consumen en el ciclo de propagación  $P_n$ .

5 También se divulga que la etapa de permitir que la levadura se propague en los ciclos de propagación  $P_n$  puede realizarse en modo discontinuo, en el que  $n$  es un número entero igual o mayor que 1.

Se divulga además que la densidad de la levadura inicial en el primer ciclo de propagación puede estar en el intervalo de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  células de levadura por miligramo del primer medio de cultivo en base húmeda.

10 También se divulga que en la cantidad de porción eliminada del  $P_{n-1}$  y la cantidad de la porción del  $P_n$  del hidrolizado de materia prima lignocelulósica se puede seleccionar para que tenga una densidad inicial de levadura en el ciclo de propagación  $P_n$  en el intervalo de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  células de levadura por miligramo del medio de cultivo del  $P_n$  en base húmeda, en el que  $n$  es un número entero mayor que 1.

15 Se divulga además que la densidad inicial de levadura en el ciclo de propagación  $P_n$ , en el que  $n$  es un número entero mayor que 1, puede ser mayor que la densidad inicial de levadura en el primer ciclo de propagación.

20 También se divulga que la densidad final de levadura en el ciclo de propagación  $P_n$  puede estar en el intervalo de  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^9$  células de levadura por miligramo del caldo poblado del  $P_n$  en base húmeda, en el que  $n$  es un número entero igual o mayor que 1.

Se divulga además que el tiempo de propagación del primer ciclo de propagación puede ser menor que un valor seleccionado del grupo que consiste en 30 horas, 25 horas y 20 horas.

25 También se divulga que el tiempo de propagación del ciclo de propagación  $P_n$  puede ser menor que un valor porcentual seleccionado del grupo que consiste en 70%, 50% y 40% del primer tiempo de propagación, en el que  $n$  es un número entero mayor que 1.

30 Se divulga además que el medio de cultivo puede comprender además una fuente de nitrógeno.

También se divulga que no se pueden añadir vitaminas y/u oligoelementos al proceso.

35 Se divulga además que el hidrolizado de materia prima lignocelulósica puede contener contaminantes biológicos, y la densidad de contaminantes biológicos en el medio de cultivo del  $P_n$  inicial puede estar en un intervalo seleccionado del grupo que consiste en  $10^0$  UFC/mL a  $10^6$  UFC/mL, de  $10^1$  UFC/mL a  $10^5$  UFC/mL, y  $10^2$  UFC/mL a  $10^3$  UFC/mL del medio de cultivo del  $P_n$  inicial, en el que  $n$  es un número entero igual o mayor que 1.

También se divulga que el hidrolizado de materia prima lignocelulósica no puede someterse a ninguna esterilización.

40 Se divulga además que no se pueden añadir agentes antibacterianos al proceso.

También se divulga que el hidrolizado de materia prima lignocelulósica puede ser una suspensión que comprende materia prima lignocelulósica pretratada insoluble en agua.

45 Se divulga además que la materia seca del medio de cultivo del  $P_n$  puede ser inferior al 30% y mayor que un valor porcentual seleccionado del grupo que consiste en 5%, 10%, 15% y 20%, en el que  $n$  es un número entero igual o mayor que 1.

50 Se divulga también que todos los ciclos de propagación pueden realizarse en un recipiente de propagación único.

Se divulga además que el recipiente de propagación no puede someterse a ninguna esterilización y/o limpieza entre y/o durante los ciclos de propagación.

55 También se divulga que el proceso divulgado puede comprender además las etapas de: introducir una o más porciones eliminadas del  $P_n$  y un medio de fermentación que comprende una porción adicional del hidrolizado de materia prima lignocelulósica en al menos un recipiente de fermentación; permitiendo que la levadura fermente glucosa y xilosa para crear un caldo de fermentación, que comprende un producto de fermentación, en el que  $n$  es un número entero igual o mayor que 1.

60 Descripción detallada

65 Se divulga un proceso de múltiples etapas para propagar secuencialmente una levadura en dos o más ciclos de propagación en medios de cultivo respectivos, cada uno de los cuales comprende una porción de un hidrolizado de materia prima lignocelulósica, como se define en las reivindicaciones. La levadura es capaz de fermentar azúcares monoméricos de glucosa y xilosa, que son los dos componentes principales del azúcar del hidrolizado de materia prima lignocelulósica.

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

5 De acuerdo con otro aspecto, el proceso divulgado permite producir la levadura necesaria en una siguiente etapa de fermentación a partir de una pequeña cantidad de levadura, reduciendo así sensiblemente los costes de fermentación. De acuerdo con otro aspecto, en el proceso divulgado, la propagación de la levadura se produce en un hidrolizado de materia prima lignocelulósica ya disponible en la planta de conversión, evitando o reduciendo en gran medida los costes asociados a las costosas fuentes de carbono.

10 De acuerdo con un aspecto adicional, el proceso divulgado permite el uso de un hidrolizado de materia prima lignocelulósica que puede contener contaminantes biológicos a un nivel no despreciable, sin el uso de ningún agente o procedimiento de esterilización.

15 De acuerdo con un aspecto adicional, en el proceso divulgado la propagación de levadura puede ocurrir sin añadir vitaminas y otros nutrientes costosos.

De acuerdo con un aspecto adicional, en el proceso divulgado, la propagación de levadura se realiza durante un tiempo de propagación que es más corto que en los procesos divulgados en la técnica.

20 En el contexto de la presente divulgación, por "propagación de una levadura", o "crecimiento de levadura", o "producción de una levadura" se entiende el proceso de aumentar la cantidad de levadura, o biomasa de levadura, obtenida por alimentación de una cantidad inicial de levadura con una fuente de carbono y opcionalmente otros nutrientes en condiciones adecuadas. El aumento de la biomasa de levadura o la cantidad de levadura se produce al aumentar el número de células de levadura totalmente producidas, y se puede verificar determinando la densidad de las células al comienzo y al final de la etapa o etapas de propagación, o durante la etapa o etapas de propagación. La densidad celular puede determinarse contando las células de levadura presentes en muestras representativas del medio de cultivo en diferentes momentos de la etapa o etapas de propagación.

