

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 704**

21 Número de solicitud: 201400441

51 Int. Cl.:

C12P 7/10 (2006.01)

C12R 1/185 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

30.05.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

01.12.2015

Fecha de la concesión:

05.05.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

12.05.2016

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (75.0%)

C/ Ancha, 16

11001 Cádiz (Cádiz) ES y

UNIVERSIDAD DE JAÉN (25.0%)

72 Inventor/es:

ZAAFOURI, Kaouthar;

HAMDI, Moktar;

FERNÁNDEZ GÜELFO, Luis Alberto;

ÁLVAREZ GALLEGRO, Carlos José;

ROMERO GARCÍA, Luis Isidoro;

SÁNCHEZ VILLASCLARAS, Sebastián;

ABOUDI, Kaoutar y

FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, Juana

54 Título: **Procedimiento para la transformación de Posidonia oceanica seca para producir bioetanol de segunda generación**

57 Resumen:

Procedimiento para la transformación de Posidonia oceánica seca para producir bioetanol de segunda generación.

La invención se fundamenta en la aplicación de una serie de técnicas de pre-tratamiento mecánico, pre-tratamiento térmico, sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), y destilación, con el objetivo de extraer los azúcares fermentables de la matriz lignocelulósica de los depósitos de P. oceánica seca y a continuación convertirlos a bioetanol de segunda generación.

La invención permite el aprovechamiento de los depósitos de P. oceánica seca como un recurso de biomasa lignocelulósica no alimentaria, abundante y no explotada para producir bioetanol de segunda generación para afrontar el agotamiento notable de los recursos en energías fósiles.

ES 2 552 704 B2

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la transformación de *Posidonia oceanica* seca para producir bioetanol de segunda generación.

SECTOR DE LA TÉCNICA.

- 5 La invención se inscribe en el marco del desarrollo de biocarburantes a partir de una biomasa lignocelulósica no alimentaria para hacer frente al agotamiento notable de los recursos en energías fósiles.

ESTADO DE LA TÉCNICA.

- 10 Desde la antigüedad, las plantas de *Posidonia oceanica* han sido empleadas por el hombre para distintos fines, tales como bio-indicador de contaminación de las aguas, alimentación animal, fabricación de zapatos, construcción de techos, producción de compost, aislamiento térmico, producción de papel (Boudouresque et al, 2006; Montefalcone, 2009) y adsorción biológica en el tratamiento de aguas
15 residuales de tintorería (Guezguez et al, 2009). Sin embargo, hasta la fecha de hoy no ha sido empleada para producir carburante.

Posidonia oceanica es una planta marina endémica del mar mediterráneo (Gobert, 2002). Los depósitos de *P. oceanica* cubren una superficie de entre 25000 y 50000 km² de las costas mediterráneas (Gobert, 2002).

- 20 Los depósitos de *P. oceanica* seca, forman una especie bancos de pelotas en las costas. Se estima que la producción primaria neta de *P. oceanica* seca es de aproximadamente 420 g MS/m² año, pudiendo alcanzar 1300 g MS/m² año. En realidad, los depósitos de *P. oceanica* seca constituyen uno de los ecosistemas más productivos del planeta (Boudouresque et al., 2006). Además, algunas de las
25 características del ecosistema formado por esta planta son únicas y particulares en el medio marino y se asemejan a los ecosistemas forestales continentales en cuando a la acumulación de la biomasa vegetal, siendo ésta excepcionalmente elevada (Boudouresque et al., 2006). Las pelotas de *P. oceanica* poseen una

composición lignocelulósica similar y comparable a otras plantas lignocelulósicas terrestres (Khiari et al., 2010; Ncibi et al., 2009).

Hasta la fecha, las patentes relativas a la producción de bioetanol de segunda generación a partir de la biomasa lignocelulósica principalmente emplean como
5 materia prima los siguientes sustratos:

- El bagazo de la caña de azúcar (US 2010/0330638 A1. Dec.30, 2010).
- Residuos agrícolas, madera dura y blanda, residuos forestales, lodos de la industria papelera, residuos sólidos industriales y municipales, diferentes plantas herbáceas (paja de trigo, maíz, sorgo, cebada, arroz, y soja) (WO
10 2011/ 137150 A1. Nov. 03, 2011) (WO 2011/ 137147 A1. Nov.03, 2011).
- El pino, el roble y algunas plantas perennes (WO 2011/ 136616 A2. Nov. 03, 2011).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION.

- 15 La presente invención tiene como objetivo principal transformar los depósitos de *Posidonia oceanica* seca, mediante hidrólisis térmica y sacarificación enzimática, para extraer los azúcares fermentables y así producir bioetanol de segunda generación por fermentación alcohólica. Esta invención permite la valorización de un recurso de biomasa lignocelulósica abundante y no explotado con fines
20 energéticos, a la vez que contribuye al desarrollo de biocarburantes de segunda generación como fuentes de energía renovable limpia.

El sector energético podrá beneficiarse de las ventajas de esta invención en cuanto al desarrollo de los biocarburantes, favoreciendo la independencia energética frente a las energías fósiles. En efecto, el agotamiento notable de los recursos en
25 energías fósiles y las exigencias dictadas por el desarrollo sostenible, son los principales argumentos a favor del desarrollo de esta invención.

Por otra parte, los depósitos de *Posidonia oceanica* seca en las costas mediterráneas en general, y en Túnez en particular, constituyen una valiosa fuente

de biomasa lignocelulósica renovable no alimentaria que está disponible como un sustrato para las biorrefinerías.

