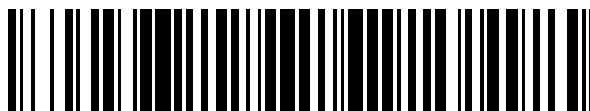


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 298**

51 Int. Cl.:

C12P 7/10 (2006.01)

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2019 E 19162010 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3543343**

54 Título: **Sacarificación y co-fermentación simultánea en dos etapas para producir etanol a partir de lignocelulosa**

30 Prioridad:

12.03.2018 IN 201821008982

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

16.12.2020

73 Titular/es:

INDIAN OIL CORPORATION LTD. (50.0%)

G-9, Ali Yavar Jung Marg Bandra (East)

Mumbai 400 051, IN y

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY (50.0%)

72 Inventor/es:

SHARMA, AJAY KUMAR;

SWAIN, MANAS RANJAN;

SINGH, AJIT;

MATHUR, ANSHU SHANKAR;

GUPTA, RAVI PRAKASH;

TULI, DEEPAK;

PURI, SURESH KUMAR y

RAMAKUMAR, SANKARA SRI VENKATA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 799 298 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

Sacarificación y co-fermentación simultánea en dos etapas para producir etanol a partir de lignocelulosa

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica.

5 Antecedentes de la invención

La fermentación/co-fermentación y sacarificación simultánea (SSF/SSCF) retira la inhibición del azúcar en la hidrólisis enzimática, de este modo, incrementa el rendimiento de azúcar por hidrólisis y reduce el riesgo de contaminación. Además, la SSF/SSCF reduce el tiempo total de reacción y el volumen del reactor (Kristensen et al., 2009). La SSF/SSCF sacrifica las condiciones óptimas tanto para la hidrólisis enzimática como para la fermentación. Típicamente, en la hidrólisis enzimática y la fermentación en el sistema SSF, la temperatura se mantiene a 37-42°C como un compromiso para una mejor hidrólisis enzimática y fermentación (Dien et al., 2003b). Además, la SSF/SSCF introduce un nuevo inhibidor (etanol) para la hidrólisis enzimática. Pero el efecto inhibidor del etanol es mucho menor en comparación con la celobiosa o la glucosa (Taherzadeh & Karimi, 2007).

La principal ventaja de la hidrólisis separada y la fermentación/co-fermentación (SHF/SHCF) en comparación con la SSF/SSCF es que la hidrólisis enzimática y la fermentación se pueden llevar a cabo en sus propias condiciones óptimas (Taherzadeh & Karimi, 2007). Sin embargo, las enzimas durante la hidrólisis son inhibidas fácilmente por sus productos finales (azúcares), especialmente durante la hidrólisis enzimática de alta carga sólida (Kristensen et al., 2009; Philippidis & Smith, 1995), lo que condujo a una hidrólisis lenta y dio como resultado un tiempo de hidrólisis mejorado y alta carga enzimática para lograr altas conversiones de azúcar. Otro problema de este procedimiento es el alto riesgo de contaminación durante la hidrólisis enzimática debido al largo tiempo de reacción y las altas concentraciones de azúcar (Taherzadeh & Karimi, 2007). La hidrólisis enzimática es la etapa limitante para SHF, que determina el rendimiento global de etanol (Lau & Dale, 2009).

El documento US 20060014260 describe un procedimiento simultáneo de sacarificación y fermentación (SSF) para la bioconversión de celulosa en etanol. Describe que la mezcla de reacción comprende una suspensión que comprende sustrato celulósico, una enzima y un agente de fermentación. La mezcla de reacción se trata a una temperatura entre alrededor de 30°C y 48°C y un pH entre alrededor de 4.0 y 6.0, junto con agitación durante un período de alrededor de 30 minutos a varias horas o días.

El documento US 20100268000 A1 describe un método para producir uno o más productos finales de fermentación fermentando una biomasa lignocelulósica que comprende los sacáridos hexosa y pentosa. Además, se describe el uso de *Saccharomyces cerevisiae* junto con un suplemento de medio de fermentación seleccionado del grupo que consiste en un ácido graso, un tensioactivo, un agente quelante, vitaminas, minerales, modificadores del pH, extracto de levadura y sales tales como sales de amonio y sales de magnesio.

