

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 596**

51 Int. Cl.:

D21C 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2008 E 08803615 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 2191061**

54 Título: **Detoxificación y reciclaje de soluciones de lavado utilizadas en el pretratamiento de materiales con contenido de lignocelulosa**

30 Prioridad:

03.09.2007 EP 07115539

14.10.2007 EP 07118426

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

16.10.2013

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (50.0%)

Krogshøjvej 36

2880 Bagsvaerd, DK y

COFCO LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

REN, HAIYU;

HUANG, HONG ZHI y

ZHENG, JIE

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 425 596 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

Detoxificación y reciclaje de soluciones de lavado utilizadas en el pretratamiento de materiales con contenido de lignocelulosa

5

CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere a procesos que comprenden la detoxificación y el reciclaje de soluciones de lavado utilizadas en el pretratamiento de materiales con contenido de lignocelulosa. La invención se refiere también a procesos de producción de un producto de fermentación de materiales con contenido de lignocelulosa, utilizando un organismo fermentador, incluyendo un proceso de detoxificación en la invención.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Debido a las limitadas reservas de combustibles de fósiles y a los problemas sobre la emisión de gases con efecto invernadero, existe una atención creciente hacia el uso de fuentes de energía renovable. La producción de productos de fermentación de materiales con contenido de lignocelulosa se conoce en la técnica y de forma convencional incluye el pretratamiento, la hidrólisis, y la fermentación del material que contiene lignocelulosa. El pretratamiento conlleva la liberación de productos de degradación del material con contenido de lignocelulosa que se pueden enlazar irreversiblemente e inhibir las enzimas adicionadas durante la hidrólisis y la fermentación. Estos compuestos también pueden ser tóxicos para el metabolismo del organismo fermentador e inhibir el rendimiento del mismo.

15

20

[0003] El documento US2002/195213 describe un proceso para producir xilooligosacáridos a partir de una pulpa de lignocelulosa, en el que la pulpa se trata enzimáticamente, seguido de un proceso de filtración para separar la fracción líquida. Posteriormente, el líquido se separa a través de una membrana para recopilar en mayor concentración la fracción no empapada con el complejo xilooligosacárido-lignina. El documento WO2004/041995 divulga un método para el pretratamiento y el procesamiento de biomasa. Se incluye también un paso de lavado. El documento WO2004/081185 divulga un método para aumentar la actividad enzimática de las enzimas de degradación de lignocelulosa por pretratamiento químico en condiciones suaves. Se describe también un paso de lavado convencional. El documento WO2002/14598 se refiere a la producción de celulosa a partir de biomasa de lignocelulosa, donde la biomasa es posteriormente lavada y los residuos sólidos son eliminados de las aguas de lavado.

25

30

[0004] Se ha sugerido la detoxificación por extracción de vapor, pero supone un paso adicional que resulta pesado y costoso en el proceso. También se ha sugerido lavar el material pretratado que contiene lignocelulosa antes de la hidrólisis. No obstante, los inhibidores presentan frecuentemente baja solubilidad y el reciclaje de las aguas de lavado sólo es posible en muy baja medida debido a la acumulación de los inhibidores. Por lo tanto, el lavado requiere cantidades enormes de agua.

35

[0005] Consecuentemente, existe una necesidad de suministrar procesos para la detoxificación de los materiales pretratados que contienen lignocelulosa con el objetivo de obtener sustratos adecuados para la hidrólisis y la fermentación.

40

RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] La presente invención se refiere a procesos de detoxificación de materiales pretratados que contienen lignocelulosa mediante el lavado, la regeneración y el reciclaje de la solución de lavado utilizada. La solución de lavado utilizada se regenera por eliminación de un inhibidor enzimático y/o un inhibidor de un organismo fermentador. La invención también se refiere a procesos de producción de un hidrolizado y un producto de fermentación del material con contenido de lignocelulosa incluyendo un proceso de detoxificación en la invención.

45

50

[0007] En un primer aspecto, la invención se refiere a un proceso para producir un material pretratado y lavado que contiene lignocelulosa, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) someter un material con contenido de lignocelulosa a un pretratamiento, b) lavar el material pretratado que contiene lignocelulosa con una solución de lavado, c) separar la solución de lavado utilizada para obtener un material pretratado y lavado que contiene lignocelulosa, repitiendo continuamente los pasos de (a) a (c), donde la solución de lavado utilizada en el paso (b) se trata para eliminar inhibidores enzimáticos y/o inhibidores del organismo fermentador antes de ser reciclada para el paso (b).

