

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 605**

51 Int. Cl.:
C12M 1/02 (2006.01)
C12M 1/10 (2006.01)
C12M 1/16 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)
C12P 19/00 (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01)
C12P 19/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05818844 .2**
96 Fecha de presentación: **07.11.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1828373**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2007**

54 Título: **HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BIOMASAS QUE TIENEN UN ALTO CONTENIDO DE MATERIA SECA (MS).**

30 Prioridad:
29.11.2004 DK 200401854

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.12.2011

73 Titular/es:
INBICON A/S
KRAFTVÆERKSVEJ 53 SKÅRBÅK
7000 FREDERICIA, DK

72 Inventor/es:
FELBY, Claus;
LARSEN, Jan;
JØRGENSEN, Henning y
VIBE-PEDERSEN, Jakob

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 605 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

Hidrólisis enzimática de biomásas que tienen un alto contenido de materia seca (MS)

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para licuefacción y sacarificación de biomásas que contienen polisacáridos, que tienen un alto contenido de materia seca y preferentemente que poseen fibras y partículas con tamaños medios grandes. La presente invención permite la utilización adicional de tales biomásas procesadas, por ejemplo para fermentación posterior en bioetanol, carbohidratos especializados para alimento y pienso así como materia prima de carbono para el procesamiento en plásticos y agentes químicos.

Antecedentes de la invención

10 Numerosos procedimientos industriales y agrícolas por ejemplo actividades municipales, procesamiento de pienso y alimentos y explotación forestal generan biomásas, residuos y productos secundarios que contienen azúcares poliméricos por ejemplo en forma de almidón, celulosa y hemicelulosa. Los negocios agrícolas y las industrias químicas así como organizaciones públicas tienen considerable interés en desarrollar procedimientos para convertir tales biomásas en materiales de un valor mayor. Por lo tanto, como ejemplo tales biomásas podrían potencialmente
15 convertirse en bioetanol, biogás o agentes químicos usando microorganismos y/o enzimas hidrolíticas. Sin embargo, la mayoría de los procedimientos conocidos actualmente no han alcanzado práctica comercial a gran escala debido a su alto coste de producción y alta demanda energética y por lo tanto viabilidad económica incierta inherente.

Además de ser importantes como alimento y pienso, los carbohidratos de biomasa pueden usarse como materia prima para varios procedimientos industriales. En forma de polímeros un producto bien conocido es el papel en el
20 que la celulosa es el componente principal. Sin embargo, cuando se procesan en oligómeros y monómeros los carbohidratos son una materia prima importante para varios procedimientos industriales. Como se describirá en detalle son necesarios para varios procedimientos microbianos, pero además pueden usarse como materia prima para por ejemplo procesamiento enzimático en carbohidratos especializados para alimento y piensos, por ejemplo trehalosa. Además los oligómeros y monómeros de carbohidratos pueden sustituir compuestos pretróquímicos para
25 procesamiento en plásticos y agentes químicos orgánicos. Además, los carbohidratos pueden usarse como vehículos de hidrógeno en la hidrogenación catalítica.

Es por lo tanto evidente que si puede ponerse a disposición una fuente de bajo coste y abundante de carbohidratos procesados para procesamiento industrial esto puede tener un potencial económico sustancial.

30 El almidón es el carbohidrato de almacenamiento más ampliamente extendido en plantas y se produce en forma de gránulos, que difieren notablemente en tamaño y características físicas de especie a especie. Los gránulos de almidón son generalmente bastante resistentes a la penetración por tanto agua como enzimas hidrolíticas debido a la formación de enlaces de hidrógeno dentro de la misma molécula y con otras moléculas vecinas. Sin embargo, estos enlaces inter- e intra-hidrógeno pueden hacerse débiles a medida que aumenta la temperatura de la suspensión. Cuando una suspensión acuosa de almidón se calienta, los enlaces de hidrógeno se debilitan, se
35 absorbe agua y los gránulos de almidón se hinchan. Este proceso se llama habitualmente gelatinización debido a que la solución formada tiene una consistencia gelatinosa altamente viscosa. Químicamente, el almidón es un polímero natural de la glucosa que es generalmente insoluble pero dispersable en agua a temperatura ambiente y compuesto de una unidad repetida similar a la de celulosa y enlazada entre sí por enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6, a diferencia de los enlaces glucosídicos β -1,4 para celulosa. Las unidades forman un componente de cadena lineal, llamado amilosa, o un componente de cadena ramificada, llamado amilopectina. La mayoría de las semillas, granos y tubérculos vegetales contienen aproximadamente 20-25 % de amilosa. Pero algunos, como por ejemplo almidón de guisante tienen 60 % de amilosa y ciertas especies de maíz tienen 80 % de amilosa. Las variedades cerosas de granos, tales como arroz, son bajas en amilosa.

45 Aparte del almidón los tres componentes principales en la biomasa vegetal son celulosa, hemicelulosa y lignina, que se denominan habitualmente por el término genérico lignocelulosa. Las biomásas que contienen polisacáridos como una expresión genérica incluyen biomásas tanto de almidón como lignocelulósicas.

La celulosa, hemicelulosa y lignina están presentes en diversas cantidades en diferentes plantas y en las diferentes partes de la planta y se asocian de forma íntima para formar el armazón estructural de la planta.

50 La celulosa es un homopolisacárido compuesto completamente de D-glucosa ligada entre sí mediante enlaces β -1,4-glicosídicos y con un grado de polimerización de hasta 10.000. La estructura lineal de la celulosa permite la formación de enlaces de hidrógeno tanto intra- como intermoleculares, que dan como resultado la agregación de cadenas de celulosa en microfibrillas. Las regiones dentro de las microfibrillas con orden alto se denominan cristalinas y las reacciones menos ordenadas se denominan amorfas. Las microfibrillas se ensamblan en fibrillas, que después forman las fibras de celulosa. La estructura parcialmente cristalina de la celulosa junto con la
55 disposición en microfibrillas, proporciona a la celulosa alta resistencia a tracción, hace a la celulosa insoluble en la mayoría de disolventes y parcialmente responsable de la resistencia de la celulosa contra la degradación microbiana, es decir hidrólisis enzimática.

La hemicelulosa es un polisacárido heterogéneo complejo compuesto de varios restos monoméricos: D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-xilosa, L-arabinosa, ácido D-glucurónico y ácido 4-D-metil-D-glucurónico. La hemicelulosa tiene un grado de polimerización por debajo de 200, tiene cadenas laterales y puede estar acetilada. En madera blanda como abetos, pinos y picea, galactoglucomanano y arabino-4-O-metil-glucuronoxilano son las fracciones de hemicelulosa principales. En madera dura como abedul, chopo, álamo temblón o roble, 4-O-acetil-4-metil-glucuronoxilano y glucomanano son los principales componentes de hemicelulosa. Las hierbas como arroz, trigo, avena y pasto varilla tiene hemicelulosa compuesta principalmente de glucuronoarabinoxilano.

