

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 790 349**

51 Int. Cl.:

C12P 7/10 (2006.01)

C13K 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2011 PCT/EP2011/067391**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2012 WO12049054**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2011 E 11764221 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 2627775**

54 Título: **Proceso para producir bioetanol mediante hidrólisis enzimática de celulosa**

30 Prioridad:

13.10.2010 FR 1058327

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

27.10.2020

73 Titular/es:

**COMPAGNIE INDUSTRIELLE DE LA MATIERE
VEGETALE CIMV (100.0%)
134-142 Rue Danton
92300 Levallois Perret, FR**

72 Inventor/es:

**DELMAS, MICHEL y
BENJELLOUN MLAYAH, BOUCHRA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 790 349 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 producir bioetanol mediante hidrólisis enzimática de celulosa

5 La presente invención se refiere a un proceso para producir bioetanol, o etanol, que comprende un tratamiento previo de materia prima vegetal lignocelulósica para separar la celulosa, y que comprende una hidrólisis enzimática de la celulosa.

El solicitante, CIMV, es una empresa especializada en el tratamiento y uso económico de materias primas vegetales lignocelulósicas.

10 A este respecto, el solicitante ha presentado y es propietario de varias solicitudes de patente y patentes relacionadas con un proceso para producir pasta papelera, ligninas, azúcares y ácido acético por fraccionamiento de material vegetal lignocelulósico en un medio de ácido fórmico/ácido acético (WO-A1-00/68494).

El solicitante también es el propietario de solicitudes de patente y/o patentes relacionadas con un proceso para el tratamiento previo de un material vegetal lignocelulósico con el fin de producir bioetanol (WO-A2-2010/006840).

15 Tal proceso de tratamiento previo hace posible en particular obtener, a partir de la materia prima vegetal lignocelulósica (LVRM), en condiciones industriales económicas, en primer lugar, un sustrato compuesto esencialmente por celulosa desfibrada que presenta condiciones óptimas para su posterior hidrólisis enzimática, y un segundo sustrato hecho de melazas de azúcar procedentes de hemicelulosas, de las cuales los hidrolizados están desprovistos de furfural.

Por lo tanto, el solicitante ya ha propuesto un proceso para producir bioetanol a partir de una materia prima vegetal lignocelulósica, que comprende las etapas sucesivas de tratamiento previo de la LVRM, de hidrólisis enzimática del material tratado previamente y de fermentación alcohólica de los productos resultantes de la etapa de hidrólisis.

20 En particular, el solicitante ha propuesto un proceso para producir bioetanol a partir de una materia prima vegetal lignocelulósica, que comprende las etapas sucesivas de:

- a) tratamiento previo de la materia prima vegetal lignocelulósica para separar la celulosa, las hemicelulosas y las ligninas contenidas en esta materia prima vegetal lignocelulósica, comprendiendo el tratamiento previo las siguientes etapas sucesivas que consisten en:

- 25 • (i) desestructurar la materia prima vegetal lignocelulósica colocándola en presencia de una mezcla que contenga ácido fórmico y agua, a una temperatura de reacción entre 95 °C y 110 °C;
- (ii) después, a presión atmosférica y antes de cualquier hidrólisis, tras la acción de fermentación, separar:

* por un lado, la fase sólida que consiste principalmente en dicha celulosa que después se puede hidrolizar y fermentar para la producción de bioetanol;

30 * y, por otro lado, la fase líquida, que contiene en particular en una solución de agua, el ácido fórmico, las ligninas y las hemicelulosas;

- b) hidrólisis enzimática de dicha fase sólida;

- c) fermentación alcohólica de los productos resultantes de dicha etapa de hidrólisis, que se pueden fermentar para la producción de bioetanol.

35 Este proceso se describe en particular en detalle en el documento EP-2 235 254 (WO-A1-2009/092749), al contenido del cual se puede hacer referencia.