55

[0008] En un segundo aspecto, la invención se refiere a un proceso para conversión de un material con contenido de lignocelulosa en un hidrolizado que comprende mono- y oligosacáridos, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) someter un material con contenido de lignocelulosa a un pretratamiento, b) lavar el material pretratado que contiene lignocelulosa con una solución de lavado, c) separar la solución de lavado utilizada, para obtener un material pretratado y lavado que contiene lignocelulosa, d) someter el material pretratado y lavado que contiene lignocelulosa a un tratamiento, dando como resultado, al menos, la hidrólisis parcial de la celulosa y la hemicelulosa para obtener un hidrolizado que comprende azúcares fermentables, repitiendo continuamente los pasos de (a) a (d), donde la solución de lavado utilizada en el paso (b) se trata para eliminar inhibidores enzimáticos y/o inhibidores del organismo

60

65

fermentador antes de ser reciclada para el paso (b).

[0009] En un tercer aspecto, la invención se refiere a un proceso para la conversión de un material con contenido de lignocelulosa en un producto de fermentación, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) someter un material con contenido de lignocelulosa a un pretratamiento, b) lavar el material pretratado que contiene lignocelulosa con una solución de lavado, c) separar la solución de lavado utilizada, para obtener un material pretratado y lavado que contiene lignocelulosa, d) someter el material pretratado y lavado que contiene lignocelulosa a un tratamiento, dando como resultado, al menos, la hidrólisis parcial de la celulosa y la hemicelulosa para obtener un hidrolizado que comprende azúcares fermentables, e) poner en contacto el hidrolizado del paso (d) con un organismo fermentador para producir un producto de fermentación, donde la solución de lavado utilizada en el paso (b) se trata para eliminar inhibidores enzimáticos y/o inhibidores del organismo fermentador antes de ser reciclada para el paso (b).

[0010] Las ventajas de los procesos incluyen la posibilidad de concentrar en la solución de lavado los azúcares solubles (p. ej. xilosa, oligosacáridos) producidos en el pretratamiento; aumento de la eficiencia de la hidrólisis; aumento del crecimiento de levadura y/o mejora de la fermentación de los hidrolizados; reducción de la fase de latencia en la fermentación; y reducción significativa del consumo de la solución de lavado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0011] En la realización del primer aspecto, la invención se refiere a un proceso para producir un material pretratado y lavado que contiene lignocelulosa, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) someter un material con contenido de lignocelulosa a un pretratamiento, b) lavar el material pretratado que contiene lignocelulosa con una solución de lavado, c) separar la solución de lavado utilizada, para obtener un material pretratado y lavado que contiene lignocelulosa, repitiendo los pasos (a) a (c), donde la solución de lavado utilizada en el paso (b) se trata para eliminar inhibidores enzimáticos y/o inhibidores del organismo fermentador antes de ser reciclada para el paso (b).

[0012] En la realización del segundo aspecto, la invención se refiere a un proceso para la conversión de un material con contenido de lignocelulosa en un hidrolizado que comprende mono- y oligosacáridos, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) someter un material con contenido de lignocelulosa a un pretratamiento, b) lavar el material pretratado que contiene lignocelulosa con una solución de lavado, c) separar la solución de lavado utilizada, para obtener un material pretratado y lavado que contiene lignocelulosa, d) someter el material pretratado y lavado que contiene lignocelulosa a un tratamiento, dando como resultado, al menos, la hidrólisis parcial de la celulosa y la hemicelulosa para obtener un hidrolizado que comprende azúcares fermentables, repitiendo los pasos (a) a (d), donde la solución de lavado utilizada en el paso (b) se trata para eliminar inhibidores enzimáticos y/o inhibidores del organismo fermentador antes de ser reciclada para el paso (b).

Material con contenido de lignocelulosa

[0013] El término "materiales con contenido de lignocelulosa" aquí se refiere a un material compuesto principalmente por celulosa, hemicelulosa, y lignina. Los materiales con lignocelulosa se denominan frecuentemente "biomasa".

[0014] La estructura de lignocelulosa no está accesible directamente a la hidrólisis enzimática. Por lo tanto, la lignocelulosa tiene que ser pretratada, por ejemplo, por hidrólisis ácida bajo condiciones adecuadas de presión, humedad y temperatura, para romper el sello de lignina y disgregar la estructura cristalina de celulosa. Esto provoca la solubilización y la sacarificación de la fracción de hemicelulosa. La fracción de celulosa se puede hidrolizar después, por ejemplo, enzimáticamente con enzimas de celulasa, para convertir los polímeros de carbohidrato en mono- y oligosacáridos, que se pueden fermentar dando un producto de fermentación deseada, tal como etanol. Opcionalmente, el producto de fermentación se puede recuperar, por ejemplo, por destilación.