El documento Jin, M. et al. "Two-step SSCF to convert AFEX-treated switchgrass to ethanol using commercial enzymes and *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST)" BIORESOURCE TECHNOLOGY 101 (2010) 8171-81-78 describe un procedimiento para la producción de etanol a partir de una biomasa lignocelulósica que comprende:

- (i) añadir una suspensión de una biomasa lignocelulósica pretratada que comprende azúcares de C5 y C6 en un sistema fermentador,
- (ii) fermentar selectivamente principalmente azúcares de C5 incubando la biomasa lignocelulósica pretratada con una pequeña dosis de enzima celulasa, microorganismo de co-fermentación y nutriente para obtener etanol,
- (iii) añadir una dosis más alta de enzima celulasa,
- (iv) permitir que el sistema fermentador se enfríe a una temperatura de 30°C, y
- (v) fermentar selectivamente azúcares de C6 para obtener etanol.

Sumario de la invención

En la presente invención del procedimiento de SSCF modificado, la hidrólisis enzimática está precedida principalmente por fermentación de azúcar de C5 y baja hidrólisis enzimática y tiene éxito principalmente por la fermentación de azúcar de C6 a diferente temperatura y duración. Esto dio como resultado un título de etanol más alto en un corto tiempo de hidrólisis y fermentación combinadas. La presente invención es ventajosa sobre la SSCF convencional porque los azúcares libres iniciales y los oligosacáridos en la biomasa pretratada fueron el blanco de la fermentación que reduce la inhibición de la retroalimentación enzimática y la temperatura óptima se usaron para la hidrólisis y la fermentación, lo que dio como resultado en un mayor rendimiento de etanol a bajas dosis de enzima en un corto intervalo de tiempo.

En la práctica de fermentación convencional, la concentración de glucosa es siempre mayor que la concentración de

xilosa. Así que, en esta situación, la levadura prefiere principalmente la fermentación de glucosa, lo que finalmente reduce la eficiencia de la fermentación de xilosa y prolonga el tiempo de fermentación de la xilosa.

5 En el presente estudio, la xilosa libre y otros oligosacáridos son el blanco de la etapa inicial de fermentación lo que finalmente reduce la inhibición de la retroalimentación enzimática. Debido a que la concentración de enzima se redujo a la mitad que en la práctica convencional y redujo adicionalmente el tiempo de fermentación a un tercio y 30 h menos que la hidrólisis y fermentación (SHF) separadas y la SSCF convencional, respectivamente. Esto hace que el procedimiento sea más aceptable para la práctica comercial.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de etanol a partir de una biomasa lignocelulósica que comprende;

- 10 (i) añadir una suspensión de una biomasa lignocelulósica pretratada que comprende azúcares de C5 y C6 en un sistema fermentador;
- (ii) fermentar selectivamente principalmente azúcares de C5 incubando la biomasa lignocelulósica pretratada con una enzima celulasa, microorganismo de co-fermentación y nutriente para obtener etanol;
- (iii) hidrolizar calentando el sistema fermentador a 48-55°C durante un período de 18 a 24 horas;
- 15 (iv) permitir que el sistema fermentador se enfríe a una temperatura de 35-37°C; y
- (v) fermentar selectivamente azúcares de C6 inoculando el sistema con una segunda dosis de microorganismo de co-fermentación para obtener etanol.

También se describe un procedimiento para la producción de etanol a partir de una biomasa lignocelulósica que comprende;

- 20 (i) añadir una suspensión completa de una biomasa lignocelulósica pretratada con ácido que comprende azúcares de C5 y C6 en un sistema fermentador;
- (ii) fermentar selectivamente principalmente azúcares de C5 incubando la biomasa lignocelulósica pretratada con una enzima celulasa, microorganismo de co-fermentación y nutriente para obtener etanol;
- (iii) hidrolizar calentando el sistema de fermentación a 48-55°C durante un período de 18 a 24 horas;
- 25 (iv) permitir que el sistema fermentador se enfríe a una temperatura de 35-37°C; y
- (v) fermentar selectivamente azúcares de C6 inoculando el sistema con una segunda dosis de microorganismo de co-fermentación para obtener etanol.

30 En una de las características de la presente invención, la fermentación de azúcar de C5 se lleva a cabo durante 16-20 horas a cualquier temperatura que favorezca la fermentación sobre la hidrólisis, cuando la concentración de xilosa se reduce a 6-7 g/l en el caldo de fermentación, la temperatura del procedimiento se incrementa gradualmente a 33 y 35°C y se incuba 2 h a cada temperatura para una mejor hidrólisis y fermentación.

En una característica adicional de la presente invención, la fermentación de azúcar de C5 se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 30°C-35°C.

35 En otra característica de la presente invención, la fermentación de azúcar de C6 se lleva a cabo durante 6 a 10 horas a cualquier temperatura que favorezca la fermentación sobre la hidrólisis.

En una característica adicional de la presente invención, la fermentación de azúcar de C6 se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 35°C-37°C.