40 Este proceso propone un enfoque que es radicalmente diferente al de la técnica anterior, al llevar a cabo una separación de los tres biopolímeros mediante solvolisis en un medio ácido/agua, lo que hace posible la separación lineal, no recombinada, de ligninas de bajo peso molecular con un alto valor añadido, antes de cualquier acción de hidrólisis tras la fermentación de la celulosa y de las hemicelulosas.

45 Este proceso, que permite obtener niveles de rendimiento industrial independientemente de la naturaleza de las plantas utilizadas, y que, por lo tanto, es particularmente ventajoso en el caso de paja de cereales, bagazo o bagazo de sorgo azucarado, sumándose dicho uso económico al que ya propuso el solicitante en la solicitud internacional WO-A1-00/68494 que se refiere a un proceso para producir pasta papelera, ligninas, azúcares y ácido acético mediante fraccionamiento de material vegetal lignocelulósico en un medio de ácido fórmico/ácido acético.

Estas invenciones (procesos CIMV) tienen como objetivo mejorar las condiciones industriales para la producción de etanol o bioetanol a partir de LVRM, y en particular la hidrólisis de la celulosa para dar azúcares fermentables.

50 Generalmente y de manera conocida, los procesos para producir bioetanol a partir de LVRM tienen en cuenta varios parámetros.

Entre estos parámetros, se ha identificado en particular que la lignina puede ser un inhibidor enzimático y que la matriz lignocelulósica debe tratarse previamente para hacer que la celulosa y las hemicelulosas sean hidrolizables.

En virtud de su composición química, los polímeros de lignina son insolubles y altamente reactivos.

5 Como resultado, la presencia de ligninas refuerza la red celulosa-hemicelulosa, e impiden la penetración y la acción de las enzimas, lo que requiere la presencia de agua.

La hidrólisis enzimática de celulosa es un enfoque recomendado para obtener azúcares fermentables por varias razones, y en particular porque los resultados de las evaluaciones económicas están a favor de la hidrólisis enzimática, cuando se compara con la hidrólisis química.

Además, la hidrólisis enzimática genera pocos efluentes a tratar y no presenta problemas de corrosión.

10 La hidrólisis enzimática real se lleva a cabo simplemente poniendo en contacto la materia prima vegetal tratada previamente con una solución enzimática, mientras se asegura que la suspensión sea homogénea y que se mantengan las condiciones óptimas, siendo dichas condiciones, por ejemplo, para las celulasas de *T. reesei*, una temperatura entre 45 °C y 50 °C y un pH de aproximadamente 4,8.

15 El tiempo de acción de la enzima depende de la cantidad de enzimas que se usa y de la actividad específica de las enzimas.

Durante la hidrólisis enzimática, los azúcares reductores se liberan esencialmente en forma de glucosa.

Las enzimas involucradas en la degradación de la celulosa, comúnmente llamadas celulasas, son de varios tipos y de diversos orígenes y se caracterizan en particular por su actividad.

20 El coste de las celulasas es relativamente alto y constituye un factor que a menudo se estima que es el más costoso en la producción de bioetanol a partir de LVRM.

Como resultado, se han realizado importantes esfuerzos para determinar el mecanismo de la hidrólisis enzimática con vistas a mejorarla, el cual es un proceso complejo de la acción de las proteínas solubles sobre un sustrato insoluble y "refractario".

25 Otro parámetro de la eficiencia y la rentabilidad de un proceso de hidrólisis enzimática es el tiempo de hidrólisis, que puede ser relativamente largo, de 48 a 72 h.

Una vez que la celulosa se ha hidrolizado a glucosa por hidrólisis enzimática, la glucosa se fermenta de la misma manera que, por ejemplo, la glucosa resultante del almidón.

30 Los problemas conocidos específicos del uso de LVRM como sustrato inicial permanecen, como la posible presencia de compuestos tóxicos e inhibidores resultantes de las hemicelulosas y la lignina, y también la posibilidad de llevar a cabo la hidrólisis enzimática y la fermentación en una sola etapa.