[0015] Cualquier material con contenido de lignocelulosa se contempla según la presente invención. El material con contenido de lignocelulosa puede ser cualquier material que contenga lignocelulosa. En una realización preferida de la invención, el material con contenido de lignocelulosa contiene al menos un 30 % en peso, preferiblemente, al menos un 50 % en peso, más preferiblemente, al menos un 70 % en peso, incluso más preferiblemente, al menos un 90 % en peso de lignocelulosa. Debe entenderse que el material que contiene lignocelulosa también puede contener otros constituyentes, tales como materiales celulósicos, incluyendo celulosa y hemicelulosa, y puede contener también otros constituyentes como pueden ser material proteínico, almidón, azúcares, como azúcares fermentables y/o azúcares no fermentables.

[0016] El material con contenido de lignocelulosa se puede encontrar generalmente, por ejemplo, en los tallos, hojas, vainas, cáscaras y mazorcas de plantas, u hojas, ramas y madera de árboles. El material con contenido de lignocelulosa puede ser también, pero no únicamente, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos de silvicultura, desechos sólidos municipales, residuos de papel, pulpa y residuos de fábrica de papel. Se debe entender aquí, que material con contenido de lignocelulosa se puede encontrar en forma de materiales de las paredes celulares vegetales que contienen lignina, celulosa, y hemicelulosa en una matriz mixta.

[0017] En una realización preferida de la invención, el material con contenido de lignocelulosa está constituido por

astillas de madera, bagazo, papel o residuos de tratamiento de pulpa.

[0018] Otros ejemplos incluyen forraje de maíz, madera dura, como álamo y abedul, madera blanda como madera de pino, césped, paja de cereal y/o cáscaras, tales como paja de arroz, trigo, centeno de cebada etc., desechos sólidos municipales (DSM), residuos orgánicos industriales, papel de oficina, o mezclas derivadas.

[0019] En una realización preferida, el material con celulosa es forraje de maíz. En otro aspecto preferido, el material con celulosa es fibra de maíz.

Pretratamiento

[0020] El material con contenido de lignocelulosa se puede pretratar mediante cualquiera de las vías adecuadas. El pretratamiento se debe realizar antes de la hidrólisis y/o fermentación. En una forma de realización preferida, el material pretratado se hidroliza, preferiblemente por vía enzimática, después del pretratamiento. El objetivo del pretratamiento es separar y/o liberar la celulosa, hemicelulosa y/o lignina mejorando así el índice de hidrólisis. Métodos de pretratamiento como la oxidación en húmedo y el pretratamiento alcalino se dirigen a la lignina, mientras que el ácido diluido y la auto-hidrólisis se dirigen a la hemicelulosa. El método de explosión de vapor es un ejemplo de pretratamiento dirigido a la celulosa.

[0021] Según la invención, el paso de pretratamiento (a) puede ser un paso de pretratamiento convencional, utilizando técnicas conocidas. En una forma de realización preferida, el pretratamiento se produce en suspensión acuosa. El material con contenido de lignocelulosa puede estar presente durante el pretratamiento en una cantidad entre 10-80% en peso, preferiblemente entre 20-70% en peso, especialmente entre 30-60% en peso, por ejemplo, alrededor del 50% en peso.

[0022] Según la invención, el material con contenido de lignocelulosa puede ser pretratado química, mecánica y/o biológicamente antes de la hidrólisis y/o fermentación. El tratamiento mecánico (frecuentemente denominado tratamiento físico) se puede utilizar solo o en combinación con la simultánea o posterior hidrólisis, especialmente la hidrólisis enzimática.

[0023] Preferiblemente, el pretratamiento químico, biológico y/o mecánico se realiza antes de la hidrólisis y/o fermentación. Alternativamente, el pretratamiento químico, biológico y/o mecánico se puede realizar simultáneamente a la hidrólisis, por ejemplo, simultáneamente a la adición de una o más enzimas celulasa, u otras actividades enzimáticas mencionadas más abajo, para liberar, por ejemplo, azúcares fermentables, tales como glucosa y/o maltosa.

[0024] El término "tratamiento químico" se refiere a cualquier pretratamiento químico que promueva la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina. En los ejemplos de pretratamientos químicos adecuados se incluyen los tratamientos con; por ejemplo, ácido diluido, cal, disolventes alcalinos orgánicos, amoníaco, dióxido de azufre, dióxido de carbono. Además, la oxidación en húmedo y la hidrotermólisis controlada por pH se consideran también pretratamientos químicos.