La invención, tal y como se detallará posteriormente, está basada en la aplicación de una serie de técnicas de pre-tratamiento mecánico (etapa 1), pre-tratamiento
5 térmico (etapa 2), sacarificación y fermentación simultaneas (SSF) (etapa 3) y separación del etanol formado por destilación (etapa 4), con el objetivo de extraer los azúcares fermentables de la matriz lignocelulósica de los depósitos de *P. oceanica* seca, y a continuación convertirlos a bioetanol de segunda generación. A continuación se describe brevemente cada etapa:

10 **Etapa 1.-** Pre-tratamiento mecánico de trituración, para reducir el tamaño de las fibras a un diámetro medio de partículas de 1 mm. Esta etapa tiene como objeto disminuir el grado de la polimerización de la celulosa y de la lignina, y aumentar la superficie de contacto, y por lo tanto, la accesibilidad de la celulosa y de la hemicelulosa a los diferentes reactivos.

15 **Etapa 2.-** Pre-tratamiento térmico realizado en atmósfera inerte en presencia de N₂, a una temperatura de 150°C, una presión de 1 bar, sin utilizar un agente químico, durante un tiempo de reacción de 30 minutos. Esta etapa tiene como objetivo la hidrólisis de la fracción hemicelulósica de la biomasa de *P. oceanica* y hacer que la fracción celulósica sea más accesible a la digestión enzimática
20 posterior.

Etapa 3.- Sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) mediante el empleo de una mezcla de enzimas, con las actividades endocelulasa y exocelulasa (β -glucosidasa) así como las actividades xilanasas, e inoculando las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691, para convertir
25 los disacáridos (sacarosa) y los monosacáridos fermentables en C6 (glucosa, fructosa,...) y en C5 (principalmente xilosa) procedentes de la digestión enzimática simultánea de la fracción celulósica del pre-tratamiento térmico.

Etapa 4.- Destilación (separación líquida/vapor) que tiene como objetivo aumentar el contenido de etanol en el mosto obtenido.

DESCRIPCIÓN DEL CONTENIDO DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Diagrama de las etapas del procedimiento de transformación de las fibras de *Posidonia oceanica* seca para la producción de bioetanol de segunda generación.

- 5 **Figura 2.-** Curva relativa a la isoterma de adsorción de las fibras de *Posidonia oceanica* seca, permitiendo el estudio del comportamiento de estas fibras con respecto al agua, calculando la cantidad máxima de la adsorción del agua por las fibras de *P. oceanica*.

- 10 **Figura 3.-** Evolución del rendimiento de conversión de la celulosa en glucosa de las fibras de *Posidonia oceanica* al 10% en materia seca (MS) y 100 mg/g de la enzima Ctec2.

Figura 4.- Micrografías fotónicas (3X) de las fibras de *Posidonia oceanica* brutas (a) y trituradas (b).

- 15 **Figura 5.-** Micrografías Electrónicas de Barrido (MEB) de las fibras de *Posidonia oceanica* brutas (350 X) (c) y sus poros (1500 X) (d).

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Como ya se ha comentado, los depósitos de *Posidonia oceanica* seca constituyen uno de los ecosistemas más productivos del planeta (Boudouresque et al., 2006).

- 20 Además, algunas de las características del ecosistema de *P. oceanica* son únicas y particulares en medio marino y se asemejan a los ecosistemas forestales continentales, en cuanto a la acumulación de la biomasa vegetal, formando una biomasa vegetal excepcionalmente elevada. La composición de las pelotas de *P. oceanica* seca es rica en fracciones lignocelulósicas (Khiari et al., 2010; Ncibi et al., 2009). En este contexto, esta invención tiene por objetivo valorizar y utilizar
- 25 los azúcares fermentables de *Posidonia oceanica* seca, con el fin de producir el bioetanol de segunda generación. El procedimiento propuesto tiene por objeto operar en las condiciones óptimas y favorables para mejorar el rendimiento mediante la aplicación de un pre-tratamiento mecánico, térmico, así como la

sacarificación y fermentación simultánea de la matriz lignocelulósica de *P. oceanica*.

El procedimiento propuesto para la transformación de los depósitos de *P. oceanica* seca mediante la aplicación de los pre-tratamientos mecánico y térmico, así como la sacarificación y la fermentación simultánea (SSF), seguida por una etapa de destilación, está ilustrado en el diagrama de la Figura 1.

A continuación se detalla el procedimiento aplicado a muestras de depósitos de *P. oceanica* seca procedente de las costas del Golfo de Túnez, y precisamente de las costas del suburbio meridional de Túnez.

10

Ensayo 1.- Caracterización físico-química y estructural, y pre-tratamiento mecánico de las fibras de los depósitos de *Posidonia oceanica* seca empleados.

La caracterización físico-química de los depósitos de *P. oceanica* permitió determinar la materia seca contenida en los residuos (sólidos totales), la densidad de la fibra, el volumen de inflado de las fibras dentro del agua así que la capacidad de retención del agua y del aceite. Estas características están recapituladas en la Tabla 1.

El pre-tratamiento mecánico empleado consistió en la trituración, mediante un molino de martillo (Leshan Dongchuan Machinery Co. Ltd, Sichuan).

El estudio estructural de las fibras lignocelulósicas crudas de la biomasa vegetal, previamente trituradas, se realizó mediante la observación microscópica fotónica y electrónica de barrido, MEB. Las Figuras 4 y 5 muestran la estructura fibrosa de la *P. oceanica* seca. De la misma manera, las micrografías electrónicas ponen en evidencia la uniformidad de la superficie porosa de las fibras de *P. oceanica* con un diámetro de poros de 10 μm , aproximadamente.