En otra característica más de la presente invención, la suspensión de biomasa pretratada se añade al sistema fermentador de la etapa (i) sin ninguna destoxificación.

40 En otra característica más de la presente invención, el procedimiento para la producción de etanol a partir de una biomasa lignocelulósica comprende además ajustar el pH de la suspensión de la etapa (i) a 5-5.5 con un ajustador de pH.

En otra característica más de la presente invención, el ajustador de pH se selecciona de hidróxido de amonio acuoso, NaOH, KOH y CaCO₃ o sustancia que es de naturaleza alcalina e incrementa el pH.

45 En otra característica más de la presente invención, el nutriente es sulfato de amonio, MgSO₄ o cualquier otra sal de magnesio o amonio.

En otra característica más de la presente invención, la enzima celulasa es de origen fúngico, β-glucosidasa junto con otra enzima accesoria, en la que:

(i) la enzima celulasa de origen fúngico está compuesta de celobiohidrolasa I y II; y

(ii) las otras enzimas accesorias se seleccionan de xilanasa, β -xiloxidasa, arabinofuranosidasa y pectinasa.

5 En otra característica más de la presente invención, el microorganismo de co-fermentación (azúcar de C6 y C5) se selecciona de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* sp., *Candida* sp., y *E. coli* o cualquier microorganismo de co-fermentación etanogénico.

En otra característica más de la presente invención, el azúcar de C5 se selecciona de xilosa y el azúcar de C6 se selecciona de glucosa.

En otra característica más de la presente invención, la fermentación del azúcar de C6 se detiene después de 6 a 10 horas de fermentación.

10 En otra característica más de la presente invención, opcionalmente se usa otro nutriente para mejorar la concentración final de etanol y el otro nutriente se selecciona de extracto de levadura, peptona y sulfato de amonio o cualquier otra fuente de nitrógeno para microorganismos.

15 En otra característica más de la presente invención, la biomasa lignocelulósica se selecciona de paja, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, tallo de algodón, tallo de cebada, bambú o cualquier residuo agrícola que contenga celulosa o hemicelulosa o ambas.

En una de las características, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de etanol a partir de una biomasa lignocelulósica que comprende:

(i) añadir una suspensión de biomasa pretratada que comprende azúcares de C5 y C6 sin ninguna destoxificación en un sistema de fermentación;

20 (ii) ajustar el pH de la suspensión de la etapa (i) a 5-5.5 con disolución acuosa de amonio para obtener una suspensión de pH ajustado;

(iii) fortificar la suspensión de pH ajustado con $MgSO_4$ en una cantidad de 3-5 g/l, junto con la enzima celulasa y el microorganismo de co-fermentación;

25 (iv) añadir agua a la suspensión de la etapa (iii) para mantener del 5 al 20% en peso de sólido total (TS) en la suspensión;

(v) incubar la suspensión de la etapa (iv) a 30°C-35°C durante 16-20 horas para una fermentación selectiva de azúcares de C5 con 200-250 rpm cuando la xilosa libre en la suspensión se reduce a 6-7 g/l desde 30 a 35 g/l;

(vi) hidrolizar calentando el sistema de fermentación a 48-55°C con una rampa de 3 a 4°C por 20-25 minutos, y a continuación se permite que el procedimiento mantenga la temperatura de 48°C-55°C durante 18-24 horas

30 (vii) permitir que el sistema fermentador se enfríe a una temperatura de 35-37°C; y

(viii) fermentar selectivamente azúcares de C6 inoculando el sistema con una segunda dosis de microorganismo de co-fermentación para obtener etanol.

Además, se describe un procedimiento para la producción de etanol a partir de una biomasa lignocelulósica que comprende:

35 (i) añadir una suspensión de biomasa pretratada que comprende azúcares de C5 y C6 sin ninguna destoxificación en un sistema de fermentación;

(ii) ajustar el pH de la suspensión de la etapa (i) a 5-5.5 con disolución acuosa de amonio para obtener una suspensión de pH ajustado;

40 (iii) fortificar la suspensión de pH ajustado con $MgSO_4$ en una cantidad de 3-5 g/l, junto con la enzima celulasa y el microorganismo de co-fermentación;

(iv) añadir agua a la suspensión de la etapa (iii) para mantener el sólido total deseado (TS) en la suspensión;

45 (iv) incubar la suspensión de la etapa (iv) a 30°C-35°C durante 16-20 horas para una fermentación selectiva de azúcares de C5 con 200-250 rpm cuando la xilosa libre en la suspensión se reduce a 6-7 g/l desde 30 a 35 g/l; mientras se incrementa la temperatura, el fermentador se mantiene a 30 y 33°C durante 2 horas para incrementar la velocidad de hidrólisis y fermentación;

(v) hidrolizar calentando el sistema de fermentación a 48-55°C con una rampa de 3 a 4°C por 20-25 minutos, y a continuación se permite que el procedimiento mantenga la temperatura de 48°C-55°C durante 18-24 horas

(iv) permitir que el sistema fermentador se enfríe a una temperatura de 35-37°C; y

(vi) fermentar selectivamente azúcares de C6 inoculando el sistema con una segunda dosis de microorganismo de co-fermentación para obtener etanol.