Los inhibidores presentes en los hidrolizados se originan a partir de la degradación de los azúcares (a furfural), de grupos presentes en las hemicelulosas, de la lignina.

La presencia de los inhibidores depende de la naturaleza de la LVRM y de las condiciones para su tratamiento previo.

35 Además de la inhibición de las enzimas por furfural, se han observado efectos combinados de los diversos inhibidores. En la solicitud de patente CN102153763, publicada el 17.08.2011 se describe un proceso para el tratamiento previo de material lignocelulósico antes de la hidrólisis enzimática. En cuanto a la fermentación e hidrólisis simultáneas según el proceso "SSF" (del inglés Simultaneous Saccharification and Fermentation) que consiste en llevar a cabo la hidrólisis enzimática y la fermentación etanólica en una sola etapa, sus principales ventajas son la disminución de las inversiones al eliminar las operaciones necesarias para llevar a cabo de antemano la hidrólisis enzimática, y la ausencia de la inhibición de la celulasa por glucosa, que es consumida por los microorganismos fermentativos tal como aparece.

40 Esto da como resultado un aumento en los niveles y las velocidades de hidrólisis y en las productividades totales de etanol o bioetanol.

Además, se reducen los riesgos de contaminación microbiana del hidrolizado rico en glucosa.

45 Sin embargo, se ha hecho evidente que las ganancias proporcionadas por el proceso SSF, en particular desde el punto de vista económico, requieren la optimización de ciertos aspectos, en particular la concentración inicial de materia seca para obtener altas concentraciones de etanol.

Para remediar estos inconvenientes, la invención tiene como objetivo proponer un proceso mejorado para producir bioetanol o etanol, que comprende un tratamiento previo de la materia prima vegetal lignocelulósica para separar la celulosa y una hidrólisis enzimática de la celulosa, que se caracteriza en primer lugar por la eliminación solo parcial

de las ligninas, antes de la etapa de hidrólisis enzimática, con el fin de obtener un determinado nivel total residual distinto de cero (expresado como % en peso) de ligninas T, que está entre dos valores límite, es decir, un nivel incluido dentro de un intervalo determinado. Para ensayar el nivel T de las ligninas, las ligninas que se vuelven a depositar no se tienen en cuenta, solo las ligninas intrínsecas.

- 5 De hecho, sorprendentemente, se ha descubierto que no es la eliminación total de las ligninas lo que hace posible lograr el mejor rendimiento posible, es decir, un nivel T de hidrólisis enzimática igual al 100%.

Más específicamente, el proceso se caracteriza por que comprende, antes de la etapa de hidrólisis enzimática, una etapa de eliminación parcial de las ligninas que se lleva a cabo mediante un tratamiento con hidróxido de sodio, seguido de una etapa de lavado destinada a eliminar el residuo de hidróxido de sodio antes de la etapa de hidrólisis enzimática, para obtener un nivel global residual de ligninas (T), expresado como porcentaje en peso, que es distinto de cero y que se incluye en un intervalo determinado por un límite inferior (Lbajo), y un límite superior (Lsup), respectivamente, igual a 0,30% y 4% y por que para obtener condiciones de acidificación antes de la etapa de hidrólisis enzimática, el proceso comprende una etapa para la re-acidificación de la mezcla, que se lleva a cabo por medio de una mezcla de ácidos de pKa determinado que son ácido acético y ácido fórmico.

- 10
15 Preferiblemente, el nivel global residual de ligninas (T) se incluye en un intervalo determinado por un límite inferior (Lbajo) y un límite superior (Lsup), respectivamente, igual a 0,35% y 3,5%.

Más preferiblemente, el nivel global residual de ligninas (T) es igual a aproximadamente 1,65%.

Según una realización, la etapa para la re-acidificación de la mezcla se lleva a cabo por medio de una mezcla de ácido acético y ácido fórmico que contiene 0,2% en peso de ácido fórmico y 0,4% en peso de ácido acético con respecto al material seco de celulosa.