Tabla 1: Características físico-químicas de las fibras de los depósitos de *Posidonia oceanica* seca.

Características físico-químicas	Valores
Materia seca (%)	91,999 ± 0,318
Contenido en agua (%)	8,000 ± 0,318
Contenido en cenizas (%)	11,7335 ± 0,2518
Densidad de partículas de las fibras con respecto al iso-butanol.	0,684 ± 0,076
Volumen de inflado de las fibras dentro del agua (ml/g)	1,332 ± 0,234
Capacidad de retención del agua (g agua/ g MS)	6,233 ± 1,436
Capacidad de retención del aceite (Aceite de girasol) (mL aceite/g MS)	12,611 ± 1,952
Contenido en proteínas (%)	5,217 ± 0,172

- 5 El estudio del comportamiento de las muestras de los depósitos de *Posidonia oceanica* frente al agua se efectuó estableciendo isotermas de adsorción del vapor de agua a 20°C. La Figura 2 ilustra el diagrama de adsorción de las fibras de *P. oceanica* seca.

- El diagrama de absorción permite seguir el estado de hidratación de las fibras de *P. oceanica* en función de la actividad del agua en el medio. El contenido máximo de agua que puede fijar las fibras de *Posidonia oceanica* es del orden de 34,59% (g/100 g MS).

- La composición en α -celulosa, hemicelulosa, lignina, en carbono orgánico total (COT), en carbono inorgánico (C ing), en carbono total (C tot) y en nitrógeno total (N tot) de los depósitos de *Posidonia oceanica* seca se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2: Composición en α -celulosa, hemicelulosa, lignina, carbono orgánico total (COT), carbono inorgánico (C ing), carbono total (C tot) y nitrógeno total (N tot) de los depósitos de *Posidonia oceanica* seca.

Componente	Valor (%)
α -Celulosa	40
Hemicelulosa	19
Lignina	30
COT	$1,562 \pm 0,002$
C ing	$8,215 \pm 0,173$
C tot	$9,777 \pm 0,173$
N tot	$1,586 \pm 0,084$

5 Ensayo 2: Pre-tratamiento térmico de los depósitos de *Posidonia oceanica* seca.

Una vez trituradas y caracterizadas exhaustivamente, las muestras de los depósitos de *P. oceanica* seca han sido pre-tratadas térmicamente en un reactor a presión (Parr®, series 4600-4620) de un litro de volumen útil, equipado de válvulas de control de presión y temperatura. La regulación de la presión se hizo mediante una
 10 válvula de presión neumática con un compresor auxiliar.

El reactor a presión utilizado en esta etapa de pre-tratamiento es de tipo 'batch', sin agitación. Este reactor se llenó al 10% de su capacidad total con una suspensión de fibras al 3% en materia seca. Para generar un ambiente inerte
 15 dentro del termo reactor se empleó nitrógeno a una presión fija de 1 bar.

Las condiciones empleadas para el pre-tratamiento térmico de las fibras de los depósitos de *P. oceanica* seca empleadas fueron: Una temperatura de 150°C y un tiempo de reacción de 30 minutos en atmósfera inerte en presencia de nitrógeno.

El análisis de la composición de las fibras de los depósitos de *P. oceanica* después del pre-tratamiento térmico se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3: Análisis de la composición de las fibras de los depósitos de *Posidonia oceanica* seca antes y después el pre-tratamiento térmico.

<i>Componente</i>	<i>Antes del pre-tratamiento</i>	<i>Después del pre-tratamiento</i>
<i>Carbono total soluble (%)</i>	2,489	15,25
<i>Xilosa (%)</i>	2,670	0,672
<i>Glucosa (%)</i>	0	8,36
<i>Fructosa (%)</i>	0	7,73
<i>Sacarosa (%)</i>	0	1,87
<i>Acidez volátil total (%)</i>	0	0
<i>Hidroxi-metil-furfural (%)</i>	0	0
<i>α-Celulosa (%)</i>	40	79,94
<i>Hemicelulosa (%)</i>	19	1,32
<i>Lignina (%)</i>	30	9,67
<i>Cenizas (%)</i>	15,01	10,46

El contenido en carbono total soluble (orgánico y inorgánico) se determinó mediante un equipo automático de carbono y nitrógeno (multi N/C3100 analyzer de Analytic Jena) utilizando una fase móvil de H₃PO₄ al 10%. El contenido en azúcares se ha determinado mediante un kit enzimático. La acidez volátil total (expresada por gramos de ácido acético por cada 100 g de muestra) ha sido determinada mediante un cromatógrafo de gases (Shimadzu mod. GC2010). Los ácidos grasos volátiles de cadena corta determinados fueron: acético, propiónico, iso-butírico, butírico, iso-valérico, valérico, iso-caproico, caproico y heptanoico. El contenido en hidroxi-metil-furfural (HMF) se determinó igualmente por cromatografía gaseosa.

Ensayo 3: Sacarificación enzimática de los depósitos de *Posidonia oceanica* pre-tratados

A continuación del pre-tratamiento mecánico y térmico, se realizó un estudio de la sacarificación enzimática de las fibras de *P. oceanica* pre-tratadas. Esta hidrólisis enzimática se realizó preparando suspensiones de fibras de *P. oceanica* al 10% en materia seca con una concentración de la enzima comercial Cellic®Cet2 de 100mg/g, diluida 10 veces a un pH de 4,8 y a una temperatura de $50 \pm 1^\circ\text{C}$ mediante microincubadores con una velocidad de agitación de 150 rpm. La duración de la sacarificación enzimática fue de 72 horas.