Breve descripción de los dibujos

5 La Fig. 1 ilustra un diagrama de flujo que representa un procedimiento para la producción de etanol a partir de una biomasa lignocelulósica según una realización de la presente descripción.

La Fig. 2 ilustra los resultados de la SSCF modificada inventada usando *S. cerevisiae* de co-fermentación y enzima comercial (3.3 FPU/TS);

La Fig. 3 ilustra los resultados de SSCF convencional usando *S. cerevisiae* y enzima comercial (7 FPU/TS); y

10 La Fig. 4 muestra la ilustración del rendimiento de etanol (%) del procedimiento de SSCF modificado y el procedimiento de SSCF convencional para la producción de etanol.

Descripción detallada de la invención

Si bien la invención es susceptible a varias modificaciones y formas alternativas, a continuación, se describirá en detalle una realización específica de la misma.

15 Definición:

Para los propósitos de esta invención, los siguientes términos tendrán el significado que se especifica en la misma:

La "biomasa pretratada" o el "pretratamiento de biomasa" usados aquí eliminan las barreras físicas y químicas que hacen que la biomasa nativa sea recalcitrante y exponen la celulosa para una mejor hidrólisis enzimática. En la mayoría del pretratamiento, los parámetros químicos (ácidos o alcalinos) y físicos (alta temperatura o presión) se usan individualmente o de manera mixta para eliminar las barreras para la hidrólisis enzimática y mejorar la digestibilidad enzimática.

La "destoxificación" usada aquí es el procedimiento en el que los inhibidores (compuestos tóxicos tales como hidroximetilfurfural, furfural, ácidos acéticos, ácidos fórmicos, etc.) producidos durante el procedimiento de pretratamiento se retiran o neutralizan de la biomasa pretratada mediante un procedimiento químico, físico o biológico.

La "enzima celulasa" usada aquí es una forma mixta de enzima que está compuesta principalmente por exo-hidrolasa, endo-hidrolasa y beta-glucosidasa. Esta enzima se produjo principalmente a partir de fuentes fúngicas. La celulasa descompone la molécula de celulosa en monosacáridos y polisacáridos u oligosacáridos más cortos. En la presente invención, la enzima celulasa se selecciona de enzimas celulasa disponibles comercialmente que son apropiadas para los propósitos. Más particularmente, la enzima celulasa comercial disponible CTec3 se usa en la presente invención.

El "azúcar libre" usado aquí es la forma monomérica de azúcar que se produce a partir de la biomasa lignocelulósica durante el pretratamiento. El azúcar libre en este procedimiento está compuesto principalmente de glucosa y xilosa.

Los "azúcares de C5" usados aquí son azúcares de C5 representados por xilosa. El "azúcar de C5 libre" usado aquí es azúcar (principalmente xilosa) liberado de las hemicelulosas durante el pretratamiento y alguna parte en la hidrólisis enzimática.

La "fermentación de C5" usada aquí es la fermentación de xilosa a etanol.

El "azúcar de C6" usado aquí representa glucosa.

La "fermentación de C6" usada aquí es fermentación de glucosa a etanol.

40 El "nutriente" usado aquí es hidróxido de amonio y $MgSO_4$. El hidróxido de amonio usado en este procedimiento tiene doble actividad, ajusta el pH de la biomasa pretratada con ácido sulfúrico (H_2SO_4) y convertida simultáneamente en sulfato de amonio (ion amonio (NH_4^+) combinado con iones sulfato libres (SO_4^{2-}) liberados del ácido sulfúrico durante el pretratamiento. El sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) actúa como fuente de nitrógeno para la levadura durante la fermentación. Otra sal $MgSO_4$ usada en la fermentación en la que, Mg^{+2} actúa como un cofactor enzimático esencial y actúa como componente estructural clave de la mayoría de las vías biológicas. Durante la fermentación el Mg^{+2} desempeña un papel importante para el correcto funcionamiento de las enzimas de fermentación en la levadura.