20 Después de dicha etapa de re-acidificación, el pH de la mezcla está preferiblemente entre 4 y 6, preferiblemente entre 4,5 y 5,5.

Más preferiblemente, después de dicha etapa de re-acidificación, el pH de la mezcla es igual a 5.

25 Según una realización, la etapa para la eliminación parcial de las ligninas se lleva a cabo a una temperatura entre 80 °C y 85 °C.

Según una característica del proceso, la etapa para la eliminación parcial de las ligninas se lleva a cabo a presión atmosférica.

Sorprendentemente, se ha demostrado que el uso de tales ácidos permite obtener un nivel máximo de hidrólisis, contrario, por ejemplo, al uso de un ácido fuerte como el ácido sulfúrico.

30 Además, en el contexto de los procesos de CIMV mencionados anteriormente, dicho uso industrial de ácido acético y ácido fórmico es particularmente ventajoso ya que estos ácidos ya se usan y están presentes en el ciclo industrial para producir celulosa a partir de LVRM.

35 Entre las otras ventajas de la invención, se ha demostrado que la eficacia global del proceso para producir etanol o bioetanol es cercana, o prácticamente igual, a la producción del nivel máximo teórico de etanol a partir de LVRM, y que, además, esta eficacia es la misma dependiendo de si el proceso global primero usa una etapa de hidrólisis enzimática de acuerdo con la invención, y luego una etapa de fermentación, o si se lleva a cabo un proceso simultáneo de hidrólisis y fermentación (proceso SSF).

Tal eficacia idéntica se debe al hecho de que que la hidrólisis enzimática según la invención no produce inhibidores de fermentación.

40 Además, se ha demostrado que las ventajas del proceso de acuerdo con la invención (nivel global de ligninas y condiciones particulares de re-acidificación) no se modifican, es decir, son de la misma naturaleza y tienen los mismos valores, independientemente de las celulasas usadas, y en particular si son celulasas de mayor o menor eficacia.

A modo de ejemplos de resultados de ensayos:

Ejemplo de enzimas ensayadas y su actividad:

45

ES 2 790 349 T3

	Actividades en U/ml de solución enzimática.			
	Xilanasa	Beta-glucosidasa	Celulasa	
			Endo	exo
Cellic Ctec	42	3827	11+/-5	281+/-40
Accellerase 1500	7	392	12+/-6	66+/-9
AB (EL 2009060L)	8	32	1+/-05	13+/-2
AB (EL 2009096L)	0	77	2+/-1	25+/-3

Enzima usada para los ensayos: Cellic Ctec y Cellic Ctec 2 (enzima de "nueva generación" con una actividad 40% mayor que la 1ª generación).

Condiciones de hidrólisis: temperatura igual a 50 °C, pH entre 4,5 y 5, concentración de enzimas igual a 42U/g.

5 Efecto de una extracción alcalina sobre el nivel de hidrólisis de la celulosa: véase Figura 1, en la cual:

- Pasta bruta: pasta denominada "CIMV" después de la extracción, deslignificación y lavado;
- Pasta después de la extracción alcalina: pasta bruta tratada a pH 12 a 85 °C durante 1 hora.

Efecto del nivel de lignina residual en la hidrólisis de una pasta de celulosa: véase Figura 2.

Efecto del pKa del ácido utilizado para la acidificación ("re-acidificación") a pH 5 en la hidrólisis de la pasta de celulosa:

10

	Ácido acético	Ácido acético + ácido fórmico	Ácido fórmico	Ácido sulfurico
% de hidrólisis después de 24 h	95	80	78	45