La lignina es una red compleja formada por polimerización de unidades de fenil propano y constituye la fracción no polisacárida más abundante en lignocelulosa. Los tres monómeros en lignina son alcohol de *p*-coumarilo, alcohol de coniferilo y alcohol de sinapilo y se unen más frecuentemente a través de enlaces de aril gliceril- β -aril éter. La lignina se une a hemicelulosa e incluye los carbohidratos ofreciendo de este modo protección contra degradación microbiana y química.

Como se ha indicado anteriormente las biomásas procesadas podrían potencialmente convertirse en bio-etanol o agentes químicos usando microorganismos y/o enzimas hidrolíticas o los carbohidratos de las biomásas procesadas podrían usarse como materia prima para varios procedimientos industriales, por ejemplo procesamiento enzimático en carbohidratos especializados para alimento y pienso o como sustitutos para agentes petroquímicos en la producción de plásticos y agentes químicos orgánicos. Además el procesamiento de carbohidratos en las biomásas de acuerdo con la presente invención puede combinarse con separación y fraccionamiento de los componentes no carbohidratos. Un uso particularmente preferido de un procedimiento de acuerdo con la presente invención es una parte integrada de un procedimiento para producción de bio-etanol.

La producción de bio-etanol de biomásas que contienen polisacáridos puede dividirse en tres etapas: 1) pre-tratamiento, 2) hidrólisis de los polisacáridos en carbohidratos fermentables y 3) fermentación de los carbohidratos.

Se requiere pre-tratamiento si la hidrólisis posterior (por ejemplo hidrólisis enzimática) de los polisacáridos requiere la descomposición de una estructura de otro modo protectora (por ejemplo lignina) de los materiales vegetales. Se conocen varias técnicas de pre-tratamiento. Para cereales y granos, este pre-tratamiento puede ser en forma de una molienda seca sencilla para hacer a las superficies accesibles, pero para biomásas lignocelulósicas se necesitan también procedimientos térmicos y/o químicos. Una biomasa que contiene polisacáridos que consiste en, por ejemplo, almidón refinado no requiere dichos procedimientos de pre-tratamiento antes del procesamiento enzimático. Los procedimientos de pre-tratamiento pueden basarse en hidrólisis ácida, explosión de vapor, oxidación, extracción con compuestos alcalinos o etanol, etc. Una característica habitual de las técnicas de pre-tratamiento es que en combinación con la acción de posibles reactivos añadidos aprovechan el reblandecimiento y pérdida de materiales vegetales que se produce a temperaturas por encima de 100 °C.

Después del pre-tratamiento, la siguiente etapa en la utilización de biomásas que contienen polisacáridos para la producción de bio-etanol u otros agentes bioquímicos es hidrólisis del almidón liberado, celulosa y hemicelulosa en azúcares fermentables. Si se realiza enzimáticamente esto requiere un gran número de enzimas diferentes con diferentes modos de acción. Las enzimas pueden añadirse de forma externa o puede proporcionarlas microorganismos que crecen en la biomasa.

La celulosa se hidroliza a glucosa por las celulasas carbohidrolíticas. El entendimiento prevalente del sistema celulolítico divide las celulasas en tres clases; exo-1,4- β -D-glucanasas o celobiohidrolasas (CBH) (EC 3.2.1.91), que escinden unidades de celobiosa de los extremos de cadenas de celulosa; endo-1,4- β -D-glucanasas (EG) (EC 3.2.1.4), que hidrolizan enlaces β -1,4-glucosídicos internos de forma aleatoria en la cadena de celulosa; 1,4- β -D-glucosidasa (EC 3.2.1.21), que hidroliza celobiosa a glucosa y también escinde unidades de glucosa de celooligosacáridos.

Los diferentes azúcares en hemicelulosa se liberan por las hemicelulasas. El sistema hemicelulítico es más complejo que el sistema celulolítico debido a la naturaleza heteróloga de la hemicelulosa. El sistema implica entre otras endo-1,4- β -D-xilanasas (EC 3.2.1.8), que hidrolizan enlaces internos en la cadena de xilano; 1,4- β -D-xilosidasas (EC 3.2.1.37), que atacan a xilooligosacáridos del extremo no reductor y liberan xilosa; endo-1,4- β -D-mananasas (EC 3.2.1.78), que escinden enlaces internos; 1,4- β -D-manosidasas (EC 3.2.1.25), que escinden manooligosacáridos a manosa. Los grupos laterales se retiran por varias enzimas; α -D-galactosidasas (EC 3.2.1.22), α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), α -D-glucuronidasas (EC 3.2.1.139), cinamoil esterases (EC 3.1.1.-), acetil xilan esterases (EC 3.1.1.6) y feruloil esterases (EC 3.1.1.73).

Las enzimas más importantes para su uso en hidrólisis de almidón son alfa-amilasas (1,4- α -D-glucan glucanohidrolasas, (EC 3.2.1.1). Estas son hidrolasas de endo-actuación que escinden enlaces 1,4- α -D-glucosídicos y pueden eludir pero no pueden hidrolizar puntos de ramificación 1,6- α -D-glucosídicos. Sin embargo, también pueden usarse glucoamilasas de exo-actuación tales como beta-amilasa (EC 3.2.1.2) y pululanasa (EC 3.2.1.41) para hidrólisis de almidón. El resultado de la hidrólisis de almidón es principalmente glucosa, maltosa, maltotriosa, α -dextrina y diversas cantidades de oligosacáridos. Cuando se usa el hidrolizado basado en almidón para fermentación puede ser ventajoso añadir enzimas proteolíticas. Tales enzimas pueden evitar la floculación del microorganismo y pueden generar aminoácidos disponibles para el microorganismo.

En combinación con pre-tratamiento e hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósicas, se ha descubierto que el uso de enzimas oxidativas puede tener un efecto positivo en la hidrólisis global así como la viabilidad de los microorganismos empleados para por ejemplo fermentación posterior. La razón de este efecto es la articulación oxidativa de ligninas y otros inhibidores fenólicos causada por las enzimas oxidativas. Típicamente se emplean lacasa (EC 1.10.3.2) o peroxidasa (EC 1.11.1.7) externamente o por incorporación de un gen de lacasa en el microorganismo aplicado.

La hidrólisis enzimática de biomasa se ha descrito anteriormente. Sin embargo, en el caso de biomasa lignocelulósicas solamente el material que consiste en fibras y partículas con un tamaño medio por debajo de 25,4 mm y que tienen además un contenido de materia seca relativamente bajo, es decir por debajo del 20 % (p/p), se han hidrolizado exitosamente por un procedimiento tal. El documento US4409329 describe hidrólisis de material celulósico sólido a azúcar, en el que la celulosa se hidroliza a azúcares sencillos tratando una suspensión granular de 3-20 % (p/p) de pienso sólido que contiene celulosa 30-80 % (p/p), con un complejo enzimático de celulasa. La reserva de carga que contiene celulosa sólida tenía un tamaño de partícula medio de 0,0254-25,4 mm de diámetro. Se usaron hojas de rotor perforadas para la mezcla.