[0025] En una forma de realización preferida, el pretratamiento químico es un tratamiento ácido, más preferiblemente, un tratamiento continuo con ácido diluido y/o un tratamiento con ácidos moderados, tal como, tratamiento con ácido sulfúrico u otro ácido orgánico, como por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, cloruro de hidrógeno o mezclas derivadas. Pueden utilizarse también otros ácidos. El tratamiento de ácido moderado significa que el tratamiento de pH abarca el rango de 1-5, preferiblemente pH 1-3. En una forma de realización específica, la concentración ácida se encuentra en el rango de 0,1 a 2,0% en peso de ácido, preferiblemente ácido sulfúrico. El ácido se puede poner en contacto con el material con contenido de lignocelulosa y se mantiene en el rango de 160-220 °C de temperatura, por ejemplo 165-195 °C, durante periodos de tiempo variables, tales como, 1-60 minutos, 2-30 minutos o 3-12 minutos. La adición de ácidos fuertes, como el ácido sulfúrico, se puede aplicar para eliminar la hemicelulosa. Esto aumenta la digestibilidad de la celulosa.

[0026] Se contemplan también otras técnicas. Se ha demostrado que un tratamiento de celulosa con disolventes es capaz de convertir aproximadamente el 90% de la celulosa en glucosa. Se ha demostrado también que la hidrólisis enzimática es mucho mayor cuando la estructura de lignocelulosa se ha disgregado. H₂O₂ alcalino, ozono, disolventes orgánicos (usa ácidos de Lewis, FeCl₃, (Al)₂SO₄ en alcoholes acuosos), glicerol, dioxano, fenol, o etilenglicol son conocidos, entre otros disolventes, por su capacidad para disgregar la estructura de la celulosa y promover la hidrólisis (Mosier et al. Bioresource Technology 96 (2005), p. 673-686).

[0027] Un pretratamiento químico alcalino utilizando bases como NaOH, Na₂CO₃ y/o amoníaco o similares se contempla también, según la invención. Algunos métodos de pretratamiento en que se utiliza amoníaco se han descrito en, por ejemplo, los documentos WO2006110891, WO200611899, WO200611900, WO2006110901 (que por la presente se incorporan como referencias)

[0028] Las técnicas de oxidación en húmedo implican el uso de agentes oxidantes, como por ejemplo, agentes oxidantes basados en sulfito o similares. Entre los ejemplos de pretratamientos que utilizan disolventes se incluyen los

tratamientos con DMSO (dimetilsulfóxido) o similares. Los pretratamientos químicos se realizan, generalmente, durante periodos de tiempo de 1 a 60 minutos, como por ejemplo de 5 a 30 minutos, pero se pueden llevar a cabo durante periodos más largos o más cortos en función del material a ser pretratado.

5 [0029] Otros ejemplos de métodos de pretratamiento adecuados fueron descritos por Schell et al. (2003) *Appl. Biochem and Biotechn.* Vol. 105-108, p. 69-85, Mosier et al. *Bioresource Technology* 96 (2005) 673-686, Ahring et al. en los documentos WO2006032282 y WO200160752, Foody et al. en el documento WO2006034590, y Ballesteros et al. en la publicación estadounidense n.º 20020164730. Todas ellas son, por la presente, incorporadas como referencias.

10 [0030] El término "pretratamiento mecánico" se refiere a cualquier tratamiento mecánico (o físico) que promueva la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina del material con contenido de lignocelulosa. Por ejemplo, el pretratamiento mecánico incluye varios tipos de molienda, irradiación, explosión de vapor/cocción al vapor, oxidación en húmedo, y otros tratamientos hidrotermales.

15 [0031] El pretratamiento mecánico incluye la trituración (reducción mecánica del tamaño). La trituración incluye la molienda en seco, molienda húmeda y la molienda de bola vibratoria. El pretratamiento mecánico puede requerir altas presiones y/o altas temperaturas (explosión de vapor). En una forma de realización de la invención, las altas presiones se traducen en presiones comprendidas en el rango de 300 a 600 psi, preferiblemente 400 a 500 psi, por ejemplo 450 psi, mientras que altas temperaturas serán aquellas comprendidas en el rango de 100 a 300 °C aproximadamente, preferiblemente de 140 a 235 °C aproximadamente. En una forma de realización preferida, el pretratamiento mecánico es un proceso discontinuo, un sistema hidrolizador de pistola de vapor, que aplica altas presiones y altas temperaturas tal como se han definido anteriormente. Para ello se puede utilizar un hidrolizador Sunds, disponible a través de Sunds Defibrator AB (Suecia).

25 [0032] En una forma de realización preferida, se llevan a cabo tanto los pretratamientos químicos como los mecánicos. Por ejemplo, un paso del pretratamiento puede implicar el tratamiento con ácido moderado o diluido y altas temperaturas y/o un tratamiento de presión. Los pretratamientos químicos y mecánicos se pueden realizar consecutiva o simultáneamente, según se desee.

30 [0033] Por consiguiente, en una forma de realización preferida, el material con contenido de lignocelulosa se somete a ambos pretratamientos, químico y mecánico, para promover la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina.