La presente invención describe un método para la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. En la presente invención, el azúcar de C5 libre en la biomasa pretratada es el primer blanco junto con la baja concentración de glucosa disponible para la fermentación, seguido de hidrólisis enzimática y fermentación de C6 de

manera secuencial.

Xilano y glucano son polímeros de xilosa y glucosa respectivamente, denominados colectivamente holocelulosa en la biomasa lignocelulósica. En cuanto a las propiedades físicas, el xilano y el glucano son de naturaleza amorfa y cristalina respectivamente. Debido a las propiedades físicas, el xilano se descompone en xilosa cuando la biomasa lignocelulósica se somete a un tratamiento previo con ácido, pero la mayoría del glucano permanece sin reaccionar. Así que, en este procedimiento, cuando la biomasa pretratada se toma para la fermentación, la forma libre de xilosa (30-35 g/l) (descomposición de xilano) está presente en la biomasa, que es el objetivo en primer lugar del microorganismo de co-fermentación para la fermentación en presencia de muy poca cantidad de glucosa (<8-10 g/l, que se libera durante el pretratamiento) a 30-35°C. La temperatura de fermentación no es lo suficientemente adecuada para que la enzima descomponga el glucano a glucosa de manera eficiente. De modo que debido a esto, el microorganismo de fermentación se centró principalmente en el azúcar xilosa (C5) en la etapa inicial de fermentación.

El procedimiento, según la presente invención, lleva la concentración de C5 a alrededor de sequedad y reduce el tiempo total del procedimiento (tanto de hidrólisis como de fermentación) a 46 h, que es alrededor de 1/3 del SHF convencional (tiempo total del procedimiento 120 h que incluye 72 h de hidrólisis y 48 h de fermentación). La productividad general de etanol es mucho más alta que la del procedimiento SSCF convencional.

Según la presente invención, se describe un método para la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica (véase **Fig. 1**), que comprende:

1. Adición de suspensión de biomasa pretratada con ácido sin ninguna destoxificación en el fermentador;

2. El pH de la suspensión se ajustó a 5-5.5 con disolución acuosa de amonio. La suspensión de pH ajustado se fortificó con 3-5 g/l de MgSO₄, enzima celulasa y *Saccharomyces cerevisiae* de co-fermentación; la levadura de co-fermentación es esencial para usar en este procedimiento para utilizar azúcar tanto pentosa como hexosa en el caldo de fermentación.

3. Se añade agua apropiada al fermentador para ajustar la carga final de sólido total (TS) al 20% de la biomasa. Todo el procedimiento se incubó a 30°C-35°C durante 16-20 horas para la fermentación a 200 rpm;

4. Cuando la concentración de xilosa libre (la xilosa libre se produce durante el procedimiento de pretratamiento con ácido y está fácilmente disponible para la fermentación durante el procedimiento de fermentación) en la suspensión baja a 3-5 g/l, la temperatura del procedimiento se incrementó lentamente a 48-55°C con una rampa de 3 a 4°C por 20-25 min, a continuación se permite que el procedimiento mantenga alrededor de 48-55°C de temperatura durante 18-24 horas. Después de esta incubación, el sistema se dejó enfriar a una temperatura de 35-37°C;

5. Una segunda dosis de *Saccharomyces cerevisiae* de co-fermentación se inocula al sistema para la segunda etapa de fermentación. La segunda fermentación se detuvo después de 6 a 10 horas de fermentación.

Habiendo descrito los aspectos básicos de la presente invención, los siguientes ejemplos ilustran una realización específica de la misma.

Ejemplo 1

La biomasa pretratada (suspensión, TS aproximadamente 24%) sin ninguna destoxificación se introduce directamente en el fermentador. El pH de la suspensión se ajustó a 5.5 con disolución acuosa de amonio (concentración inicial del 25%). La suspensión de pH ajustado se fortificó con 3 g/l de MgSO₄, enzima celulasa (enzima comercial, 3.3FPU/TS) y *Saccharomyces cerevisiae* de co-fermentación (1g de biomasa de células secas/litro, xilosa y glucosa utilizando levadura). La cantidad requerida de agua se añadió al procedimiento para ajustar la concentración final de biomasa al 20%. Todo el procedimiento se incubó a 30°C durante 16 h para la fermentación con 200 rpm. Cuando la concentración de xilosa libre en la suspensión se acerca a 6-7 g/l, la temperatura del procedimiento se incrementó a 33°C y 35°C, se incubó durante 2 horas en cada temperatura para una mejor hidrólisis y fermentación. Después esa temperatura se incrementó a 48°C. Esta etapa requirió principalmente la liberación rápida de azúcar glucosa de la celulosa que se convirtió simultáneamente con hidrólisis en etanol por la biomasa de levadura. Cuando se alcanzó la temperatura en el objetivo deseado, se permitió que el procedimiento mantuviera la temperatura requerida (48°C) durante 23 h para una mejor hidrólisis enzimática. Después de esta incubación, el sistema se dejó enfriar a una temperatura de 35°C. Una segunda dosis de *S. cerevisiae* de co-fermentación (1g de biomasa de células secas/litro) se inoculó en el sistema para la segunda etapa de fermentación. La segunda fermentación se detuvo después de 6 h de fermentación. Este procedimiento tardó 46 horas de incubación, incluida la fermentación y la hidrólisis enzimática. Los resultados de este experimento están representados por **Fig. 2**.