El documento US2002117167A describe hidrólisis enzimática de hemicelulosa en material de biomasa, que comprende solubilizar al menos una parte de hemicelulosa e hidrolizar la hemicelulosa solubilizada para producir al menos un monosacárido. La biomasa utilizada es preferentemente suspensión acuosa de materia prima o pre-tratada. El material de biomasa puede ser cualquier material celulósico que incluya hemicelulosa. El procedimiento se describe como especialmente eficaz con fibras de grano tales como maíz, trigo, arroz, avena o cebada.

El documento US2004005674A describe un procedimiento para hidrólisis enzimática de lignocelulosa. La degradación de lignocelulosa a azúcares comprende poner en contacto la lignocelulosa con al menos una enzima auxiliar y al menos una celulasa. El material lignocelulósico se molió (el tamaño de fibra medio del material no se especificó más) y tenía un contenido de materia seca bajo (0,2 g de material de hojas y tronco molido en 10 ml de la solución enzimática).

Monagheghi, A. y col.: "High solids simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol", Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 33, Nº 2, 1 de mayo de 1992, páginas 67-81, desvela un procedimiento en el que la biomasa que tiene un contenido de materia seca inicial de 21,1-32,3 % al comienzo de la mezcla/hidrólisis a) se somete a hidrólisis combinada usando una solución enzimática de celulasa, opcionalmente complementada con beta-glucosidasa, en un fermentador rotatorio sencillo y b) se somete simultáneamente a fermentación de los sacáridos formados durante la reacción de hidrólisis.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para licuefacción y sacarificación de biomasa que contienen polisacáridos que comprenden biomasa lignocelulósica, caracterizándose dicho procedimiento por que dicha biomasa se somete a hidrólisis enzimática combinada usando al menos una celulasa y mezclando con un mezclador de caída libre tal como un tambor mezclador o mezclador rotatorio que proporciona procesamiento mecánico y/o degradación de la biomasa de modo que como en el procedimiento, la biomasa se licua y se sacarifica a un líquido adecuado para procesamiento adicional tal como fermentación, en el que la biomasa tiene un contenido de materia seca de entre 20 % y 40 % al comienzo de la mezcla/hidrólisis.

Las biomasa preferentemente consisten en fibras y partículas relativamente grandes preferentemente con una distribución de tamaños de fibra y partícula en la que al menos 20 % de la biomasa varía entre 27 y 70 mm. Además, el procedimiento es particularmente adecuado para la licuefacción y sacarificación de biomasa que contienen polisacáridos que consisten principalmente en almidón, almidón refinado, celulosa, hemicelulosa y lignina, por ejemplo granos o paja de trigo. En el caso de biomasa lignocelulósicas estas se pre-tratan preferentemente sometiéndolas a temperaturas entre 110 y 250 °C durante 1-60 minutos de manera que asegure la accesibilidad de la celulosa a las enzimas y al mismo tiempo asegure un contenido limitado de inhibidores de fermentación en la biomasa pre-tratada. La presente invención combina hidrólisis enzimática basada en la combinación de enzimas hidrolíticas que incluyen una enzima carbohidrolítica y una enzima oxidativa con un tipo de mezcla basada en el principio de gravedad asegurando la aplicación de fuerzas mecánicas, principalmente fuerzas de cizallamiento y desgarramiento, a las biomasa. Los tipos preferidos de mezclas son por ejemplo mezcladores de caída libre tales como tambores mezcladores, mezcladores rotatorios o dispositivos de mezclas similares.

Descripción de la invención

La producción de soluciones de azúcar concentradas es beneficiosa en relación con fermentación posterior u otros procedimientos microbianos debido a mejora de la productividad volumétrica y reducción del coste de procesamiento corriente abajo. En el caso de producción de bio-etanol, el requisito energético para la destilación se reduce significativamente si el caldo de fermentación contiene más de 4 % de etanol (Galbe y Zacchi, 2002) esto requiere una concentración de azúcar por encima del 8 %, que con la mayoría de los tipos de biomasa lignocelulósicas corresponde a un contenido de materia seca inicial por encima del 20 %. En otras palabras es deseable someter a las biomasa que contiene polisacáridos con altos contenidos de materia seca, preferentemente por encima del 20

%, a hidrólisis enzimática para poder producir posteriormente caldos de fermentación que contienen bio-etanol adecuados para destilación de etanol.

5 Los procedimientos de la presente invención proporcionan un grado de hidrólisis enzimática de típicamente 30-50 %. Sin embargo, en condiciones optimizadas puede obtenerse un grado aún mayor de hidrólisis enzimática. La biomasa licuada y sacarificada contendrá en consecuencia cantidades relativamente grandes de glucosa, xilosa, celobiosa, lignina, celulosa no degradada y hemicelulosa y enzimas aún activas adecuadas para procesamiento adicional es decir procedimientos de fermentación (etanol, ácido láctico, etc.). La biomasa licuada también será adecuada para gasificación, hidrogenación, síntesis orgánica o producción de biogás y piensos.

10 Si las biomásas que contienen polisacáridos son lignocelulósicas el pre-tratamiento debe asegurar que la estructura del contenido lignocelulósico se haga más accesible a las enzimas y al mismo tiempo las concentraciones de productos secundarios inhibidores perjudiciales tales como ácido acético, furfural e hidrometil furfural permanezcan sustancialmente bajas. Existen varias estrategias para conseguir esto, que implican someter al material lignocelulósico a temperaturas entre 110 y 250 °C durante 1-60 minutos, por ejemplo:

- Extracción en agua caliente
- 15 • Hidrólisis ácida de dilución multietapa, que retira el material disuelto antes de que se formen sustancias inhibidoras
- Hidrólisis ácida diluida a condiciones de gravedad relativamente bajas
- Oxidación húmeda alcalina
- Explosión de vapor
- 20 • Casi cualquier pre-tratamiento con detoxificación posterior

Las biomásas que contienen polisacáridos de acuerdo con la presente invención incluyen cualquier material que contenga azúcares poliméricos por ejemplo en forma de almidón así como almidón refinado, celulosa y hemicelulosa. Se prefieren biomásas que tengan un contenido de materia seca por encima del 20 %.

25 Los tipos relevantes de biomásas para hidrólisis enzimática y mezcla de acuerdo con la presente invención pueden incluir biomásas derivadas de cultivos agrícolas tales como por ejemplo:

- Almidón, por ejemplo granos que contienen almidón y almidón refinado
- Hojas y tronco de maíz
- Bagazo
- Paja, por ejemplo de arroz, trigo, centeno, avena, cebada, centeno, colza, sorgo
- 30 • Madera blanda, por ejemplo *Pinus sylvestris*, *Pinus radiata*
- Madera dura, por ejemplo *Salix spp.* *Eucalyptus spp.*
- Tubérculos, por ejemplo remolacha, patata
- Cereales de, por ejemplo, arroz, trigo, centeno, avena, cebada, centeno, colza, sorgo y maíz
- 35 • Papel residual, fracciones de fibra de procesamiento de biogás, estiércol, restos de procesamiento de palma oleaginoso, residuos sólidos municipales o similares con un contenido de materia seca similar.