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

35 El término levadura "no natural" significa que el organismo microbiano tiene al menos una alteración genética que normalmente no se encuentra en una cepa natural de la especie referenciada, incluidas las cepas naturales de la especie referenciada, para producir la levadura natural capaz de fermentar glucosa y xilosa. Las alteraciones genéticas pueden incluir, por ejemplo, modificaciones que introducen ácidos nucleicos expresables que codifican polipéptidos metabólicos, otras adiciones de ácido nucleico, eliminaciones de ácido nucleico y/u otra alteración funcional del material genético de la levadura. Dichas modificaciones pueden incluir, por ejemplo, regiones de codificación y fragmentos funcionales de las mismas, para polipéptidos heterólogos, homólogos o tanto heterólogos como homólogos para las especies referenciadas. Las modificaciones adicionales pueden incluir, por ejemplo, regiones reguladoras no codificantes en las que las modificaciones alteran la expresión de un gen u operón.

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

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

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

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

En una realización, la materia prima lignocelulósica se somete a un proceso o etapa de remojo para eliminar una porción de compuestos no lignocelulósicos contenidos en la materia prima lignocelulósica cruda tal como sales inorgánicas, ceras y ácidos orgánicos antes de ser tratada hidrotérmicamente en el reactor presurizado. En la etapa o proceso de remojo, los contaminantes externos, como el suelo, las piedras y los residuos de la cosecha también pueden separarse. El proceso de remojo comprende preferiblemente introducir la materia prima lignocelulósica en un líquido de remojo que comprende agua a una temperatura de 20 °C a 100 °C, más preferiblemente de 40 °C y 70 °C y durante un tiempo de remojo de 30 segundos a 30 minutos, más preferiblemente de 3 minutos a 15 minutos.

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

La materia prima lignocelulósica pretratada se somete a hidrólisis enzimática para hidrolizar los azúcares poliméricos y oligoméricos a azúcares monoméricos, que comprenden glucosa y xilosa. La hidrólisis enzimática comprende poner en contacto la materia prima lignocelulósica pretratada en forma de suspensión con una enzima o composición enzimática en condiciones que promueven la actividad enzimática. De este modo, se proporciona una suspensión de la materia prima lignocelulósica pretratada mezclando la materia prima lignocelulósica pretratada con un líquido que comprende agua para tener una materia seca preferiblemente entre 10% y 25%; opcionalmente, cuando se practica el tratamiento hidrotérmico preliminar, también se puede usar al menos una porción del líquido que comprende agua y polímeros y oligómeros de xilosa solubilizados producidos en el mismo. La hidrólisis enzimática se realiza típicamente a un pH entre 4,5 y 5,0 a una temperatura entre 45 °C y 55 °C, y durante un tiempo de hidrólisis de 24 horas a 72 horas, bajo agitación de la mezcla.

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

Incluso más preferiblemente, la hidrólisis enzimática se realiza de acuerdo con las enseñanzas del documento WO2010113130.

Al menos una porción de la materia prima lignocelulósica pretratada residual insoluble en agua puede eliminarse del hidrolizado de materia prima lignocelulósica. La separación de la materia prima lignocelulósica pretratada residual insoluble en agua se puede obtener, por ejemplo, por decantación, centrifugación o prensado del hidrolizado de materia prima lignocelulósica o una combinación de los mismos. Sin embargo, incluso si la presencia de materia prima lignocelulósica pretratada residual insoluble en agua en el proceso de propagación divulgado puede dar lugar a problemas de mezcla, algunos de los azúcares monoméricos solubles en agua empapados en los sólidos residuales pueden retirarse del hidrolizado de materia prima lignocelulósica en la etapa de separación y perderse, de este modo en una realización preferida no se practica la eliminación de sólidos y el hidrolizado de materia prima lignocelulósica es una suspensión que comprende materia prima lignocelulósica pretratada insoluble en agua.

El proceso o procesos descritos anteriormente para derivar el hidrolizado de materia prima lignocelulósica a partir de la materia prima lignocelulósica son realizaciones ejemplares y preferidas para proporcionar el hidrolizado de materia prima lignocelulósica utilizado como la principal fuente de carbono para propagar una levadura de acuerdo con el proceso divulgado, y se entiende que están destinados a limitar de alguna manera el alcance de la invención.

5 El hidrolizado de materia prima lignocelulósica puede tener una materia seca entre 5% y 30%, preferiblemente entre 10% y 20%.

10 El hidrolizado de materia prima lignocelulósica tiene una concentración de glucosa que puede estar en el intervalo de 20 g/kg a 100 g/kg del hidrolizado de materia prima lignocelulósica en base húmeda, preferiblemente de 30 g/kg a 70 g/kg y lo más preferiblemente de 40 g/kg a 50 g/kg.

15 El hidrolizado de materia prima lignocelulósica tiene una concentración de xilosa que puede estar en el intervalo de 10 g/kg a 40 g/kg del hidrolizado de materia prima lignocelulósica en base húmeda, preferiblemente de 15 g/kg a 30 g/kg, y lo más preferiblemente de 20 g/kg a 25 g/kg.

20 El hidrolizado de materia prima lignocelulósica puede comprender además compuestos inhibidores seleccionados de las listas de ácido acético, ácido fórmico, furfural e hidroximetilfurfural (5-HMF), que se forman en etapas o procesos previos de pretratamiento e hidrólisis, e inhiben la crecimiento de la levadura, causando al menos un retraso en la tasa de crecimiento.

En particular, el ácido acético puede tener una concentración que está en el intervalo de 2 g/kg a 7 g/kg del hidrolizado de materia prima lignocelulósica en base húmeda.