35 [0034] En una forma de realización preferida, el pretratamiento mecánico se realiza antes de un pretratamiento de explosión de vapor.

[0035] En una forma de realización preferida, el pretratamiento se realiza como un paso de explosión de vapor de ácido moderado y/o diluido. En otra forma de realización preferida, el pretratamiento se realiza como un paso de explosión de fibra de amoníaco (o paso de pretratamiento AFEX).

40 [0036] Utilizado en la presente invención, el término "pretratamiento biológico" se refiere a cualquier pretratamiento biológico que promueva la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa, y/o lignina del material con contenido de lignocelulosa. Las técnicas de pretratamiento biológico pueden implicar la utilización de microorganismos de solubilización de lignina (Véase, por ejemplo, Hsu, T.-A., 1996, Pretreatment of biomass, in *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212; Ghosh, P., and Singh, A., 1993, Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass, *Adv. Appl. Microbiol.* 39: 295-333; McMillan, J. D., 1994, Pretreating lignocellulosic biomass: a review, in *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, Himmel, M. E., Baker, J. O., and Overend, R. P., eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, DC, chapter 15; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., and Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207-241; Olsson, L., and Hahn-Hagerdal, B., 1996, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production, *Enz. Microb. Tech.* 18: 312-331; and Vallander, L., and Eriksson, K.-E. L., 1990, Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 42: 63-95).

55 **Proceso de detoxificación del material pretratado que contiene lignocelulosa**

[0037] Cuando el material con contenido de lignocelulosa se somete a un pretratamiento, se producen productos de degradación que son tóxicos y/o inhibidores de enzimas y organismos de fermentación. Estos compuestos reducen seriamente la hidrólisis y el índice de fermentación.

[0038] La detoxificación del material pretratado que contiene lignocelulosa, para la eliminación de inhibidores de enzimas y/o organismos fermentadores, mejorará la hidrólisis enzimática y/o el rendimiento del organismo fermentador durante la fermentación. En otras palabras, la detoxificación conforme a la invención se traduce en una reducción del tiempo del proceso de transformación del material con contenido de lignocelulosa en producto de fermentación.

[0039] Los inhibidores son productos de degradación de la lignocelulosa, incluyendo productos de degradación de la lignina, productos de degradación de la celulosa y productos de degradación de la hemicelulosa. Los productos de degradación de la lignina pueden estar en forma fenólica en la naturaleza. Entre los productos de degradación de la hemicelulosa se encuentran furanos de azúcares (tales como hexosas y/o pentosas), incluyendo xilosa, manosa, galactosa, ramnosa, y arabinosa. Entre los ejemplos de hemicelulosas se incluyen los siguientes: xilano, galactoglucomanano, arabinogalactano, arabinoglucuronoxilano, glucuronoxilano, y combinaciones derivadas. Entre los ejemplos de compuestos inhibidores, es decir, productos de degradación de la lignocelulosa pretratada, se encuentran alcohol 4-hidroxibencílico, 4-hidroxibenzaldehído, ácido 4-hidroxibenzoico, trimetilbenzaldehído, ácido 2-furoico, ácido cumárico, ácido ferúlico, fenol, guayacol, veratrol, pirogalolol, pirogalol mono éter metílico, vanillil alcohol, vainillina, isovainillina, ácido vanílico, ácido isovanílico, 4-hidroxi-3-metoxifenilacetato, veratril alcohol, veratraldehído, ácido verátrico, ácido 2-O-metil gálico, siringil alcohol, siringaldehído, ácido siringico, ácido trimetil gálico, homocatecol, vainillina etílica, creosol, 4-metilanisol, anisaldehído, ácido anísico, furfural, hidroximetilfurfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido fórmico, ácido acético, ácido levulínico, ácido cinámico, aldehído coniferílico, isoeugenol, hidroquinona, eugenol o combinaciones derivadas.

[0040] Conforme al primer, segundo y tercer aspecto de la presente invención, los compuestos tóxicos y/o inhibidores de enzimas y/o un organismo fermentador se eliminan del material pretratado que contiene lignocelulosa mediante lavado con una solución de lavado. La solución de lavado es preferiblemente una solución de lavado acuosa. La solución de lavado puede ser una solución sustancialmente pura de agua, o agua con una cantidad significativa de aditivos, por ejemplo tales como un detergente y/o un disolvente orgánico para mejorar la extracción y/o la solubilidad de los compuestos tóxicos y/o inhibidores de enzimas y/o un organismo fermentador. Un disolvente orgánico adecuado es etanol o metanol.

[0041] La solución de lavado se aplica preferiblemente a una temperatura de 5 a 70 °C, preferiblemente de 10 a 50 °C, y más preferiblemente 15 a 30 °C, por ejemplo, a una temperatura de 20 a 25 °C.