40 Si las biomásas que contienen polisacáridos son lignocelulósicas, el material puede cortarse en trozos en los que el 20 % (p/p) de la biomasa preferentemente varía entre 26 y 70 mm, antes del pre-tratamiento. El material pretratado tiene preferentemente un contenido de materia seca por encima del 20 % antes de entrar en el dispositivo de mezcla. Además de liberar los carbohidratos de la biomasa, el procedimiento de pre-tratamiento esteriliza y disuelve parcialmente la biomasa y al mismo tiempo retira por lavado cloruro potásico de la fracción de lignina.

La mezcla realizada en un procedimiento de acuerdo con la presente invención sirve al menos un propósito cuádruple.

En primer lugar, asegura el contacto cercano entre las enzimas usadas y la biomasa que contiene polisacáridos (sustrato), puesto que ésta será en la mayoría de los casos insoluble o solamente muy ligeramente soluble.

45 En segundo lugar, el trabajo mecánico realizado en el material durante la mezcla ayuda a desgarrar fibras y partículas de biomasa mayores y por lo tanto ayudará a aumentar el área de superficie del material. Esto aumentará la accesibilidad de, por ejemplo, celulosa y hemicelulosa a las enzimas usadas. Para aumentar adicionalmente el trabajo mecánico sobre el material, podrían añadirse al tambor bolas de acero o medios similares que colisionarían con el material.

50 En tercer lugar, la mezcla de los materiales evita la acumulación local de alta concentración de celobiosa que, como se sabe bien por un experto en la materia, puede inhibir por ejemplo enzimas celulasa, especialmente las celobiohidrolasas.

55 En cuarto lugar, una característica importante de las enzimas celulasa es de influencia de los dominios de unión a celulosa (CBD) en el rendimiento enzimático. Los CBD son partes funcionales de enzimas de degradación de celulosa. El CBD permite la adhesión de la enzima soluble en agua a una superficie de sustrato insoluble (celulosa).

La asociación cercana entre la enzima y celulosa proporcionada por el CBD potencia la tasa catalítica y la estabilidad de la enzima. Para hidrolizar celulosa, la enzima debe cambiar la posición del CBD en la cadena de celulosa. Se cree que la acción mecánica, es decir, mezcla, es importante para el movimiento del CBD y en consecuencia para la acción enzimática de las enzimas a lo largo de la cadena de celulosa.

5 Además de lo anterior debería observarse que la hidrólisis enzimática de biomasa se ha realizado tradicionalmente en reactores de tanque con agitación equipados con impulsores (por ejemplo, turbina Rushton o impulsor Intemig) montados en un eje impulsor situado en posición central similar al que se usa en la industria de la fermentación. Debido a este equipamiento, las soluciones de alta viscosidad, el material muy pegajoso o muy seco no puede agitarse eficazmente sino que dará como resultado zonas con muy poca mezcla o sin ella. Además, la agitación de
10 tales soluciones requiere aportación de energía muy grande, que es perjudicial para la economía del procedimiento. La actuación con biomasa que contienen polisacáridos ha restringido previamente el límite superior posible a aproximadamente 20 %. El principio de mezcla basado en gravedad de acuerdo con la presente invención supera este problema y puede usarse para biomasa que contienen polisacáridos con un contenido de materia seca de 20-40 %. El principio de mezcla por gravedad de acuerdo con la presente invención puede cambiarse de escala
15 fácilmente y aplicarse a todo tipo de biomasa, además de almidón refinado, que contengan hasta más del 80 % de celulosa.

A diferencia de los reactores de tanque en agitación convencionales tradicionalmente usados para hidrólisis enzimática, un principio de mezcla basado en gravedad, es decir, un tambor mezclador, un mezclador con un eje rotatorio que eleva la biomasa o dispositivo de mezcla similar que utiliza un principio de caída libre, al mismo tiempo
20 permite una mezcla eficaz incluso con pequeñas aportaciones de energía y altos contenidos de materia seca y además realiza un procesamiento/degradación mecánica a través de las fuerzas de la gravedad incluyendo fuerzas de cizallamiento y desgarramiento entre el material y el tambor así como la las fuerzas resultantes del impacto entre el material en caída y el fondo del tambor y al mismo tiempo afecta de forma positiva a la influencia de los dominios de unión a celulosa (CBD) en el rendimiento de la enzima.

25 Aunque el procesamiento de materiales vegetales no miscibles tales como, por ejemplo, biomasa que contiene polisacáridos con contenido en materia seca relativamente alto y tamaño de fibra y partícula medio grande, se conoce de fermentación en estado sólido o birreactores, en los que se usan mezcladores de tipo tambor para mezclar (Giovanozzi y col., 2002), este principio no se ha implementado previamente en un procedimiento dedicado de licuefacción/sacarificación o un procedimiento de fermentación de bio-etanol.

30 La presente invención proporciona un procedimiento para procesar biomasa con contenidos de materia seca relativamente altos entre 20 y 40 %. Además, el procedimiento de acuerdo con la presente invención asegura licuefacción y sacarificación eficaces que permiten el uso directo del producto final en, por ejemplo, fermentadores.

35 Se añaden enzimas capaces de efectuar una conversión de almidón, celulosa y hemicelulosa o partes de las mismas a glucosa, xilosa y celobiosa a la biomasa. El pH y la temperatura de la biomasa se ajustan con referencia al pH óptimo y la temperatura óptima de las enzimas aplicadas.

Dependiendo de la carga enzimática, la biomasa se licuará y sacarificará a un líquido sin ninguna o solamente con pocas fibras y partículas grandes restantes en un período de 3-24 horas.

Descripción detallada de la invención

40 Un procedimiento de acuerdo con la presente invención puede realizarse usando los siguientes parámetros técnicos preferidos.

- Contenido de materia seca: 20-80 %, preferentemente 25-70 %, más preferentemente 25-60 %, aún más preferentemente 25-50 % o 25-40 % y más preferentemente 25-35 %
- Distribución de tamaños de fibras y partículas de biomasa lignocelulósica: 0-150 mm, preferentemente, 5-125 mm, más preferentemente, 10-100 mm, aún más preferentemente 15-90 mm o 20-80 mm y más preferentemente 26-70 mm. La distribución preferida de tamaños de fibras y partículas se define como al menos 20 % (p/p) de la biomasa lignocelulósica que varía dentro del intervalo preferido.