- 10 La Cellic®Cet2 es una preparación enzimática de la empresa Novo Nordisk, con una concentración en proteínas totales de 217g/L, una actividad de papel filtro de 120,5 FPU/mL y una actividad β -glucosidasa de 2731 U/mL.

El análisis de los azúcares por cromatografía gaseosa permitió estudiar los rendimientos de conversión de la sacarificación enzimática, igualmente, el contenido en glucosa ha sido determinado con una técnica enzimática. Así, la Figura 3 muestra con detalles la generación de monómeros durante la sacarificación enzimática de las fibras de *P. oceanica* pre-tratadas.

Con este ensayo de sacarificación se alcanzó un rendimiento de conversión de celulosa a glucosa de $3,553 \pm 0,005\%$.

- 20 La composición en azúcares de las fracciones líquidas de la materia hidrolizada realizada mediante cromatografía gaseosa se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4: Composición en azúcares liberados durante la sacarificación enzimática de las fibras pre-tratadas de *Posidonia oceanica*, determinadas mediante cromatografía gaseosa.

Hidrólisis de <i>Posidonia oceanica</i> al 10% en materia seca y 100 mg/g de enzima		
Patrón 24 h	0,15	0,003
Patrón 72 h	0,322	0,167
Muestra 48h	7,476	2,147

*Los contenidos en azúcares están expresados en g/L. Las concentraciones están determinadas después de 72 horas de hidrólisis.

Ensayo 4: Sacarificación y fermentación simultaneas (SSF) de las fibras de depósitos de *Posidonia oceanica* pre-tratadas utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la enzima Cellic®Cetc2.

- 10 El objetivo perseguido para realizar la sacarificación y fermentación simuláneas (SSF) fue mejorar la eficacia del procedimiento, particularmente con respecto a la variable tiempo de reacción y de la concentración final en etanol. Para ello, se preparó una suspensión de fibras de *P. oceanica* al 12% en materia seca preparada con el tampón acetato de sodio a 50 Mm a un pH 4,82 con el 3% de
- 15 una disolución de cloranfenicol al 0,2% preparada en el tampón acetato para evitar las contaminaciones bacterianas durante la reacción y no afectar la concentración final en etanol.

Del mismo modo, se añadió al medio de la SSF una suspensión de la enzima Cellic®Cetc2 a 100 mg/g, diluida 10 veces a razón de 0,70 v/v con respecto al

20 volumen total de la reacción. Por otra parte, el medio de la reacción se inoculó al 10% con la levadura *S. cerevisiae* procedente de un medio de cultivo líquido sintético de 20 g/L de azúcares a pH de 4,82 cuya composición es la siguiente: extracto de levadura (4,00 g/L), peptona de caseína (3,60 g/L), (NH₄)₂SO₄ (3,00

g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,05 g/L), KH_2PO_4 (2,00 g/L), xilosa (5 g/L), glucosa (10 g/L), fructosa (2,5 g/L) y sacarosa (2,5 g/L). Para favorecer el crecimiento de *S. cerevisiae* durante la SSF, se añadió un medio de cultivo líquido sintético concentrado 25 veces con una concentración de 0,025 v/v con respecto al volumen total. La composición de este medio de cultivo consta de extracto de levadura (50g/L), peptona de caseína (45 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (37,5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (25,625 g/L), KH_2PO_4 (25 g/L). El medio se ajusta a un pH de 4,82.

La SSF se desarrolló en un micro-incubador operando a una temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$, con agitación fija a 150 rpm durante 120 horas (5 días).

La producción de etanol obtenida al final del proceso de SSF se analizó mediante cromatografía gaseosa, y un kit enzimático (Böehringer Mannheim, Ref. 716251) adaptado que permite calcular el rendimiento final de la conversión de glucosa al etanol. El rendimiento obtenido fue próximo al 22% con respecto al rendimiento de la conversión teórica. La concentración final obtenida en etanol fue de 0,2 g/L.

15

Ensayo 5: Sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) de las fibras de los depósitos de *Posidonia oceanica* pre-tratadas con un cultivo de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691, y la enzima Cellic®Cetc2

En este ensayo se probó la posibilidad de convertir a la vez los diferentes azúcares en C6 (glucosa y fructosa) y en C5 (xilosa), así como los disacáridos (sacarosa) producidos durante la digestión enzimática. Este objetivo se alcanzó mediante el empleo de un cultivo mixto de dos levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* y *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 durante la SSF.

Con el fin de lograr este objetivo, se elaboró un protocolo experimental del establecimiento de la SSF similar al empleado en el ensayo 4, sobre el que se aplicaron las modificaciones siguientes: la inoculación se realizó al 10% con un cultivo mixto de las dos levaduras en proporciones del 47% y 53% de *P. tannophilus* y *S. cerevisiae*, respectivamente.

La concentración final de etanol producido se determinó por cromatografía gaseosa (GC) y con el kit enzimático adaptado, esta concentración fue del orden de 0,2 g/L.

5 **Ensayo 6: Destilación**

El objetivo de esta última etapa de destilación es aumentar la concentración de etanol en el producto final de la fermentación. La etapa de destilación simple consta de una separación líquido-vapor de los componentes de la mezcla obtenida en la etapa anterior mediante una sucesión de vaporización y condensación
10 llevando la mezcla a ebullición (o vaporización) del etanol, cuyo punto de ebullición a una atmósfera es 78,2 °C.