25 El hidrolizado de materia prima lignocelulósica puede contener además contaminantes biológicos, como ocurre típicamente al operar a escala industrial. Los contaminantes biológicos son organismos microbianos diferentes de la levadura que se propagarán de acuerdo con el proceso divulgado, y cuya presencia es en general perjudicial para el rendimiento del proceso divulgado, consumiendo una porción de los azúcares monoméricos totalmente disponibles para el crecimiento de la levadura deseada. Los contaminantes biológicos pueden comprender bacterias y hongos, así como levaduras diferentes de la levadura que se desea propagar, tales como las levaduras de tipo silvestre. Las bacterias ácido lácticas, en particular de la especie *Lactobacillus*, son los contaminantes bacterianos principales. Las concentraciones de ácido láctico de las mezclas de fermentación generalmente se toman como una medida del grado de contaminación. La contaminación biológica se ha controlado mediante la esterilización del hidrolizado de materia prima lignocelulósica, el medio de cultivo y fermentación y los equipos involucrados en el proceso, que se pueden obtener mediante la adición de agentes antibacterianos, yales como antibióticos u otros agentes asépticos, o mediante procedimientos de esterilización, tales como la pasteurización, mediante la aplicación de agentes físicos, que incluyen, entre otros, calor, luz y radiación, antes, entre o durante el transcurso de los procesos de fermentación/propagación. Por "esterilización" se considera en el presente documento la reducción de la densidad de contaminantes biológicos por un factor de al menos 100. El uso de agentes antibacterianos y procedimientos de esterilización, que introduce costos adicionales, se evita preferiblemente en el proceso divulgado, al mismo tiempo que se mantiene el crecimiento de contaminantes biológicos en un nivel razonablemente bajo.

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

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

50 En el proceso divulgado, la levadura se propaga en ciclos de propagación secuenciales que se indican en el presente documento mediante  $P_n$ , en el que  $n$  es mayor o igual a 1, en medios de cultivo respectivos que comprenden diferentes alcuotas del hidrolizado de materia prima lignocelulósica. El proceso de propagación divulgado comprende al menos dos ciclos de propagación. Para reducir el coste de la levadura de partida en todo el proceso, preferiblemente los ciclos de propagación son al menos tres, más preferiblemente al menos cinco, y lo más preferiblemente al menos siete. Incluso si no hay un límite teórico, se cree que los ciclos de propagación pueden repetirse hasta veinte veces sin alterar la capacidad de la levadura para fermentar glucosa y xilosa.

55 Preferiblemente, cada ciclo de propagación se realiza en modo discontinuo, en el que el hidrolizado de materia prima lignocelulósica se agrega antes de comenzar el ciclo de propagación, o al comienzo del ciclo de propagación.

60 En el primer ciclo de propagación, se pone en contacto una primera cantidad de levadura con un primer medio de cultivo y se mantiene en condiciones que promueven la propagación de la levadura para producir una primera levadura propagada. En cada ciclo de propagación siguiente  $P_n$ , una porción de la levadura propagada en un ciclo de propagación anterior, que es preferiblemente el ciclo de propagación inmediatamente anterior  $P_{n-1}$ , se usa como inóculo para el ciclo de propagación  $P_n$  en operación. De este modo, una cantidad adecuada de una levadura propagada previamente se pone en contacto con un medio de cultivo del  $P_n$  y se deja propagar para producir una levadura propagada del  $P_n$ . En todos los ciclos de propagación  $P_n$ , las células de levadura pueden convertir una porción

del carbono del azúcar en un producto de fermentación, dependiendo de las condiciones de propagación. El etanol es un producto de fermentación preferido.

El primer ciclo de propagación tiene características distintivas con respecto a todos los siguientes ciclos de propagación. A saber, en el primer ciclo de propagación, se usa una levadura de inicio. Cuando la levadura inicial se pone en contacto con el primer medio de cultivo, el consumo de azúcares por la levadura inicialmente no se produce de manera significativa. Este período se denomina fase de retraso y puede considerarse un período de adaptación de la levadura al hidrolizado de materia prima lignocelulósica, en el que el crecimiento de la levadura es insignificante. La levadura utilizada en los siguientes ciclos de propagación  $P_n$ , en los que  $n$  es mayor que 1, es una levadura propagada en el hidrolizado de materia prima lignocelulósica, por lo que la fase de retraso correspondiente del  $P_n$  se reduce significativamente con respecto a la fase de retraso del primer ciclo de propagación.

La tasa de consumo de azúcares es un parámetro importante del proceso divulgado, especialmente en el caso de que el hidrolizado de materia prima lignocelulósica comprenda algunos contaminantes biológicos y no se utilicen agentes esterilizantes y antibacterianos, ya que en estas condiciones se mejora el crecimiento competitivo de contaminantes biológicos. El consumo de glucosa por la levadura es la favorita con respecto al consumo de xilosa, por lo tanto, la concentración de glucosa en el medio de propagación comenzará a disminuir, mientras que el consumo de xilosa no continuará significativamente hasta que la concentración de glucosa disminuya por debajo de un cierto valor crítico. A medida que disminuye la afinidad de la levadura por los azúcares restantes en el medio de cultivo, la tasa de consumo de azúcar total por la levadura disminuirá con el tiempo, haciendo que el crecimiento competitivo de contaminantes biológicos sea favorable. De este modo, en el proceso divulgado, todos los ciclos de propagación  $P_n$ , en los que  $n$  es un número entero igual o mayor que 1, se prolongan durante un tiempo suficiente para consumir al menos el 50% de la glucosa contenida en el medio de propagación inicial, y menos de 20% de la xilosa contenida en el medio de propagación inicial. Se pretende que el consumo de glucosa y xilosa sea el consumo total ocurrido durante la etapa de propagación, y se puede verificar midiendo la concentración de azúcar correspondiente en el medio de propagación. De este modo, el consumo total de azúcar que ocurre en el ciclo de propagación  $P_n$  incluye también el consumo de azúcar por contaminantes biológicos, que se pretende minimizar en el proceso divulgado, y el azúcar finalmente se convierte en el producto de fermentación. Para mejorar el rendimiento del proceso en términos de biomasa de levadura producida, preferiblemente los ciclos de propagación se llevan a cabo durante un tiempo de propagación suficiente para consumir al menos el 70% de la glucosa del medio de propagación inicial, y lo más preferiblemente al menos el 80%. Al mismo tiempo, para evitar que la tasa de consumo total de azúcar alcance un valor crítico para el crecimiento competitivo de contaminantes biológicos, preferiblemente el ciclo de propagación  $P_n$  se prolonga por un tiempo de propagación suficiente para consumir menos del 10% de la xilosa en el medio de cultivo inicial, más preferiblemente menos del 5%. Se observa que cada ciclo de propagación del proceso divulgado puede caracterizarse por un consumo específico de glucosa y xilosa y un tiempo de propagación, siempre que estos parámetros estén dentro de los intervalos divulgados. También se observa que, aunque la cantidad total de xilosa consumida en la etapa de propagación es preferiblemente mayor que 0, en algunos casos la xilosa puede no consumirse apreciablemente al menos en el primer ciclo de propagación. A saber, el primer ciclo de propagación generalmente requiere un tiempo de propagación que es mayor que el tiempo de propagación en los siguientes ciclos de propagación, debido a su fase de retraso más larga. El primer ciclo de propagación puede realizarse durante un tiempo de propagación que sea inferior a 30 horas, pero preferiblemente inferior a 25 horas, más preferiblemente inferior a 20 horas y lo más preferiblemente inferior a 16 horas. El tiempo de propagación de los siguientes ciclos de propagación  $P_n$  en los que  $n$  es un número entero mayor que 1, es preferiblemente menor que 70%, más preferiblemente menor que 50% y lo más preferiblemente menor que 40% del primer tiempo de propagación.