45 Si la biomasa que contiene polisacáridos es lignocelulósica, debe pre-tratarse por ejemplo por una extracción en agua caliente. Si se selecciona un pre-tratamiento hidrotérmico se prefieren los siguientes datos técnicos:

- Temperatura de pre-tratamiento: 110-250 °C, preferentemente 120-240 °C, más preferentemente 130-230 °C, más preferentemente 140-220 °C, más preferentemente 150-210 °C, más preferentemente 160-200 °C, aún más preferentemente 170-200 °C o más preferentemente 180-200 °C
- Tiempo de pre-tratamiento: 1-60 min, preferentemente 2-55 min, más preferentemente 3-50 min, más preferentemente 4-45 min, más preferentemente 5-40 min, más preferentemente 5-35 min, más preferentemente 5-30 min, más preferentemente 5-25 min, más preferentemente 5-20 min y más preferentemente 5-15 min.
- Contenido de materia seca después del pre-tratamiento de al menos 20 % p/p.

55 Tratamiento enzimático de biomasa que contienen polisacáridos en un mezclador de gravedad:

Si se usa un recipiente basado en el concepto de mezcla de caída libre en forma de un reactor con un eje de agitación colocado horizontalmente que eleva la biomasa o dispositivo de mezcla similar, se prefieren los siguientes datos técnicos:

- 5 • Velocidad de rotación: 0-30 rpm, preferentemente 0-20 rpm, más preferentemente 0-15 rpm, aún más preferentemente 0-10 rpm y más preferentemente 0-5 rpm.
- Rotación con dirección rotatoria alternada periódicamente.
- Rotación en intervalos predefinidos.

10 La velocidad de rotación óptima dependerá del volumen del recipiente, la velocidad de rotación preferida puede por lo tanto ser relativamente alta cuando el procedimiento se lleva a cabo en un recipiente relativamente pequeño, mientras que puede ser relativamente baja cuando el procedimiento se lleva a cabo en un recipiente relativamente grande.

• Enzimas para biomasa lignocelulósica:

- Celobiasa (por ejemplo, Novozym 188)
- Celulasa (por ejemplo, Celluclast 1.5 FG L)

15 • Carga enzimática en unidades de papel de filtro (UPF)/g MS. Una UPF equivale a la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de enlaces glucosídicos en papel de filtro Whatmann N° 1, en condiciones específicas bien conocidas para el experto en la materia. Sin embargo, la actividad enzimática podría en principio proporcionarse de cualquier forma concebible que dé lugar a la actividad enzimática deseada, que corresponde a 0,001-15 UPF/g de materia seca, preferentemente 0,01-10 UPF/g de materia seca, más preferentemente 0,1-8 UPF/g de materia seca, más preferentemente 1-7 UPF/g de materia seca y más preferentemente menos de 6 UPF/g.

- 20 • Enzimas para biomasa que contiene almidón:
- Enzimas en el procesamiento de almidón: alfa-amilasas y glucoamilasas
- 25 • Tiempo de tratamiento para hidrólisis enzimática: 0-72 horas, preferentemente 1-60 horas, más preferentemente 2-48 horas y más preferentemente 3-24 horas tales como 4-24 horas, tales como 6-24 horas, tales como 8-24 horas, tales como 10-24, tales como 12-24 horas, tales como 18-24 horas o 22 horas
- Temperatura para hidrólisis enzimática. Ajustada con referencia a las temperaturas óptimas de las actividades enzimáticas aplicadas: 0-105 °C, preferentemente 10-100 °C, más preferentemente 15-90 °C, más preferentemente 20-80 °C, más preferentemente 25-70 °C y más preferentemente 30-70 °C tal como 40-45 °C o temperatura ambiente.
- 30 • pH de la biomasa. Ajustado con referencia al pH óptimo de las actividades enzimáticas aplicadas: 3-12, tal como 5-10, tal como 6-9, tal como 7-8 y preferentemente 4-11
- El tratamiento enzimático puede realizarse como un procedimiento discontinuo, semicontinuo o continuo.

Ejemplo 1: Hidrólisis enzimática a escala de laboratorio

35 Se puso paja de trigo pretratada prensada con un tamaño medio de aproximadamente 40 mm (extracción con agua contracorriente a 180-200 °C durante 5-10 minutos, en relación de flujo de materia seca y agua de 5:1) correspondiente a 25 g de peso seco (= a 67,0 g de paja pretratada) en una bolsa de plástico. Se mezclaron 0,75 ml de Novozym 188, 3,75 ml de Celluclast 1,5 FG L y 11,9 ml de tampón de citrato sódico 50 mM, pH 5,0, y se pulverizó sobre la paja. Esto dio como resultado un contenido de materia seca final del 30 %. La carga enzimática correspondió a 10 unidades de papel de filtro (UPF)/g MS.

40 El mezclador consistía en un tambor (1,0 m de longitud y 0,78 m de diámetro) con 5 resaltes internos a lo largo del eje largo para asegurar una mezcla apropiada del material. El tambor rotó a lo largo del eje horizontal con una velocidad de 26 rpm. La mezcla/hidrólisis del material se realizó durante 18-24 horas a temperatura ambiente. Esto dio como resultado una pasta gruesa sin ninguna fibra grande restante. Una bolsa de control con la misma carga enzimática pero sin mezcla no mostró señales de degradación de la paja.

45 Parte del material resultante después de la hidrólisis enzimática durante 24 horas (una cantidad correspondiente a 29 g de materia seca) se diluyó a 15 % de materia seca en un frasco de tapón azul y se añadió levadura (levadura de panadero, De Danske Spritfabrikker). El frasco se cerró mediante una esclusa y se colocó durante 72 horas a 30 °C con agitación a 500 rpm. El líquido resultante contenía etanol 33 gramos/litro, xilosa 10 g/l. No se detectó glucosa lo que indica que la levadura era capaz de utilizar toda la glucosa producida durante la hidrólisis. Asumiendo un rendimiento de etanol en glucosa de 0,5 g de etanol por g de glucosa esto correspondía a la conversión del 70 % de la celulosa original.

Ejemplo 2: Hidrólisis enzimática en escala piloto

55 Se puso paja de trigo pretratada prensada con un tamaño medio de aproximadamente 40 mm (pretratada por extracción en agua contracorriente a 180-200 °C durante 5-10 minutos con una relación de flujo de agua y materia

seca de 5:1) correspondiente a 7 kg PS (= 20 kg de paja pretratada) en una hormigonera rotatoria convencional, con un eje horizontal inclinado aproximadamente 10 grados. El mezclador tenía 2 resaltes internos a lo largo del eje largo para asegurar la mezcla del material. Se montó una tapa en la apertura para evitar la evaporación del mezclador. El tambor mezclador rotaba a lo largo del eje horizontal con una velocidad de 29 rpm.

- 5 Se añadieron 200-1150 ml de Celluclast 1.5 de FG L y 40-225 ml de Novozym 188 a la paja. Esto dio como resultado un contenido de materia seca final del 30 %. La carga enzimática correspondía a 3-15 UPF/g MS. El pH se ajustó de 4,8 a 5,0 por adición de carbonato sódico.