APLICACIÓN INDUSTRIAL

Los sectores industriales que pueden beneficiarse de esta invención son:

- 15 - Las empresas que operan en el campo de los biocarburantes, las energías renovables o alternativas, las empresas biotecnológicas.
- Las empresas de combustibles fósiles que desean desarrollar la nueva rama de las nuevas energías.
- Todas las industrias que tratan residuos ricos en lignocelulosas, celulosa
20 (industria del papel), y polisacáridos (industria del almidón).
- Cualquier empresa de servicio de recogida de residuos agrícolas y marinos (especialmente las macroalgas marinas, las plantas marinas halófitas que acumulan la sal marina y que constituyen una biomasa lignocelulósica marina), etc....

25

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la transformación de *Posidonia oceanica* seca para producir bioetanol de segunda generación, que comprende la realización de las siguientes etapas:
 - a) Pre-tratamiento mecánico de trituración de las fibras, para reducir su tamaño a un diámetro medio de partículas menor o igual a 1 mm.
 - b) Pre-tratamiento térmico realizado en atmósfera inerte en presencia de nitrógeno (N₂), a una temperatura de 150°C, una presión de 1 bar, sin utilizar un agente químico, durante un tiempo de reacción de 30 minutos.
 - c) Sacarificación y fermentación simultánea (SSF) mediante el empleo de una mezcla enzimática, con las actividades endocelulasa y exocelulasa (β -glucosidasa) así como las actividades xilanasas, e inoculando el medio de reacción con las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691, para convertir los disacáridos (sacarosa) y los monosacáridos fermentables en C6 (glucosa, fructosa,...) y en C5 (principalmente xilosa) procedentes de la digestión enzimática simultánea de la fracción celulósica del pre-tratamiento térmico.
 - d) Destilación (separación líquida/vapor) para aumentar el contenido en alcohol del mosto obtenido.
2. Procedimiento para la transformación de *P. oceanica* seca para producir bioetanol de segunda generación, según la reivindicación 1, caracterizado por el pre-tratamiento térmico realizado en un reactor a presión, tipo 'batch' sin agitación, lleno al 10% de su capacidad total con una suspensión de fibras al 3% en materia seca, con las siguientes condiciones de funcionamiento: presión de 1 bar, 150°C de temperatura y un tiempo de reacción de 30 minutos en atmósfera inerte en presencia de nitrógeno.

3. Procedimiento para la transformación de *P. oceánica* seca para producir bioetanol de segunda generación, según la reivindicación 1, caracterizado por la utilización de una concentración del 12% en materia seca de las
5 fibras de *P. oceanica* empleada en la etapa de sacarificación y fermentación simultánea con el tampón acetato de sodio a 50 Mm, a un pH 4,82, con el 3% de disolución de cloranfenicol al 0,2% preparada en el tampón acetato.
- 10 4. Procedimiento para la transformación de *P. oceanica* seca para producir bioetanol de segunda generación, según las reivindicaciones 1 y 3, caracterizado por la adición de una suspensión de la enzima Cellic®Cetc2 a 100 mg/g , diluida 10 veces a razón de 0,70 v/v con respecto al volumen
15 total de la reacción en la etapa de sacarificación y fermentación simultánea, a las fibras de *P. oceanica* seca.
5. Procedimiento para la transformación de *P. oceanica* seca para producir bioetanol de segunda generación, según las reivindicaciones 1, 3 y 4, caracterizado por la inoculación al 10% del medio de la reacción con un
20 cultivo mixto de dos levaduras en proporciones del 47% y 53%, respectivamente, de *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 y *Saccharomyces cerevisiae* a pH de 4,82.
- 25 6. Procedimiento para la transformación de *P. oceanica* seca para producir bioetanol de segunda generación, según la reivindicación 5, caracterizado porque la composición del medio de cultivo líquido sintético que contiene las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 es extracto de levadura (4,00 g/L), peptona de caseína (3,60 g/L),
(NH₄)₂SO₄ (3,00 g/L), MgSO₄ 7H₂O (2,05 g/L), KH₂PO₄ (2,00 g/L),
30 xilosa (5 g/L), glucosa (10 g/L), fructosa (2,5 g/L), y sacarosa (2,5 g/L).

7. Procedimiento para la transformación de *P. oceanica* seca para producir bioetanol de segunda generación, según la reivindicación 6, caracterizado porque para favorecer el crecimiento de las levaduras *S. cerevisiae* y *P. tannophilus* durante la SSF, se añade un medio de cultivo líquido sintético concentrado 25 veces con una concentración de 0,025 v/v con respecto al volumen total, con la siguiente composición: extracto de levadura (50g/L), peptona de caseína (45 g/L), (NH₄)₂SO₄ (37,5 g/L), MgSO₄ 7H₂O (25,625 g/L), KH₂PO₄ (25 g/L). El medio se ajusta a un pH de 4,82.
8. Procedimiento para la transformación de *P. oceánica* seca para producir bioetanol de segunda generación, según las reivindicaciones de 1 a 7, caracterizado porque la etapa de sacarificación y fermentación simultánea se realiza en un micro-incubador operando a una temperatura de 35 ± 1°C, con agitación fija a 150 rpm durante 120 horas (5 días).