Incluso si se puede usar más de un recipiente de propagación, preferiblemente todos los ciclos de propagación se llevan a cabo en un solo recipiente de propagación. Para minimizar los costes, el recipiente o recipientes de propagación preferiblemente no están sujetos a ninguna esterilización y/o limpieza entre y/o durante los ciclos de propagación.

Para limitar el efecto del crecimiento competitivo de contaminantes biológicos, el hidrolizado de materia prima lignocelulósica se mantiene preferiblemente a una temperatura de 45 °C a 55 °C antes de usarse en el proceso divulgado, y lo más preferiblemente a la temperatura de la hidrólisis enzimática o la etapa final de hidrólisis enzimática. A esta temperatura, la actividad de los contaminantes biológicos se reduce significativamente.

En cada ciclo de propagación  $P_n$ , en el que  $n$  es un número entero igual o mayor que 1, se usa una porción  $P_n$  del hidrolizado de materia prima lignocelulósica para formar el medio de cultivo. La temperatura de la porción  $P_n$  del hidrolizado de materia prima lignocelulósica se reduce a la temperatura de propagación del ciclo de propagación  $P_n$ , que preferiblemente está en el intervalo de 28 °C a 35 °C. Se pueden usar intercambiadores de calor para enfriar la porción  $P_n$  del hidrolizado de materia prima lignocelulósica a la temperatura de propagación en el recipiente de propagación o antes de entrar en el recipiente de propagación.

Se puede usar agua o un líquido que comprende agua, y cantidades limitadas opcionales de fuentes de carbono adicionales diferentes del hidrolizado de materia prima lignocelulósica para alcanzar la materia seca deseada. Una de las ventajas que ofrece el proceso divulgado es la posibilidad de realizarse en una materia seca que es más alta que otros procesos conocidos que utilizan un hidrolizado lignocelulósico como fuente principal de carbono. La materia seca



del medio de cultivo es preferiblemente inferior al 30%, ya que sería difícil de agitar, y preferiblemente es superior al 5%, más preferiblemente superior al 10%, incluso más preferiblemente superior al 15%, lo más preferiblemente mayor al 20%. Se puede agregar agua o el líquido que comprende agua a una temperatura que es menor que la temperatura de propagación para enfriar la porción  $P_n$  del hidrolizado de materia prima lignocelulósica.

Por lo tanto, la densidad de contaminantes biológicos en el medio de cultivo del  $P_n$  inicial puede mantenerse a un nivel razonable, que puede estar en un intervalo de  $10^0$  UFC/mL a  $10^6$  UFC/mL, preferiblemente de  $10^1$  UFC/mL a  $10^5$  UFC/mL, y lo más preferiblemente de  $10^2$  UFC/mL a  $10^3$  UFC/mL de medio de cultivo del  $P_n$  inicial, en el que  $n$  es un número entero igual o mayor que 1, y UFC = unidades formadoras de colonias.

El medio de cultivo del  $P_n$ , en el que  $n$  es un número entero igual o mayor que 1, puede comprender además una fuente de nitrógeno, típicamente urea, que es una fuente de nutrientes económica para la levadura, pero preferiblemente está libre de vitaminas añadidas y/o oligoelementos, que generalmente se usan a escala de laboratorio como suplementos de crecimiento, pero son extremadamente costosos. Dicho en otras palabras, preferiblemente no se añaden vitaminas y/u oligoelementos al hidrolizado de materia prima lignocelulósica y a los medios de cultivo durante el proceso o en las etapas previas al proceso.

Preferiblemente, el pH del medio de cultivo del  $P_n$  se ajusta a un valor de 5,0 a 5,5, por ejemplo, añadiendo, por ejemplo, una cantidad adecuada de una base (solución de NaOH). Si es necesario para mantener el pH en el intervalo deseado, se pueden agregar alícuotas adicionales de la base durante la etapa de propagación.

En el primer ciclo de propagación, la levadura se puede agregar al primer medio de cultivo, o a los componentes utilizados para formar el primer medio de cultivo. En una realización, la levadura se agrega a la primera porción del hidrolizado de materia prima lignocelulósica utilizada para formar el primer medio de propagación. La cantidad de levadura en contacto con el primer medio de cultivo variará de acuerdo con el volumen total del primer medio de propagación. Preferiblemente, en el primer ciclo de propagación se agrega una cantidad de levadura para tener una densidad inicial de levadura que está entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$  células de levadura por miligramo del primer medio de cultivo en base húmeda.