REIVINDICACIONES

1. Proceso para producir bioetanol a partir de una materia prima vegetal lignocelulósica, que comprende las etapas sucesivas de:
- 5 - a) tratamiento previo de la materia prima vegetal lignocelulósica para separar la celulosa, las hemicelulosas y las ligninas contenidas en esta materia prima vegetal lignocelulósica, comprendiendo el tratamiento previo las siguientes etapas sucesivas que consisten en:
- (i) desestructurar la materia prima vegetal lignocelulósica colocándola en presencia de una mezcla que contenga ácido fórmico y agua, a una temperatura de reacción entre 95 °C y 110 °C;
 - (ii) después, a presión atmosférica y antes de cualquier acción de hidrólisis y fermentación, separar:
- 10 * por un lado, la fase sólida que consiste principalmente en dicha celulosa que después se puede hidrolizar y fermentar para la producción de bioetanol;
- * y por otro lado, la fase líquida, que contiene en particular, en una solución de agua, el ácido fórmico, las ligninas y las hemicelulosas;
- b) hidrólisis enzimática de dicha fase sólida;
- 15 - c) fermentación alcohólica de los productos resultantes de dicha etapa de hidrólisis, que se pueden fermentar para la producción de bioetanol.
- caracterizado por que el proceso para producir bioetanol comprende, antes de la etapa b), de hidrólisis enzimática, una etapa de eliminación parcial de las ligninas que se lleva a cabo mediante un tratamiento con hidróxido de sodio, seguido de una etapa de lavado destinada a eliminar el hidróxido de sodio residual antes la etapa de hidrólisis enzimática, para obtener un nivel global residual de ligninas (T), expresado como porcentaje en peso, que está incluido en un intervalo determinado por un límite inferior (Lbajo) y un límite superior (Lsup), respectivamente igual a 0,30% y 4%, y por que para obtener condiciones de acidificación antes de la etapa de hidrólisis enzimática, el proceso comprende una etapa para la re-acidificación de la mezcla, que se lleva a cabo por medio de una mezcla de ácidos de pKa determinado que son ácido acético y ácido fórmico.
- 20
- 25 2. Proceso según la reivindicación 1, caracterizado por que el nivel global residual de ligninas (T) está incluido en un intervalo determinado por un límite inferior (Lbajo) y un límite superior (Lsup), respectivamente, igual a 0,35% y 3,5%.
3. Proceso según la reivindicación 2, caracterizado por que el nivel global residual de ligninas (T) es igual a aproximadamente 1,65%.
- 30 4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicha etapa para la re-acidificación de la mezcla se lleva a cabo mediante una mezcla de ácido acético y ácido fórmico que contiene 0,2% en peso de ácido fórmico y 0,4% en peso de ácido acético.
5. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que, después de dicha etapa de re-acidificación, el pH de la mezcla está entre 4 y 6.
- 35 6. Proceso según la reivindicación 5, caracterizado por que, después de dicha etapa de re-acidificación, el pH de la mezcla está entre 4,5 y 5,5.
7. Proceso según la reivindicación 6, caracterizado por que, después de dicha etapa de re-acidificación, el pH de la mezcla es igual a 5.
8. Proceso según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha etapa para la eliminación parcial de las ligninas se lleva a cabo a una temperatura entre 80 °C y 85 °C.
- 40 9. Proceso según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha etapa para la eliminación parcial de las ligninas se lleva a cabo a presión atmosférica.