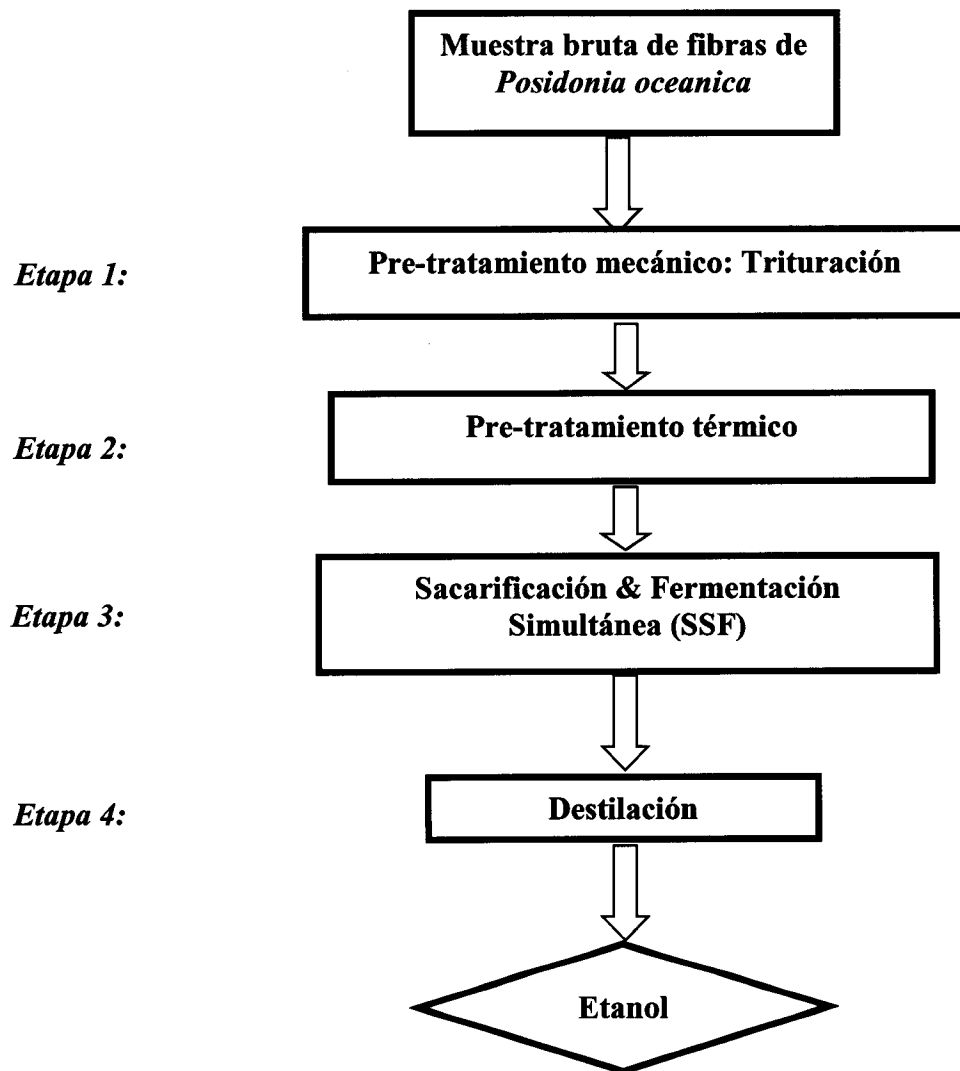


Figura 1

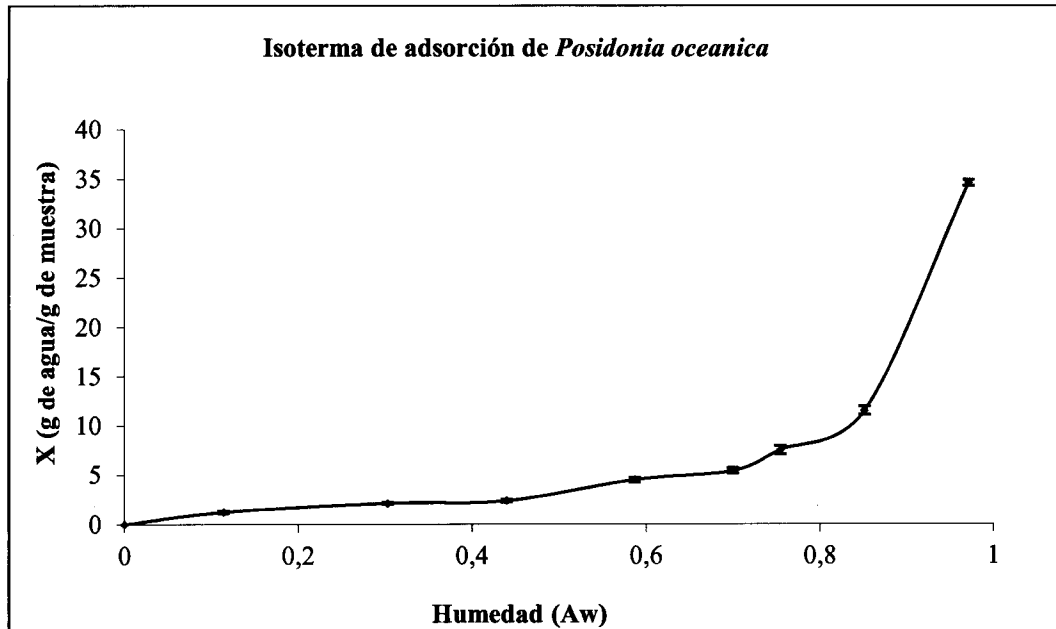


Figura 2

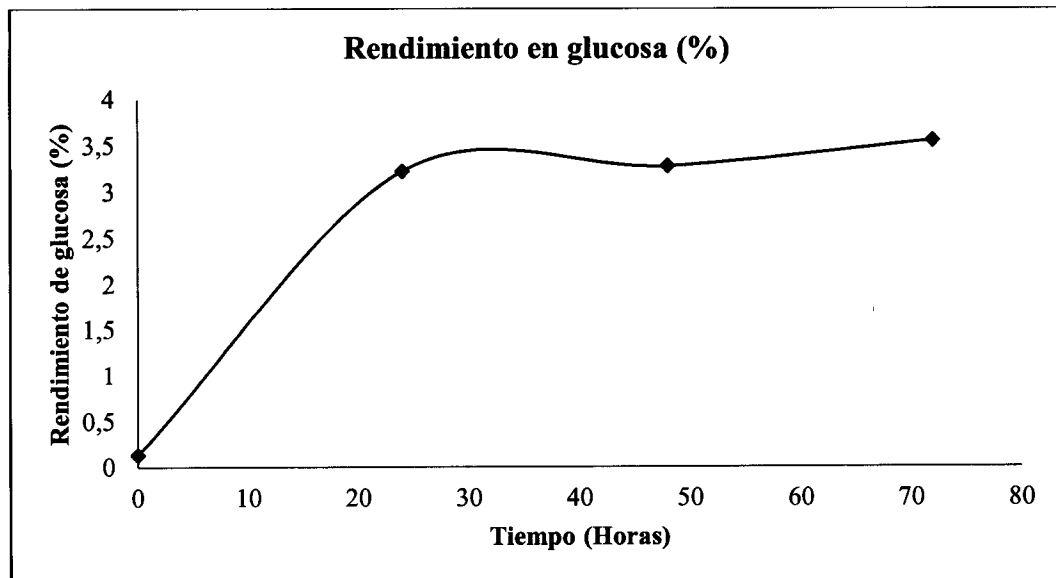


Figura 3

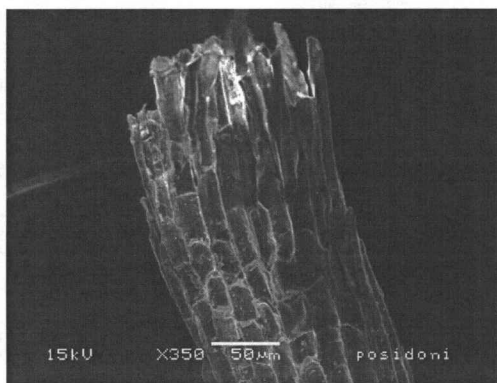


(a)

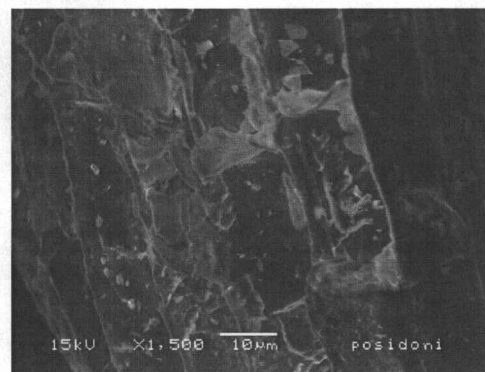


(b)

Figura 4



(c)



(d)

Figura 5



- ②① N.º solicitud: 201400441
②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.05.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12P7/10** (2006.01)
C12R1/185 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PILAVTEPE, M; CELIKTAS, M S; SARGIN S, YESIL-CELIK TAS, O. Transformation of <i>Posidonia oceanica</i> residues to bioethanol. Industrial Crops and Products, 2013; vol. 51, páginas 348-354. ISSN: 0926-6690. Doi: 10.1016/j.indcrop.2013.09.020	1,2,4-8
A	PETERSEN M O, et al. "Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals". Biomass and Bioenergy, 2009, vol. 33, nº 5, páginas 834-840. ISSN: 0961-9534. Doi: 10.1016/j.biombioe.2009.01.004	1,2
A	KUMAR P, BARRET D M, DELWICHE M J, STROEVE P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. Ind. Eng. Chem. Res., 2009; vol. 48, nº 8, páginas 3713-3729. Doi: 10.1021/ie801542g	1,2
A	ALVIRA P, TOMAS-PEJÓ E, BALLESTERO M, NEGRO M J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresource Technology, 2010; vol. 101, nº 13, páginas 4851-4861. ISSN 0960-8524. Doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.093	1,2
A	YE SUN, JIAYANG CHENG. Hydrolysis of Lignocellulosic materials for ethanol production: A review. Bioresource Technology, 2002; vol. 83, nº 1, páginas 1-11. ISSN 0960-8524. Doi: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7	1,2