En todos los ciclos de propagación  $P_n$ , en los que  $n$  es un número entero igual o mayor que 1, la propagación se produce preferiblemente en condiciones aeróbicas para aumentar la cantidad de levadura propagada producida. Las condiciones aeróbicas se caracterizan por una saturación media de oxígeno en el medio de propagación que es superior al 10%. La saturación de oxígeno es la relación entre la concentración de oxígeno disuelto ( $O_2$ ) en el medio de cultivo con respecto a la cantidad máxima de oxígeno que se disolverá en el medio de cultivo a esa temperatura y presión bajo un equilibrio estable. De este modo, se inserta un flujo de oxígeno, aire u otra mezcla de gases que comprende oxígeno en el medio de propagación, preferiblemente a un caudal medio entre 50 vvm y 200 vvm. Para promover la difusión de oxígeno en el medio de propagación, también se puede proporcionar agitación o mezcla al medio de propagación. Las condiciones aeróbicas pueden mantenerse durante al menos una parte de la etapa de propagación. En algunos casos, pueden lograrse intervalos cíclicos específicos de condiciones aeróbicas/anaeróbicas actuando sobre la mezcla del medio de cultivo.

Al final del ciclo de propagación  $P_n$ , en el que  $n$  es un número entero igual o mayor que 1, se obtiene un caldo poblado del  $P_n$  que comprende agua y una primera levadura propagada. El caldo poblado puede comprender además productos de fermentación, es decir, etanol, que han sido producidos por la actividad fermentativa de la levadura, azúcares solubles en agua no consumidos por la levadura y materia prima lignocelulósica pretratada residual insoluble en agua. En una realización preferida, el hidrolizado de materia prima lignocelulósica comprende además enzimas residuales de la etapa o etapas de hidrólisis, una parte de las cuales todavía están activas. Incluso si las condiciones de propagación no son óptimas para la actividad enzimática, una porción de los carbohidratos insolubles en agua en la materia prima lignocelulósica pretratada residual insoluble en agua puede hidrolizarse hasta azúcares adicionales solubles en agua que, por lo tanto, están disponibles para la levadura. En este caso, la cantidad total de glucosa y xilosa consumida por la levadura tendrá en cuenta los azúcares adicionales solubles en agua.

En todos los ciclos de propagación  $P_n$ , se producirá una cantidad de levadura propagada que puede ser de 5 a 15 veces la cantidad inicial de levadura correspondiente. El mismo intervalo preferido se aplica a la densidad celular de levadura.

Preferiblemente, en el ciclo de propagación del  $P_n$ , la densidad final de la levadura está entre  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^9$  células de levadura por miligramo del primer medio de cultivo en base húmeda.

En los siguientes ciclos de propagación  $P_n$ , en los que  $n$  es un número entero mayor que 1, el caldo poblado del  $P_{n-1}$  se separa en al menos dos porciones, a saber, la porción eliminada y la porción residual del caldo poblado del  $P_{n-1}$ , comprendiendo cada porción una porción de la levadura propagada previamente del  $P_{n-1}$ . La separación preferida comprende una división del caldo poblado del  $P_{n-1}$  en una porción residual del  $P_{n-1}$  y una porción eliminada del  $P_{n-1}$ , en la que las dos porciones tienen la misma composición. En la realización más preferida, la porción eliminada del caldo poblado del  $P_{n-1}$  se retira del recipiente de propagación, y la porción residual del  $P_{n-1}$  se deja en el recipiente de propagación para el ciclo de propagación  $P_n$ . En algunas realizaciones, la separación puede comprender una

separación selectiva de componentes específicos del caldo poblado, por ejemplo, por medio de filtración o centrifugación, para producir dos porciones que tienen una composición diferente. De este modo, en algunos casos, las dos porciones pueden caracterizarse por tener una densidad diferente de levadura poblada. En algunas realizaciones, las dos porciones pueden tener un contenido diferente de materia prima lignocelulósica pretratada residual insoluble en agua.

Después del primer ciclo de propagación ( $P_n = 1$ ), el proceso se somete al segundo ciclo de propagación ( $P_n = 2$ ) como se describió anteriormente para los ciclos de propagación en los que  $n$  es un número entero mayor que 1.

La cantidad de la porción residual del  $P_{n-1}$  es preferiblemente menos del 50% del caldo poblado del  $P_{n-1}$  en peso en base húmeda, más preferiblemente menos del 40%, y lo más preferiblemente menos del 25%.

En cada ciclo de propagación  $P_n$  después de la primera propagación  $P_1$ , la porción residual de un ciclo de propagación anterior se usa como inóculo de levadura. Preferiblemente, en el ciclo de propagación  $P_n$  se usa la porción residual del ciclo de propagación inmediatamente anterior  $P_{n-1}$ . De este modo, una porción residual de un ciclo de propagación anterior se pone en contacto con un medio de cultivo que comprende una porción correspondiente del  $P_n$  del hidrolizado de materia prima lignocelulósica. En una realización preferida, se agrega una alícuota del  $P_n$  del hidrolizado de materia prima lignocelulósica al recipiente de propagación que contiene la porción residual del ciclo de propagación  $P_{n-1}$  para formar el medio de cultivo del  $P_n$ . La densidad de contaminantes biológicos en la porción residual que se usa en el ciclo de propagación  $P_n$  puede ser mayor que en la densidad de contaminantes biológicos en el hidrolizado de materia prima lignocelulósica, debido a la propagación competitiva de contaminantes. La adición de una porción adecuada del  $P_n$  del hidrolizado de materia prima lignocelulósica diluirá en este caso la densidad de contaminantes biológicos en el medio de propagación del  $P_n$  inicial a un valor deseado.

Preferiblemente, la cantidad de la porción residual de un ciclo de propagación anterior y la cantidad de la porción del  $P_n$  del hidrolizado de materia prima lignocelulósica utilizado para formar el medio de cultivo del  $P_n$  se seleccionan para tener una densidad inicial de levadura en el ciclo de propagación  $P_n$  que es mayor que la densidad inicial de levadura en el primer ciclo de propagación.

Incluso más preferiblemente, la cantidad de la porción residual de un ciclo de propagación anterior y la cantidad de la porción del  $P_n$  del hidrolizado de materia prima lignocelulósica utilizada para formar el medio de cultivo del  $P_n$  se seleccionan para tener una densidad inicial de levadura en el ciclo de propagación  $P_n$  que es mayor que entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$  células de levadura por miligramo del medio de cultivo del  $P_n$  en base húmeda, en el que  $n$  es un número entero mayor que 1.