Carga sólida en fermentación	20%
Modo de fermentación	SSCF, cepa única de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de co-fermentación (2g/l usada en ambas fermentaciones)
Carga de enzima (FPU/g) y fuentes	3.3, Enzima comercial
Xilosa residual (g/l)	1.30
Concentración de etanol (g/l) a las 46 h	50
Rendimiento de etanol (%)	71
Productividad específica (Q) g/l/h	1.08

Ejemplo 2

- 5 Usando un enfoque convencional de SSCF para la producción de etanol a partir de biomasa pretratada, sacarificación a 50°C durante 5 h y seguido de fermentación e hidrólisis a 41°C por una levadura natural moderadamente termo-tolerante *S. cerevisiae* hasta 24h. Después de esta fermentación, otra levadura de co-fermentación *S. cerevisiae* fue inoculada al procedimiento de fermentación. En este enfoque, la utilización de xilosa después de la fermentación de glucosa fue comparativamente lenta en comparación con el procedimiento anterior y se observaron alrededor de 10 g/l de xilosa residual después de 72 h. Este procedimiento de fermentación produce el menor título de etanol después de las 72 h de fermentación usando una dosis de enzima aún mayor. Los resultados de este experimento están representados por la **Fig. 3**.

Carga sólida en fermentación	20%
Modo de fermentación	SSCF, 1º <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de tipo natural (1 g/l), 2º <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de co-fermentación (1g/l)
Carga de enzima (FPU/g) y fuentes	7, Enzima comercial
Xilosa residual (g/l)	9.98
Concentración de etanol (g/l) a las 72 h	46
Rendimiento de etanol (%)	65
Productividad específica (Q) g/l/h	0.64

La Figura 4 representa el rendimiento de etanol comparativo (%) del Ejemplo 1 (SSCF modificado) y 2 (Procedimiento de SSCF convencional).

15 Referencias

1. Krishnan, C., Sousa, L. D., Jin, M. J., Chang, L. P., Dale, B. E., Balan, V. 2010. Alkali-based AFEX Pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(3), 441-450.
2. Dien, B. S., Cotta, M. A., Jeffries, T. W. 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(3), 258-266.
3. Taherzadeh, M. J., Karimi, K. 2007. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials:

a review. Bioresources, 2(4), 707-738.