A	WO 2009102609 A1 (UNIVERSITY LOUISIANA STATE) 20.08.2009, página 3, [0007]; página 6, [0017]-[0021],[0023],[0024]; página 13, [0037].	1,2

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
04.02.2015

Examinador
A. Sukhwani

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, X-FULL, NPL, CAPLUS, ENERGY, PASCAL, SCISEARCH

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.02.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1 - 8	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1 - 8	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

La presente invención tiene por objeto un procedimiento para la transformación de *Posidonia oceanica* para producir bioetanol de segunda generación que comprende las etapas (reivindicación 1):

- Pre-tratamiento mecánico de trituración de fibras para reducirlas a partículas de 1 mm.
- Pre-tratamiento térmico en atmósfera inerte en presencia de N₂ a 150°C, presión de 1 bar, durante 30 minutos,
- Sacarificación y fermentación simultánea (SSF) mediante el empleo de una mezcla enzimática, inoculando levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pachysolen tannophilus*,
- Destilación

El pre-tratamiento térmico se realiza en un reactor a presión sin agitación, lleno al 10% de su capacidad con una suspensión de fibras al 3% de materia seca y a presión de 1 bar, temperatura de 150°C durante 30 minutos (reiv. 2) y la concentración de en la etapa c) es de 12% en materia seca de fibras de *Posidonia oceanica* con tampón de acetato de sodio a pH 4,82 con el 3% de disolución de cloranfenicol al 0,2% preparada en el tampón acetato (reiv. 3).