Las porciones eliminadas de los caldos poblados, que comprenden levadura propagada en los diferentes ciclos de propagación, pueden usarse para fermentar un medio de fermentación que comprende azúcares solubles en agua para producir un producto de fermentación. Preferiblemente, el producto de fermentación es etanol.

En una realización preferida, una o más porciones eliminadas de caldos poblados se ponen en contacto con un medio de fermentación que comprende una porción adicional del hidrolizado de materia prima lignocelulósica en un recipiente de fermentación. El hidrolizado de materia prima lignocelulósica se utiliza como fuente de carbono para formar el medio de fermentación, de tal manera que la levadura propagada ya está adaptada al medio de fermentación. La xilosa remanente y la glucosa opcionalmente contenida en la porción o porciones eliminadas de caldos poblados también se fermentan en el proceso, para aumentar el rendimiento total de la fermentación. La fermentación produce un caldo de fermentación, que comprende el producto de fermentación, que se puede separar y recuperar.

#### Parte experimental

Preparación del hidrolizado de materia prima lignocelulósica

Se seleccionó paja de trigo para probar el proceso divulgado.

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

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

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

5 El hidrolizado de materia prima lignocelulósica resultante era una suspensión, que tenía una materia seca del 15% en peso, que comprendía una fracción líquida y una materia prima lignocelulósica pretratada residual insoluble en agua. La composición del hidrolizado se reporta en la Tabla 1. En la tabla, la materia prima lignocelulósica pretratada residual insoluble en agua se separa en sus componentes (glucanos insolubles, xilanos insolubles y lignina y otros insolubles). El ácido acético, el ácido fórmico, el furfural, el hidroximetilfurfural son compuestos inhibidores de la propagación de la levadura.

10 El ácido láctico se produce por contaminación bacteriana y, por lo tanto, se considera como un marcador de presencia bacteriana. De este modo, una cierta contaminación biológica estaba presente en el hidrolizado de materia prima lignocelulósica. El hidrolizado de materia prima lignocelulósica se mantuvo a la temperatura de 50 °C hasta su uso en los siguientes experimentos de propagación. No se introdujeron antibióticos.

Tabla 1. Composición del hidrolizado de materia prima lignocelulósica en base húmeda

	Concentración [g/kg]
Glucosa	44,49
Xilosa	17,86
Glicerol	0,29
Ácido fórmico	0,71
Ácido láctico	0,19
Ácido acético	2,49
Etanol	0,00
5-HMF	0,06
Furfural	0,05
Oligómeros de glucosa	7,44
Oligómeros de xilosa	5,68
Glucanos insolubles	18,62
Xilanos insolubles	2,46
Lignina y otros insolubles	49,8

#### Experimentos de propagación

20 El proceso divulgado se probó realizando tres ciclos de propagación secuenciales, de acuerdo con un procedimiento que puede implementarse a escala industrial. No se practicó la esterilización entre los ciclos.

25 Las composiciones, los medios de cultivo y los caldos poblados se reportan en la Tabla 2. Solo los compuestos solubles en agua relevantes para el proceso se consideran en la tabla. No se reportan otros compuestos solubles en agua y compuestos sólidos.

30 En el primer ciclo de propagación, se formó el primer medio de cultivo insertando un volumen de 1,21 de suspensión de hidrolizado de materia prima lignocelulósica caliente en un biorreactor y suplementando con solución de urea a razón de 1,5 g/L. El pH se ajustó a  $5,2 \pm 0,1$  por adición de NaOH. No se utilizaron vitaminas ni otros nutrientes. El medio de cultivo se enfrió a 32 °C antes de insertar la levadura.

35 La propagación en cada ciclo se realizó bajo agitación a 300 rpm en configuración discontinua, en condiciones aeróbicas de flujo de aire de 1 VVh. VVh corresponde al volumen de gas que fluye por volumen medio de cultivo por hora.

40 La densidad celular de levadura se determinó por recuento celular (cámara de recuento de células Neubauer) y la composición del medio de cultivo se analizó por HPLC para determinar la concentración de glucosa y xilosa residual y compuestos críticos para la propagación de la levadura. Ambas mediciones se realizaron al comienzo y al final de cada ciclo de propagación.

45 En el primer ciclo de propagación, se insertó una levadura comercial genéticamente modificada CelluX<sup>MR</sup> 2 distribuida por Leaf Technologies, capaz de fermentar glucosa y xilosa, en el medio de cultivo a una densidad inicial de levadura de  $1,3 \times 10^7$  levadura células por miligramo de medio de cultivo.

50 El primer ciclo de propagación se realizó durante un tiempo de propagación de 14 horas para tener en cuenta la fase de retraso inicial. Se logró una concentración de células de levadura de  $1,5 \times 10^8$  células de levadura por miligramos en el primer caldo poblado. Los rendimientos de crecimiento se evaluaron calculando un factor de crecimiento, que es la relación entre la concentración de células de levadura al final y al comienzo de la propagación. Se obtuvo un factor de crecimiento de aproximadamente 10 en el primer ciclo de propagación.

Se consumieron aproximadamente el 76% de la glucosa inicial y menos del 10% de la xilosa inicial en el primer medio de propagación inicial. La concentración de ácido láctico no aumentó significativamente, lo que indica que la propagación de contaminantes bacterianos fue a niveles razonables. También se produjo una cierta cantidad de etanol.

5 Al final del primer ciclo de propagación, una porción del primer caldo poblado se retiró del biorreactor, y una porción residual de aproximadamente 240 mL del primer caldo poblado se dejó para el segundo ciclo de propagación.