- 10 La hormigonera se calentó a 40-45 °C mediante el uso de un generador de aire caliente. La mezcla/hidrólisis del material se realizó durante 22 horas. Dependiendo de la carga enzimática esto dio como resultado un líquido más o menos viscoso sin ninguna fibra grande restante. La paja pretratada se degradó a una pasta en aproximadamente 3-5 horas. Después de 5-24 horas de mezcla la pasta cambió a un líquido viscoso. Los experimentos de control con paja de trigo pretratada solamente o paja de trigo pretratada a solamente 160 °C pero usando la misma carga enzimática no mostraron señal de licuefacción de la paja.

- 15 Se realizó sacarificación y fermentación simultánea añadiendo levadura a la hormigonera después de 24 horas de hidrólisis a 40-45 °C usando una carga enzimática de 10-15 UPF/g MS. Se permitió que la temperatura se enfriara por debajo de 35 °C y se añadió levadura comprimida (levadura de panadero, De Danske Spritfabrikker) a una concentración de aproximadamente 1 % (p/p) basándose en la materia seca inicial de paja. La sacarificación y fermentación se continuó durante 48 horas a 25 °C.

- 20 El material resultante se centrifugó durante 15 minutos a 2500 rpm. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y se analizó con respecto a azúcares en HPLC. A una carga enzimática de 15 UPF/g MS, el sobrenadante contenía 70 g/l de glucosa, 30 g/l de xilosa después de 24 horas de hidrólisis. Esto correspondía a 50 % de hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa originalmente presentes en la paja. La sacarificación y fermentación simultánea usando una carga enzimática de 10 UPF/g MS dio como resultado etanol 42 g/l y xilosa 30 g/l.

Ejemplo 3: Licuefacción, hidrólisis y fermentación

- 25 El reactor de hidrólisis se diseñó para realizar experimentos con concentraciones sólidas de licuefacción e hidrólisis por encima del 20 % MS (Fig. 1). El reactor consistía en un tambor colocado de forma horizontal dividido en 5 cámaras separadas cada una de 20 cm de anchura y 60 cm de diámetro. Se usó un eje rotatorio horizontal montado con tres palas en cada cámara para mezcla/agitación. Se usó un motor de 1,1 kW como propulsión y la velocidad de rotación se podía ajustar en el intervalo de 2,5 y 16,5 rpm. La dirección de rotación se programó para cambiar dos veces por minuto entre sentido de las agujas del reloj y contrario a las agujas del reloj. Una camisa de calentamiento cargada con agua en el exterior permitió el control de la temperatura hasta 80 °C.

- 30 Las cámaras se cargaron con paja de trigo pretratada prensada con un tamaño medio de aproximadamente 40 mm (pretratada por extracción de agua contracorriente a 180-200 °C durante 5-10 minutos con una relación de flujo de agua y materia seca de 5:1) y agua para proporcionar un contenido inicial de MS de 20 a 40 %. Se añadieron Celluclast 1,5 FG L y Novozym 188 en una relación 5:1 para proporcionar una carga enzimática de 7 UPF por g MS. La licuefacción e hidrólisis se realizaron a 50 °C y pH de 4,8 a 5,0. La velocidad de mezcla fue de 6,6 rpm. Se realizaron experimentos de sacarificación y fermentación simultánea (SSF), reduciendo la temperatura a 32 °C después de 8 h de licuefacción e hidrólisis y siguiendo la adición de 15 g de levadura de panadero comprimida (De Danske Spritfabrikker) por kg de MS inicial.

- 40 La licuefacción e hidrólisis fue posible con contenido inicial de MS de hasta 40 % MS (Fig. 2 y 3). Con MS inicial del 40 % fue posible alcanzar concentraciones de glucosa de 80 g kg⁻¹ después de 96 horas. También fue posible realizar el procedimiento como SSF (Fig. 3), reduciendo de este modo la inhibición del producto de las celulasas provocada por la acumulación de glucosa. Fue posible fermentar los hidrolisados con hasta 40 % del contenido de MS inicial usando levadura de panadero normal. En condiciones no completamente anaerobias la producción de etanol fue del 80, 79, 76, 73 y 68 % de lo que se podía obtener teóricamente a 20, 25, 30, 35 y 40 % de MS, respectivamente.

Ejemplo 4: Licuefacción, sacarificación y fermentación de cultivo completo

- 50 La biomasa que contiene almidón y lignocelulosa puede procesarse simultáneamente usando mezcla por gravedad y una mezcla de celulasas, hemicelulasas y amilasas. Las biomásas lignocelulósicas pueden derivarse de cultivos agrícolas que consisten en por ejemplo hojas y tronco de maíz, paja, por ejemplo, de arroz, trigo, centeno, avena, cebada, centeno, colza y sorgo, tubérculos, por ejemplo, remolacha, patata, cereales de, por ejemplo, arroz, trigo, centeno, avena, cebada, centeno, colza, sorgo, madera que consiste en madera blanda por ejemplo *Pinus sylvestris*, *Pinus radiata*, madera dura, por ejemplo, *Salix spp.*, *Eucalyptus spp.*, residuos sólidos municipales, papel residual y biomásas similares.

- 55 El reactor de hidrólisis descrito en el Ejemplo 3 se usó para los experimentos. Se pretrató paja de trigo (principalmente una fuente de lignocelulosa) usando extracción en agua contracorriente a 180-200 °C durante 5-10 minutos con una relación de flujo de agua y materia seca de 5:1. El grano de trigo (principalmente una fuente de

5 almidón) se molió en seco usando un molido rodante Kongskilde. El grano de trigo y la paja pretratada con un tamaño medio de aproximadamente 40 mm se mezclaron en una relación 1:1 en seco. Se ajustó la MS a entre 30 y 40 % por adición de agua. Se añadieron Celluclast 1.5 FGL y Novozym 188 en una relación 5:1 para proporcionar una carga enzimática de 7 UPF por g MS de paja. La hidrólisis del almidón se llevó a cabo usando enzima de mezcla fría NS50033 (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) a una carga de 3,5 g/kg de grano de trigo. La licuefacción e hidrólisis se realizó a 50 °C y pH 4,8 a 5,0. Después de 8 h, la temperatura se redujo a 34 °C y se añadieron 15 g de levadura de panadero comprimida (De Danske Spritfabrikker) por kg de MS inicial. Se ejecutó un experimento solamente con paja a MS 30 % en paralelo.

10 La mezcla de paja con grano dio como resultado una acumulación inicial rápida de glucosa en la etapa de licuefacción e hidrólisis en comparación con la aplicación de paja solamente (Fig. 4). Después de 96 horas de licuefacción y SSF la concentración de etanol fue de 41 g kg⁻¹ usando solamente paja de trigo como el único sustrato (Fig. 4). En el experimento con paja y grano la concentración de etanol alcanzó 68 g kg⁻¹.