4. Lau, M. W., Dale, B. E. 2009. Cellulosic ethanol production from AFEX-treated corn stover using *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(5), 1368-1373.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de etanol a partir de una biomasa lignocelulósica que comprende;
 - (i) añadir una suspensión de una biomasa lignocelulósica pretratada que comprende azúcares de C5 y C6 en un sistema fermentador;
 - 5 (ii) fermentar selectivamente principalmente azúcares de C5 incubando la biomasa lignocelulósica pretratada con una enzima celulasa, microorganismo de co-fermentación y nutriente para obtener etanol;
 - (iii) hidrolizar calentando el sistema de fermentación a 48-55°C durante un período de 18 a 24 horas;
 - (iv) permitir que el sistema de fermentación se enfríe a una temperatura de 35-37°C; y
 - 10 (v) fermentar selectivamente azúcares de C6 inoculando el sistema con una segunda dosis de microorganismo de co-fermentación para obtener etanol.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fermentación de azúcar de C5 se lleva a cabo durante 16-20 horas a cualquier temperatura que favorezca la fermentación sobre la hidrólisis, cuando la concentración de xilosa se reduce a 6-7 g/l en el caldo de fermentación la temperatura del procedimiento se incrementa gradualmente a 33 y 35°C y se incuba 2 h en cada temperatura para una mejor hidrólisis y fermentación.
- 15 3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que la fermentación de azúcar de C5 se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 30°C a 35°C.
4. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fermentación de azúcar de C6 se lleva a cabo durante 6 a 10 horas a cualquier temperatura que favorezca la fermentación sobre la hidrólisis.
5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que la fermentación de azúcar de C6 se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 35°C a 37°C.
- 20 6. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la suspensión de biomasa pretratada se añade en el sistema fermentador de la etapa (i) sin ninguna destoxificación.
7. El procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además ajustar el pH de la suspensión de la etapa (i) a 5-5.5 con un ajustador de pH.
- 25 8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que el ajustador de pH se selecciona de hidróxido de amonio acuoso, NaOH, KOH y CaCO₃ o sustancia que es de naturaleza alcalina e incrementa el pH.
9. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el nutriente es sulfato de amonio, MgSO₄ o cualquier otra sal de magnesio o amonio.
10. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la enzima celulasa es de origen fúngico, β-glucosidasa junto con otra enzima accesoria, en el que:
 - (i) la enzima celulasa de origen fúngico está compuesta de celobiohidrolasa I y II; y
 - (ii) las otras enzimas accesorias se seleccionan de xilanasa, β-xiloxidasa, arabinofuranosidasa y pectinasa.
11. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el microorganismo de fermentación se selecciona de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* sp., *Candida* sp., y *E. coli* o cualquier microorganismo de co-fermentación etanogénica.
- 35 12. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el azúcar de C5 se selecciona de xilosa y el azúcar de C6 se selecciona de glucosa.
13. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la biomasa lignocelulósica se selecciona de paja, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, tallo de algodón, tallo de cebada, bambú o cualquier residuo agrícola que contenga celulosa o hemicelulosa o ambos.
- 40 14. Un procedimiento para la producción de etanol a partir de una biomasa lignocelulósica que comprende:
 - (i) añadir una suspensión de biomasa pretratada que comprende azúcares de C5 y C6 sin ninguna destoxificación en un sistema fermentador;
 - (ii) ajustar el pH de la suspensión de la etapa (i) a 5-5.5 con disolución acuosa de amonio para obtener una suspensión de pH ajustado;
 - 45 (iii) fortificar la suspensión de pH ajustado con MgSO₄ en una cantidad de 3-5 g/l, junto con la enzima celulasa

y el microorganismo de fermentación;

(iv) añadir agua a la suspensión de la etapa (iii) para mantener del 5 al 20% en peso de sólido total (TS) en la suspensión;

5 (v) incubar la suspensión de la etapa (iv) a 30°C-35°C durante 16-20 horas para una fermentación selectiva de azúcares de C5 con 200-250 rpm cuando la xilosa libre en la suspensión se reduce a 6-7 g/l desde 30 a 35 g/l;

(vi) hidrolizar calentando el sistema fermentador a 48-55°C con una rampa de 3 a 4°C por 20-25 minutos, y a continuación se permite que el procedimiento mantenga la temperatura de 48°C-55°C durante 18-24 horas

(vii) permitir que el sistema fermentador se enfríe a una temperatura de 35-37°C; y

10 (viii) fermentar selectivamente azúcares de C6 inoculando el sistema con una segunda dosis de microorganismo de co-fermentación para obtener etanol.