10 En el segundo ciclo de propagación, el biorreactor se llenó con una segunda porción del hidrolizado de materia prima lignocelulósica, que se enfrió a aproximadamente 32 °C antes de introducirse, y se complementó con urea. El segundo medio de cultivo tenía un volumen de 1,21 como en el primer proceso de propagación. De este modo, la segunda porción del hidrolizado de materia prima lignocelulósica representaba aproximadamente el 80% del segundo medio de cultivo y la porción residual del primer caldo poblado representaba aproximadamente el 20% del segundo medio de cultivo (relación de hidrolizado fresco con respecto al hidrolizado residual de 4:1)

15 El contenido de glucosa en el segundo medio de cultivo inicial fue ligeramente menor que en el primer medio de cultivo, ya que la porción residual del primer caldo poblado se redujo en glucosa. Además, algo de etanol estaba presente en el segundo medio de cultivo, incluso si no había un nivel problemático para la propagación. De este modo, la segunda propagación se produjo en presencia de una concentración inicial de etanol en el segundo medio de propagación. La concentración inicial de levadura en el segundo ciclo de propagación fue  $5,3 \times 10^7$ . El ácido láctico estaba presente a baja concentración, similar al primer medio de cultivo.

20 La segunda propagación se realizó durante 6 horas. Se logró una concentración de células de levadura de  $1,7 \times 10^8$  células de levadura por miligramos en el segundo medio de cultivo poblado correspondiente a un factor de crecimiento de aproximadamente 3,2.

25 Se consumió aproximadamente el 66% de la glucosa inicial y menos del 10% de la xilosa inicial en el segundo medio de propagación inicial. Nuevamente, la concentración de ácido láctico no aumentó significativamente, lo que indica que la propagación de contaminantes bacterianos fue a niveles razonables, y también se produjo una cierta cantidad de etanol.

30 Después de completar el ciclo de propagación 2, se realizó un tercer ciclo de acuerdo con el mismo procedimiento que el ciclo de propagación 2 (tercer tiempo de propagación 6 horas).

35 La concentración inicial de células de levadura fue de  $4,2 \times 10^7$  y la concentración de células de levadura de  $1,3 \times 10^8$  células de levadura por miligramo se alcanzó en el tercer medio de cultivo poblado correspondiente a un factor de crecimiento de aproximadamente 3.

40 Se consumió aproximadamente el 63% de la glucosa inicial y menos del 10% de la xilosa inicial en el tercer medio de propagación inicial, produciéndose poco ácido láctico.

Tabla 2 Composición del medio de cultivo inicial (t0) y de los caldos poblados (t14, t6) de los ciclos de propagación

		Ciclo de propagación 1		Ciclo de propagación 2		Ciclo de propagación 3	
		t0	t14	t0	t6	t0	t6
Concentración [g/kg]	Glucosa	44,49	10,60	38,08	12,77	37,50	13,88
	Xilosa	17,86	16,57	18,09	17,07	18,09	16,99
	Glicerol	0,29	1,79	0,71	1,54	0,63	1,39
	Ácido fórmico	0,71	0,85	0,93	0,70	0,74	0,62
	Ácido láctico	0,19	0,22	0,20	0,24	0,22	0,25
	Ácido acético	2,49	2,18	2,44	2,14	2,42	2,01
	Etanol	0,00	16,75	3,78	15,46	3,78	15,46
	5-HMF	0,06	0,01	0,04	0,02	0,04	0,02
	Furfural	0,05	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00

Experimentos de fermentación

45 Las porciones eliminadas de los caldos propagados se usaron como inóculo para la fermentación de diferentes alícuotas del hidrolizado de materia prima lignocelulósica.

50 En cada etapa de fermentación, se introdujo una alícuota de 960 mL de hidrolizado de materia prima lignocelulósica en un recipiente de fermentación, se enfrió a aproximadamente 32 °C, luego se añadió un volumen de 240 mL de cada porción eliminada de un caldo propagado para formar el medio de fermentación correspondiente. El pH se ajustó a  $5 \pm 0,1$  con solución de NaOH y se complementó con solución de urea a razón de 1,0 g/L. De este modo, en cada etapa de fermentación, el volumen de la porción eliminada correspondiente utilizada como inóculo era aproximadamente 1:5 del volumen total del medio de fermentación. La fermentación se realizó durante 48 horas en ausencia de flujo de aire, en configuración discontinua, manteniendo una temperatura de 32 °C bajo agitación a 300 rpm. En la

fermentación, la hidrólisis enzimática de la materia prima lignocelulósica pretratada residual insoluble en agua fue continuada por las enzimas contenidas en el hidrolizado de materia prima lignocelulósica y algunos azúcares adicionales se pusieron a disposición de la levadura.

5 Las composiciones de los medios de fermentación y los caldos de fermentación se midieron al principio (t0, medio de fermentación) y al final (t48, caldo de fermentación) de las etapas de fermentación y se reportan en la Tabla 3. Se observa que todos los medios de fermentación contenían algo de etanol del caldo de propagación correspondiente diluido con hidrolizado de materia prima lignocelulósica fresca; la concentración de etanol fue suficientemente baja para no crear problemas en las etapas de fermentación. En todos las etapas de fermentación, la contaminación bacteriana fue muy baja o insignificante, como lo demuestra la concentración de ácido láctico que fue estable.

15 Casi todos los azúcares monoméricos en los medios de fermentación fueron consumidos por la levadura propagada, lo que demuestra que la levadura genéticamente modificada mantuvo su capacidad de fermentar glucosa y xilosa en múltiples ciclos de propagación/fermentación.

Tabla 3. Composición de los medios de fermentación de partida (t0) y de los caldos de fermentación (t48) de los ciclos de propagación.