Simultáneamente se añade una suspensión de la enzima CellicCet2 a 100 mg/g (reiv. 4) y al medio de la reacción se inocula al 10% con un cultivo mixto de dos levaduras con proporciones del 47% y 53%, respectivamente, de *Pachysolen tannophilus* y *Saccharomyces cerevisiae* (reiv. 5). La composición de este medio de cultivo es de un extracto de levadura, peptona de caseína, etc. (reiv. 6), al que se le puede añadir un medio de cultivo líquido sintético concentrado 25 veces para favorecer el crecimiento de las levaduras (reiv. 7).

Por último, la etapa de sacarificación y fermentación simultánea se realiza en un micro-incubador a appx. 35°C con agitación fija a 150 rpm durante 120 horas (5 días) (reiv. 8).

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	PILAVTEPE, M; CELIKTAS, M S; SARGIN, S YESIL-CELIK TAS, O. Transformation of <i>Posidonia oceanica</i> residues to bioethanol. Industrial Crops and Products, 2013; vol. 51, páginas 348-354	2013
D02	PETERSEN M O, et al. "Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals". Biomass and Bioenergy, 2009, vol. 33, nº 5, páginas 834-840.	2009
D03	KUMAR, P, BARRET, D M, DELWICHE, M J, STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. Ind. Eng. Chem. Res., 2009; vol. 48, nº 8, páginas 3713-3729	2009
D04	ALVIRA P, TOMAS-PEJÓ E, BALLESTERO M, NEGRO M J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresource Technology, 2010; vol. 101, nº 13, páginas 4851-4861	2010
D05	YE SUN, JIAYANG CHENG. Hydrolysis of Lignocellulosic materials for ethanol production: A review. Bioresource Technology, 2002; vol. 83, nº 1, páginas 1-11.	2002
D06	WO 2009102609 A1 (UNIVERSITY LOUISIANA STATE)	20.08.2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

NOVEDAD

Los documentos citados **D01** a **D06** se refieren a la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica siendo el más relevante **D01** porque utiliza residuos de la misma planta. En efecto:

- **D01** se refiere a la transformación de residuos de *Posidonia oceanica* en bioetanol con un pre-tratamiento ácido de la biomasa, hidrólisis enzimática con el mismo preparado Cellic CTec2 reivindicado, fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* con la composición del medio de cultivo con extracto de levadura, peptona, etc., en condiciones de agitación de 150 rpm (página 349, párrafos 2.4.1., 2.5.1) y con levaduras como *Pachysolen tannophilus* o *Saccharomyces cerevisiae* (página 352, primera columna, primer párrafo), si bien coinciden en muchas características técnicas, no divulga la atmósfera inerte de N₂, sin utilizar un agente químico ni el cultivo mixto con ambas levaduras a la vez, tal como lo hace la solicitud en estudio, por lo que no anticipa la invención y se considera un documento del estado de la técnica para las reivindicaciones 1, 2, 4-8.

- **D02** se refiere a la optimización de un pre-tratamiento hidrotermal sin adición de químicos, seguido de SSF, como lo hace la solicitud en estudio pero el sustrato de partida es la paja de trigo (página 834-839) por lo que tampoco anticipa la invención.

Los documentos **D03** a **D06** se consideran del estado de la técnica porque recogen distintos pre-tratamientos de biomasa lignocelulósica pero el sustrato de partida no es *Posidonia oceanica* y tampoco utilizan el cultivo mixto de levaduras *Pachysolen tannophilus* y *Saccharomyces cerevisiae*, por lo que ninguno anticipa la invención.

Por ello, a la vista de los documentos D01 a D06, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 8** son nuevas de acuerdo con el Artículo 6 LP 11/86.

ACTIVIDAD INVENTIVA

El procedimiento objeto de la invención de la transformación de residuos de *Posidonia oceanica* para producir bioetanol no resulta evidente para el experto en la materia, a la vista de los documentos citados **D01** a **D06**, siendo el más relevante **D01**. En efecto:

- **D01** divulga la utilización de la biomasa de *Posidonia oceanica* en condiciones muy parecidas pero en el pre-tratamiento utiliza un compuesto químico ácido que en la invención no se utiliza, además, en **D01** no se divulga el cultivo mixto de levaduras *Pachysolen tannophilus* y *Saccharomyces cerevisiae*, tal como lo hace la solicitud en estudio

El resto de los documentos citados utilizan otras condiciones de pre-tratamiento y no parten de esta especie ni tampoco utilizan el cultivo mixto de levaduras, por lo que el experto en la técnica no tendría base para elegir este sustrato, las mismas condiciones de pre-tratamiento ni el cultivo mixto reivindicado.

Por ello, a la vista de los documentos D01 a D06, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 8** tienen actividad inventiva según el Artículo 8 LP 11/86.