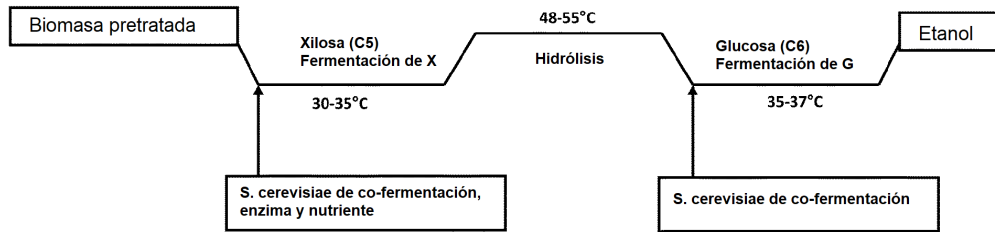


Fig 1

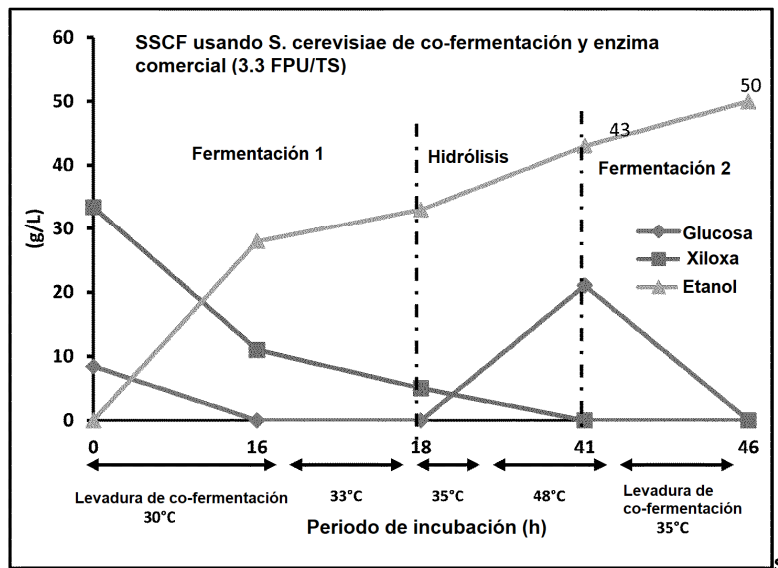


Fig 2

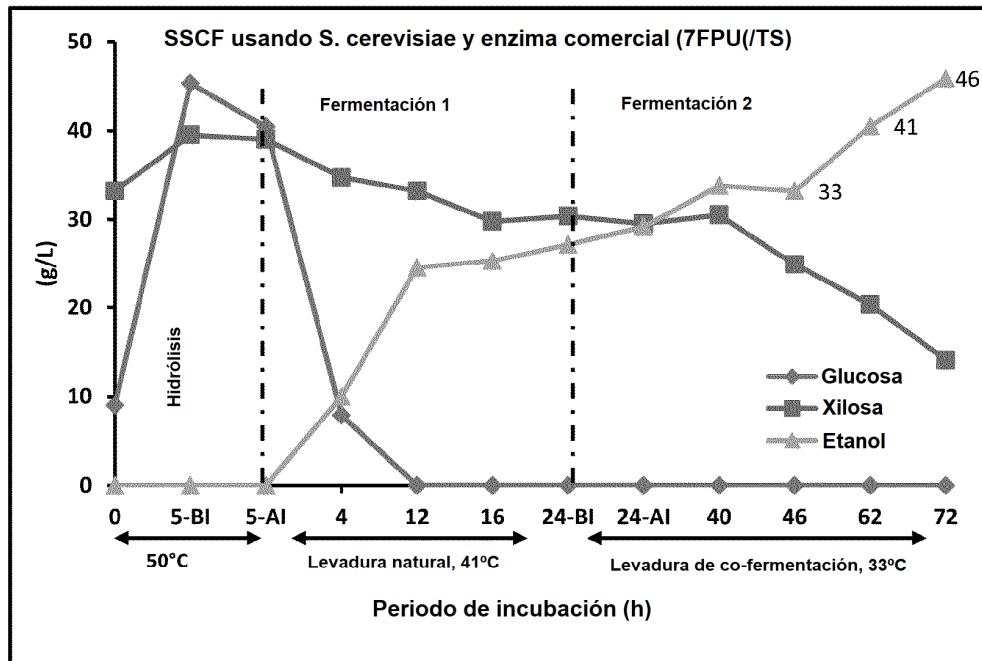


Fig 3

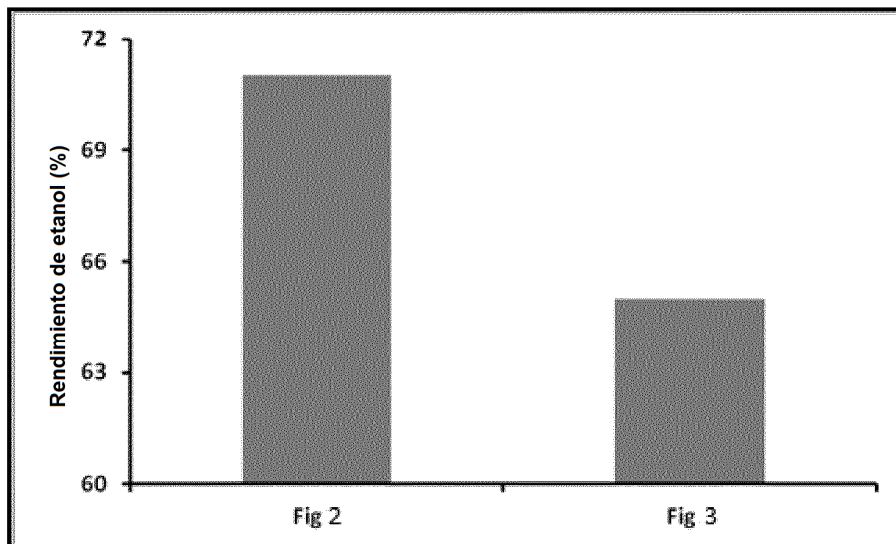


Fig 4