Ejemplo 5: Licuefacción a baja temperatura de almidón o materiales que contienen almidón

15 También puede aplicarse un procedimiento de acuerdo con la presente invención para procesamiento a temperatura baja de almidón refinado o materiales que contienen almidón (por ejemplo, remolacha, patata, cereales de, por ejemplo, arroz, trigo, centeno, avena, cebada, centeno, sorgo). De acuerdo con el Ejemplo 4, no es necesario un pre-tratamiento con calor del grano para licuefacción e hidrólisis de almidón. Por otro lado se usa generalmente molienda en seco para el pre-tratamiento de granos que contienen almidón. Los granos molidos en seco con un contenido de materia seca del 20-60 % se cargan en el mezclador de caída libre. Simultáneamente se añaden 20 enzima de mezcla fría NS50033 (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) o alfa-amilasa y glucoamilasa. Es por lo tanto posible una licuefacción y sacarificación completa del almidón en un procedimiento directo. Los intervalos de temperatura y pH durante los procedimientos de hidrólisis enzimática se definen por las enzimas y estarán en el intervalo de 25-60 °C, preferentemente 40-55 °C y p H 3-12, preferentemente pH 3-8, respectivamente.

El procedimiento puede combinarse con SSF.

25 Bibliografía citada

Galbe, M., Zacchi, G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59:618-628.

Giovanazzi-Sermanni, G., D'Annibale, A., Perani, C., Porri, A., Falesiedi, G. (2002). Solid-state bioreactors for the sustainability. <http://www.unitus.it/dipartimenti/dabac/progetti/ssbioreactors/solidstatebioreactor.htm>

30 Gregg, D., Saddler, J.N. (1995). Bioconversion of lignocellulosic residues to ethanol: Process flowsheet development. Biomass Bioenerg. 9:287-302.

Mais, U., Esteghalalian, A.R., Saddler, J.N. (2002). Influence of mixing regime on enzymatic saccharification of steam-exploded softwood chips. Appl. Biochem. Biotechnol. 98-100:463-472.

Documento US4409329

35 Documento US2002117167A

Documento US2004005674A

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para licuefacción y sacarificación de biomasa que contienen polisacáridos que comprenden biomasa lignocelulósica, **caracterizado por** someter dicha biomasa a hidrólisis enzimática combinada usando al menos una celulasa y mezclar por un mezclador de caída libre tal como un tambor mezclador o un mezclador rotatorio que proporciona procesamiento mecánico y/o degradación de la biomasa de modo que, en el procedimiento, la biomasa se licue y sacarifique a un líquido adecuado para procesamiento adicional tal como fermentación, en el que la biomasa tiene un contenido de materia seca de entre 20 % y 40 % al comienzo de la mezcla/hidrólisis.
- 10 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha biomasa que contiene polisacáridos es una biomasa lignocelulósica derivada de cultivos agrícolas que consisten en por ejemplo hojas y troncos de maíz, bagazo, paja, por ejemplo, de arroz, trigo, centeno, avena, cebada, colza y sorgo, madera que consiste en madera blanda por ejemplo *Pinus sylvestris*, *Pinus radiata*, madera dura, por ejemplo, *Salix spp.*, *Eucalyptus spp.* o residuos sólidos municipales, papel residual, fracción de fibra del procesamiento de biogás, estiércol y biomasa similares.
- 15 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha biomasa que contiene polisacáridos es una mezcla de almidón, por ejemplo, granos que contienen almidón o almidón refinado y biomasa lignocelulósica derivadas de cultivos agrícolas que consisten en por ejemplo hojas y troncos de maíz, paja, por ejemplo, de arroz, trigo, centeno, avena, cebada, colza y sorgo, madera que consiste en madera blanda por ejemplo *Pinus sylvestris*, *Pinus radiata*, madera dura, por ejemplo, *Salix spp.*, *Eucalyptus, spp.*, residuos sólidos municipales, papel residual y biomasa similares.
- 20 4. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el líquido resultante del procedimiento es adecuado para procesamiento adicional tal como fermentación.
5. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el contenido de materia seca de la biomasa que contiene polisacáridos está entre 25 y 40 %.
- 25 6. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que al menos 20 % (p/p) de la biomasa lignocelulósica tiene un tamaño de fibra por encima de 26 mm.
7. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la biomasa lignocelulósica se ha sometido a pre-tratamiento con calor entre 110 y 250 °C.
- 30 8. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la hidrólisis enzimática se realiza con una combinación de enzimas hidrolíticas que incluyen una enzima carbohidrolítica y una enzima oxidativa.
9. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3, en el que la hidrólisis enzimática de granos que contienen almidón se realiza con una combinación de enzimas hidrolíticas y enzimas proteolíticas.
10. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la hidrólisis enzimática se realiza a 0-105 °C.
- 35 11. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el tiempo de tratamiento para la hidrólisis enzimática es 0-72 horas.
12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el tiempo de tratamiento es 3-24 horas.
13. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que se lleva a cabo como un procedimiento discontinuo, semicontinuo, continuo o similar.
- 40 14. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en el que se incluye una etapa de procesamiento adicional.
15. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14 en el que la etapa de procesamiento adicional es fermentación, gasificación, hidrogenación, síntesis orgánica o producción de biogás y pienso.
- 45 16. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el mezclado se proporciona por un mezclador con un eje agitador colocado horizontalmente que eleva la biomasa.

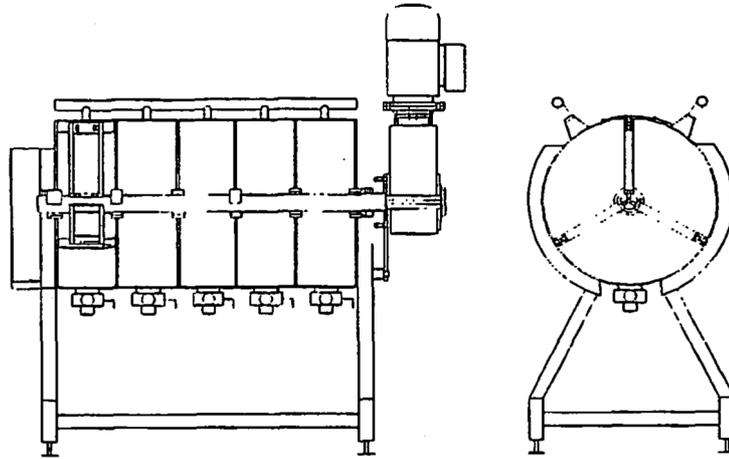


Figura 1: Vista longitudinal (izquierda) y vista transversal (derecha) del reactor de hidrólisis de 5 cámaras