[0042] El paso de lavado finaliza cuando la solución de lavado utilizada se separa del PCS lavado. La separación de la solución de lavado utilizada se puede conseguir mediante cualquier método adecuado que incluye pero no está limitado al drenaje, la filtración, el centrifugado y la presión.

[0043] Conforme al primer, segundo y tercer aspecto de la presente invención, la solución de lavado utilizada se trata para eliminar un inhibidor enzimático y/o un inhibidor del organismo fermentador antes de ser reciclada para el paso de lavado. El tratamiento regenera la solución de lavado utilizada para crear una solución de lavado utilizable. En una forma de realización preferida la solución de lavado utilizada se trata poniendo a esta en contacto con una resina o una combinación de resinas. La combinación de resinas se puede aplicar como una mezcla de dos o varias resinas y/o se pueden aplicar dos o más resinas una después de la otra. La resina puede ser una resina con un grupo funcional polar, con polaridad débil o no polar. La resina puede ser un intercambiador catiónico fuertemente ácido, un intercambiador catiónico débilmente ácido, un intercambiador aniónico fuertemente básico o un intercambiador aniónico débilmente básico. Los grupos funcionales preferidos incluyen $-SO_3$, $-COOH$, $-N^+(CH_3)_3$, $-N(CH_3)_2$ y $-NH_2$. La resina también puede ser una resina de carbón. Una resina adecuada se puede seleccionar del grupo que comprende las resinas D380; H103, AB-8; D101, NKA, NKA9, D301T, D296R y D401, que se pueden obtener de NanKai Chemical Industry, Japón. Las resinas D380 y H103 son particularmente preferidas. En una forma de realización preferida, la solución de lavado utilizada se trata poniendo en contacto a esta con carbón activo.

[0044] En una forma de realización preferida, la solución de lavado utilizada se pasa a través de una columna que comprende la resina y/o carbón activo.

Hidrólisis

[0045] Antes y/o durante la fermentación del material pretratado y lavado que contiene lignocelulosa se puede hidrolizar para descomponer la celulosa y la hemicelulosa en azúcares y/u oligosacáridos.

[0046] El contenido en sustancias secas durante la hidrólisis puede encontrarse en el rango de 5-50% en peso, preferiblemente 10-40% en peso, preferiblemente 20-30% en peso. En una forma de realización preferida, la hidrólisis puede efectuarse como un proceso de lote alimentado, donde el material (sustrato) pretratado que contiene lignocelulosa se provee gradualmente a, por ejemplo, una solución de hidrólisis que contiene enzimas. El material pretratado que contiene lignocelulosa se puede suministrar a la enzima que contiene la solución de hidrólisis tanto en uno o más lotes diferentes, como uno o más flujos continuos diferentes o como una combinación de uno o más lotes diferentes y uno o más flujos continuos diferentes.

[0047] En una forma de realización preferida, se lleva a cabo la hidrólisis de forma enzimática. Según la invención, el material pretratado que contiene lignocelulosa se puede hidrolizar mediante una o más hidrolasas (clase EC 3 según la Nomenclatura Enzimática), preferiblemente una o más carbohidrasas seleccionadas del grupo que comprende la celulasa, hemicelulasa, amilasa, tal como alfa-amilasa, enzimas generadoras de carbohidratos, tales como la glucoamilasa, esterasa, tal como lipasa, o proteasa. La alfa-amilasa, glucoamilasa y/o similares pueden estar presentes durante la hidrólisis y/o fermentación al igual que el material que contiene lignocelulosa puede incluir algo de almidón.

[0048] La(s) enzima(s) utilizada(s) para la hidrólisis es(son) capaz(capaces) de convertir directa o indirectamente polímeros de carbohidratos en azúcares fermentables que pueden ser fermentados dando un producto de fermentación deseada, tal como etanol.

5

[0049] En una forma de realización preferida, la carbohidrasa posee actividad enzimática de la celulasa. Las carbohidrasas adecuadas son descritas en la sección de "enzimas" más adelante.

10

[0050] Los polímeros de hemicelulosa pueden ser descompuestos por hemicelulasas y/o hidrólisis ácida para liberar sus cinco y seis componentes de azúcar de carbono. Los seis azúcares de carbono (hexosas), tales como glucosa, galactosa, arabinosa, y manosa, pueden ser fermentados fácilmente por organismos de fermentación adecuado incluyendo levadura dando, por ejemplo, etanol, acetona, butanol, glicerol, ácido cítrico, ácido fumárico, etc. Es preferible para la fermentación de etanol la levadura de las especies *Saccharomyces cerevisiae*, preferiblemente las cepas que son resistentes a niveles altos de etanol, es decir, hasta por ejemplo aproximadamente el 10, 12 o 15% de vol. de etanol o más, tal como el 20% de vol. de etanol.