	Fermentación 1		Fermentación 2		Fermentación 3	
	t0	t48	t0	t48	t0	t48
glucosa	34,64	0,01	33,98	0,11	34,20	0,00
Xilosa	16,54	0,80	15,97	0,73	15,96	0,66
Arabinosa	1,04	1,02	0,95	0,68	0,96	0,65
glicerol	0,63	1,95	0,44	1,96	0,41	2,50
Ácido fórmico	0,87	0,55	0,80	0,90	0,79	0,63
Ácido láctico	0,24	0,27	0,26	0,26	0,24	0,30
Ácido acético	2,24	1,82	2,24	1,85	2,22	1,74
Etanol	3,35	27,09	3,09	27,18	3,09	26,74
5-HMF	0,04	0,00	0,04	0,00	0,04	0,00
furfural	0,04	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para propagar una levadura capaz de fermentar glucosa y xilosa de un hidrolizado de materia prima lignocelulósica, comprendiendo dicho proceso:
- 5 propagar la levadura durante al menos un primer ciclo de propagación y un segundo ciclo de propagación, comprendiendo el primer ciclo de propagación ( $P_n$ , en el que  $n = 1$ ) las etapas de:
- 10 a. poner en contacto la levadura a una densidad inicial de levadura con un primer medio de cultivo que comprende una primera porción del hidrolizado de materia prima lignocelulósica,  
 b. permitir que la levadura se propague para crear un primer caldo poblado que comprende agua y una primera levadura propagada, en el que al menos el 50% de la glucosa y menos del 20% de la xilosa en el primer medio de cultivo se consumen en el primer ciclo de propagación,
- 15 comprendiendo el segundo ciclo de propagación ( $P_2$ ,  $n = 2$ ) las etapas de:
- a. separar el primer caldo poblado en al menos una primera porción eliminada y una primera porción residual, en la que tanto la primera porción residual como la primera porción eliminada comprenden parte de la primera levadura propagada,  
 20 b. poner en contacto la primera porción residual con un segundo medio de cultivo que comprende una segunda porción del hidrolizado de materia prima lignocelulósica, y  
 c. permitir que la levadura se propague para crear un segundo caldo poblado que comprende agua y una segunda levadura propagada, en el que al menos el 50% de la glucosa y menos del 20% de la xilosa en el segundo medio de cultivo se consuman en el segundo ciclo de propagación.
- 25 2. El proceso de la reivindicación 1, que comprende además ciclos de propagación posteriores  $P_n$ , los que  $n$  es un número entero mayor que 2 y es uno (1) mayor que el número de ciclos de un ciclo inmediatamente anterior ( $n-1$ ), comprendiendo cada ciclo de propagación  $P_n$  las etapas de:
- 30 a. separar el caldo poblado del  $P_{n-1}$  en al menos una porción eliminada del  $P_{n-1}$  y una porción residual del  $P_{n-1}$ , en la que tanto la porción residual del  $P_{n-1}$  como la porción eliminada del  $P_{n-1}$  comprenden parte de la levadura propagada del  $P_{n-1}$ ,  
 b. poner en contacto la porción residual del caldo poblado de al menos uno de los ciclos de propagación anteriores y un medio de cultivo del  $P_n$  que comprende una porción del  $P_n$  del hidrolizado de materia prima lignocelulósica, y  
 35 c. permitir que la levadura se propague para crear un caldo poblado del  $P_n$ , en el que al menos el 50% de la glucosa y menos del 20% de la xilosa en el medio de cultivo del  $P_n$  se consuman en el ciclo de propagación del  $P_n$ .
3. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa de permitir que la levadura se propague en los ciclos de propagación  $P_n$  se realiza en modo discontinuo, en el que  $n$  es un número entero igual o mayor que 1.
- 40 4. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la densidad inicial de levadura en el primer ciclo de propagación está entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$  células de levadura por miligramo del primer medio de cultivo en base húmeda.
- 45 5. El proceso de la reivindicación 4, en el que en la cantidad de porción eliminada del  $P_{n-1}$  y la cantidad de la porción del  $P_n$  del hidrolizado de materia prima lignocelulósica se seleccionan para tener una densidad inicial de levadura en el ciclo de propagación  $P_n$  entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$  células de levadura por miligramo del medio de cultivo del  $P_n$  en base húmeda, en el que  $n$  es un número entero mayor que 1.
- 50 6. El proceso de la reivindicación 5, en el que la densidad inicial de levadura en el ciclo de propagación  $P_n$ , en el que  $n$  es un número entero mayor que 1, es mayor que la densidad inicial de levadura en el primer ciclo de propagación.
7. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la densidad final de la levadura en el ciclo de propagación  $P_n$  está en el intervalo de  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^9$  células de levadura por miligramo del caldo poblado del  $P_n$  en un base húmeda, en el que  $n$  es un número entero igual o mayor que 1.
- 55 8. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que el tiempo de propagación del primer ciclo de propagación es inferior a 30 horas.
- 60 9. El proceso de la reivindicación 8, en el que el tiempo de propagación del ciclo de propagación  $P_n$  es menor que un valor porcentual del 70% del primer tiempo de propagación, en el que  $n$  es un número entero mayor que 1.
10. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el medio de cultivo comprende además una fuente de nitrógeno.
- 65 11. El proceso de la reivindicación 10, en el que no se agregan vitaminas y/o oligoelementos al proceso.

- 5 12. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el hidrolizado de materia prima lignocelulósica contiene contaminantes biológicos, y la densidad de contaminantes biológicos en el medio de cultivo inicial del  $P_n$  está en un intervalo de  $10^0$  UFC/mL a  $10^6$  UFC/mL, del medio de cultivo inicial del  $P_n$ , en el que n es un número entero igual o mayor que 1, y UFC = unidades formadoras de colonia.
13. El proceso de la reivindicación 12, en el que el hidrolizado de materia prima lignocelulósica no se somete a ninguna esterilización.
- 10 14. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, en el que no se añaden agentes antibacterianos al proceso.
- 15 15. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el hidrolizado de materia prima lignocelulósica es una suspensión que comprende materia prima lignocelulósica pretratada insoluble en agua.
16. El proceso de la reivindicación 15, en el que la materia seca del medio de cultivo del  $P_n$  es menor que 30% y mayor que un valor porcentual de 5%, en el que n es un número entero igual o mayor que 1.
- 20 17. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que todos los ciclos de propagación se realizan en un único recipiente de propagación.
18. El proceso de la reivindicación 17, en el que el recipiente de propagación no se somete a ninguna esterilización y/o limpieza entre y/o durante los ciclos de propagación.
- 25 19. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, que comprende además las etapas de:
- a. introducir una o más porciones eliminadas del  $P_n$  y un medio de fermentación que comprende una porción adicional del hidrolizado de materia prima lignocelulósica en al menos un recipiente de fermentación, y
- 30 b. permitir que la levadura fermente glucosa y xilosa para crear un caldo de fermentación, que comprende un producto de fermentación,
- en el que n es un número entero igual o mayor que 1.