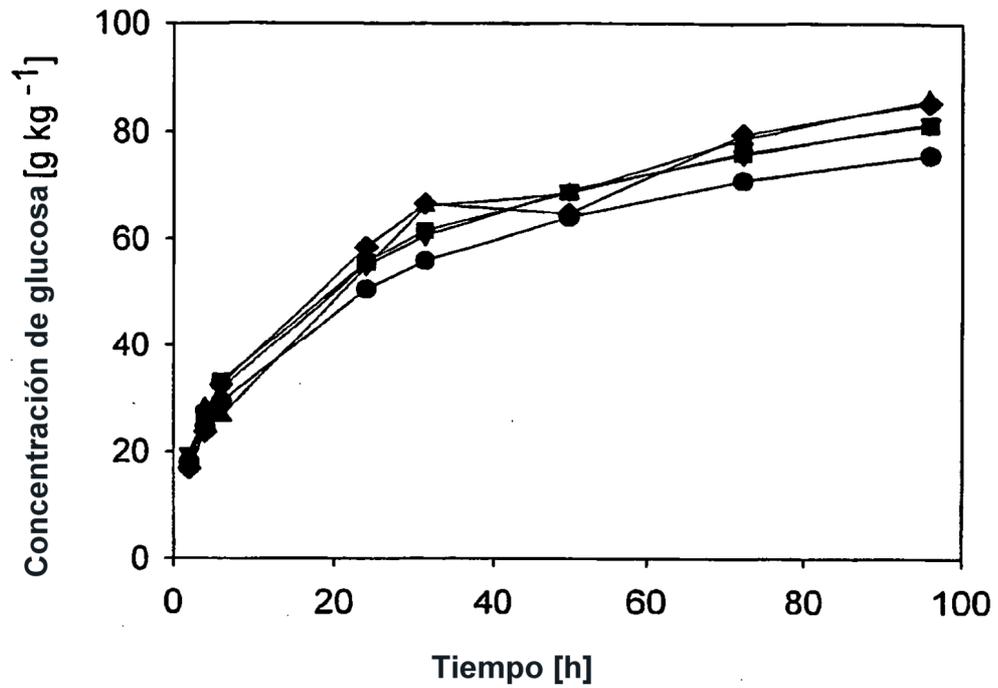


Figura 2: Concentración de glucosa durante la licuefacción e hidrólisis de paja de trigo pretratada con un contenido de materia seca de 20% (●), 25% (▼), 30% (■), 35% (◆) y 40% (▲) usando una carga enzimática de 7 UPF (g MS)⁻¹

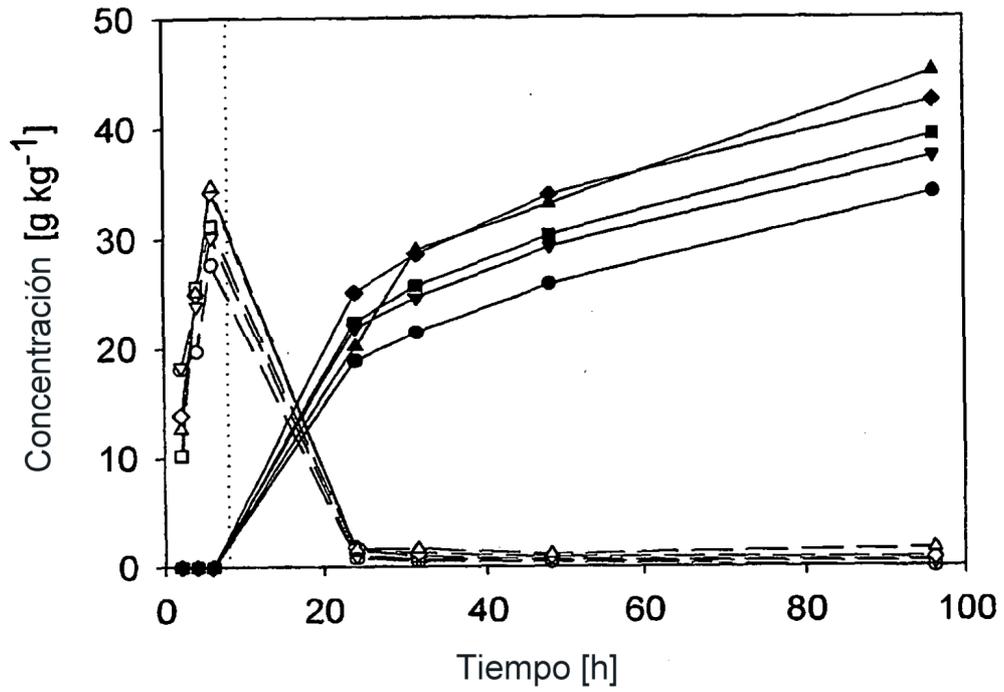


Figura 3: Concentración de glucosa (símbolos abiertos) y etanol (símbolos cerrados) durante licuefacción, hidrólisis y fermentación de paja de trigo pretratada con un contenido de materia seca de 20 % (●), 25 % (▼), 30 % (■), 35 % (◆) y 40 % (▲) usando una carga enzimática de 7 UPF (g MS)⁻¹. Levadura añadida después de 8 horas (línea discontinua).

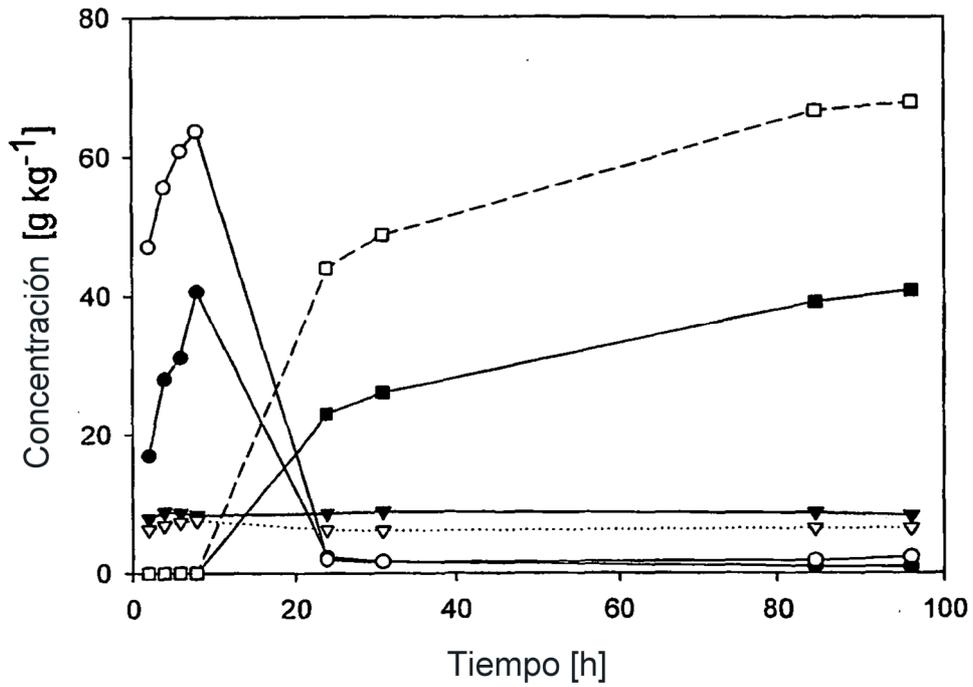


Figura 4: Concentración de glucosa (●), xilosa (▼), y etanol (■), durante licuefacción y fermentación de paja de trigo pretratada (símbolos cerrados) y una mezcla de paja de trigo pretratada y grano de trigo (símbolos abiertos). Se añadió levadura después de 8 horas de licuefacción e hidrólisis.