15

[0051] En una forma de realización preferida, el material pretratado que contiene lignocelulosa es hidrolizado usando una hemicelulasa, preferiblemente una xilanasa, esterasa, celobiasa, o combinación de las mismas.

20

[0052] La hidrólisis también se puede realizar en presencia de una combinación de hemicelulasas y/o celulasas, y opcionalmente una o más de las otras actividades enzimáticas mencionadas en la sección "enzimas" más adelante.

25

[0053] El tratamiento enzimático se puede realizar en un entorno acuoso adecuado bajo condiciones que pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la técnica. En una forma de realización preferida, la hidrólisis se realiza en condiciones adecuadas, preferiblemente óptimas para la(s) enzima(s) en cuestión.

30

[0054] El tiempo de proceso adecuado, la temperatura y las condiciones de pH pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica de la presente invención. Preferiblemente, la hidrólisis se lleva a cabo a una temperatura entre 25 °C y 70 °C, preferiblemente entre 40 °C y 60 °C, especialmente alrededor de 50 °C. El proceso se realiza preferiblemente con un pH en el rango de 3-8, preferiblemente pH 4-6, especialmente alrededor de pH 5.

[0055] Preferiblemente, la hidrólisis se realiza entre 12 y 144 horas, preferiblemente 16 a 120 horas, más preferiblemente entre 24 y 96 horas, tal como entre 32 y 48 horas.

35

[0056] Según la invención, la hidrólisis en el paso (c) y la fermentación en el paso (d) se pueden realizar simultáneamente (proceso SHHF) o consecutivamente (proceso SHF).

Fermentación

40

[0057] Según la invención, el material pretratado (e hidrolizado) que contiene lignocelulosa es fermentado por al menos un organismo fermentador capaz de fermentar azúcares fermentables, tales como glucosa, xilosa, manosa y galactosa, directa o indirectamente en un producto de fermentación deseado.

45

[0058] La fermentación es preferiblemente continua durante el periodo entre 8 y 96 horas, preferiblemente de 12 a 72, más preferiblemente de 24 a 48 horas.

50

[0059] En una forma de realización, la fermentación se realiza a una temperatura entre 20 y 40 °C, preferiblemente de 26 a 34 °C, en particular alrededor de 32 °C. En una forma de realización, el pH se encuentra entre pH 3 y 6, preferiblemente alrededor de pH 4 a 5.

55

[0060] Según la invención, se contempla la hidrólisis y fermentación simultáneas (SHF). En una forma de realización no hay fase de retención separada para la hidrólisis, lo cual significa que la(s) enzima(s) hidrolizante(s) y el organismo fermentador se agregan de forma conjunta. Cuando la fermentación (p. ej., fermentación de etanol usando levadura de *Saccharomyces*) se lleva a cabo de forma simultánea a la hidrólisis, la temperatura se encuentra preferiblemente entre 26 °C y 35 °C, más preferiblemente entre 30 °C y 34 °C, así como alrededor de 32 °C. Según la invención, se puede aplicar un programa de temperatura que comprende al menos dos estadios de retención en temperaturas diferentes.

60

[0061] Durante el lavado del material pretratado que contiene lignocelulosa, se pueden acumular azúcares disueltos en la solución de lavado acuosa reciclada. Estos azúcares se pueden separar y fermentar con un organismo fermentador adecuado. Ya que los azúcares disueltos comprenderán azúcares C5 de la degradación de la hemicelulosa, tales como la xilosa, un organismo fermentador preferido es capaz de convertir azúcares C5 en un producto de fermentación deseada.

65

[0062] El proceso de la invención se puede realizar como un lote, un lote alimentado o como un proceso continuo. Preferiblemente, el paso de fermentación se realiza como una fermentación continua.

Recuperación

5 [0063] Después de la fermentación, el producto de fermentación se puede separar del caldo de fermentación. El caldo se puede destilar para extraer el producto de fermentación o el producto de fermentación puede ser extraído del caldo de fermentación por técnicas de microfiltración o de filtración por membrana. Como alternativa, el producto de fermentación se puede recuperar por desorción. Los métodos de recuperación se conocen de sobra en la técnica.

Productos de fermentación

10 [0064] El proceso de la invención se puede utilizar para producir cualquier producto de fermentación. Los productos de fermentación especialmente contemplados incluyen alcoholes (p. ej., etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (p. ej., ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico); cetonas (p. ej., acetona); aminoácidos (p. ej., ácido glutámico); gases (p. ej., H₂ y CO₂); antibióticos (p. ej., penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (p. ej., riboflavina, B12, beta-caroteno); y hormonas.