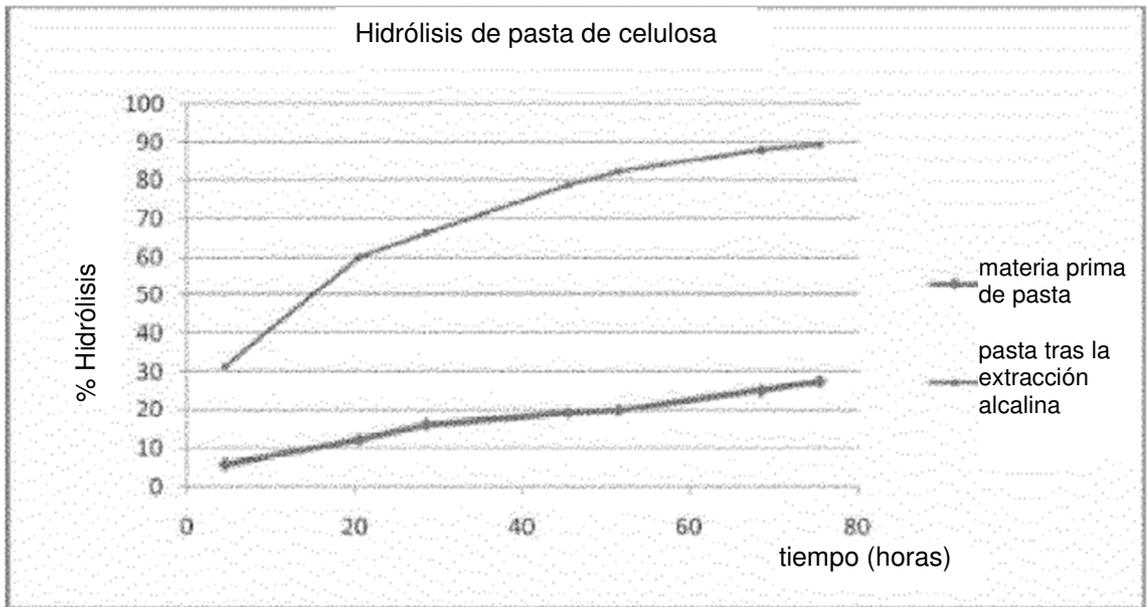


Figura 1

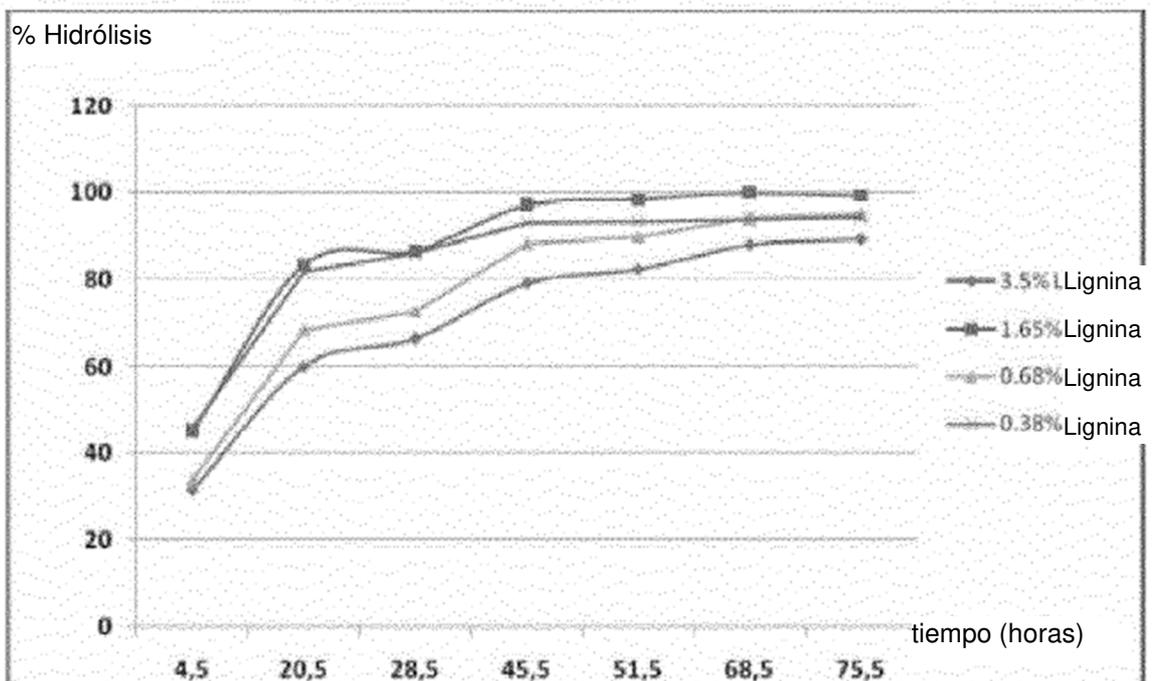


Figura 2