15 [0065] Los productos contemplados también incluyen productos consumibles de la industria del alcohol, por ejemplo, cerveza y vino; productos de la industria lechera, por ejemplo, productos lácteos fermentados; productos de la industria del cuero y productos de la industria del tabaco. En una forma de realización preferida, el producto de fermentación es un alcohol, especialmente etanol. El producto de fermentación, tal como etanol, obtenido según la invención, puede preferiblemente ser bioalcohol/etanol. No obstante, en el caso del etanol, éste también se puede usar como etanol potable.

Organismo fermentador

25 [0066] El término "organismo fermentador" se refiere a cualquier organismo, incluyendo los organismos bacterianos y fúngicos, adecuados para producir un producto de fermentación deseada. Los organismos de fermentación especialmente adecuados según la invención son capaces de fermentar, es decir, convertir los azúcares, tales como glucosa, de forma directa o indirecta en el producto de fermentación deseada. También son adecuados los organismos fermentados capaces de convertir los azúcares C5 tales como la xilosa en un producto de fermentación deseada.

30 Ejemplos de organismos de fermentación incluyen organismos fúngicos, especialmente levadura. La levadura preferida incluye cepas de *Saccharomyces spp.*, en particular una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces uvarum*; una cepa de *Pichia*, preferiblemente *Pichia stipitis*, tal como *Pichia stipitis* CBS 5773 una cepa de *Candida*, en particular una cepa de *Candida utilis*, *Candida diddensii*, o *Candida boidinii*. Otra levadura contemplada incluye cepas de *Zymomonas*; *Hansenula*, en particular *H. anomala*; *KLUyveromyces*, en particular *K. fragilis*; y *Schizosaccharomyces*, en particular *S. pombe*.

40 [0067] La levadura disponible comercialmente incluye, por ejemplo, levadura ETHANOL RED™ (disponible en Fermentis/Lesaffre, EE.UU.), FALI (disponible en Fleischmann's Yeast, EE.UU.), levadura fresca SUPERSTART y THERMOSACC™ (disponible en Ethanol Technology, WI, EE.UU.), BIOFERM AFT y XR (disponible en NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, EE.UU.), GERT STRAND (disponible en Gert Strand AB, Suecia), y FERMIOL (disponibles en DSM Specialties). ANQI YEAST (disponible en Anqi yeast (CHIFENG) CO., LTD, China).

Enzimas

45 [0068] Aunque no se ha mencionado específicamente en el contexto de un proceso de la invención, debe entenderse que las enzimas (así como otros compuestos) se usan en una "cantidad eficaz".

Celulasas

50 [0069] El término "celulasas" como se utiliza en este caso se entiende como que comprende las celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91), por ejemplo, celobiohidrolasa I y celobiohidrolasa II, al igual que las endoglucanasas (EC 3.2.1.4) y beta-glucosidasas (EC 3.2.1.21).

55 [0070] Para ser eficaz, la digestión de celulosa y hemicelulosa requiere diferentes tipos de enzimas que actúan cooperativamente. Al menos tres categorías de enzimas son necesarias para convertir celulosa en azúcares fermentables: endoglucanasas (EC 3.2.1.4) que cortan las cadenas de celulosa al azar; celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) que disocian unidades de celobiosas de los extremos de cadena de celulosa y beta-glucosidasas (EC 3.2.1.21) que convierten la celobiosa y las celodextrinas solubles en glucosa. Entre estas tres categorías de enzimas implicadas en la biodegradación de la celulosa, las celobiohidrolasas son las enzimas llave para la degradación de celulosa cristalina nativa. El término "celobiohidrolasa I" es definido aquí como una actividad de celulosa 1,4-beta-celobiosidasa (también referida como exo-glucanasa, exo-celobiohidrolasa o 1,4-beta-celobiohidrolasa), tal y como se define en la clase enzimática EC 3.2.1.91 que cataliza la hidrólisis de enlaces glucosídicos 1,4-beta-D en la celulosa y celotetraosa, por la liberación de celobiosa de los extremos no reducidos de las cadenas. La definición del término "actividad de la celobiohidrolasa II" es idéntica, excepto que la celobiohidrolasa II ataca desde los extremos reducidos de las cadenas.

65 [0071] Endoglucanasas (EC n.º 3.2.1.4) catalizan la endohidrólisis de enlaces glicosídicos 1,4- beta-D en la celulosa,

derivados de la celulosa (tales como la carboximetilcelulosa y la hidroxietil celulosa), liquenina, enlaces beta-1,4 en glucanos beta-1,3 mezclados, tales como glucanos beta-D de cereal o xiloglucanos y otros materiales vegetales que contienen partes celulósicas. El nombre autorizado es endo-1,4-beta-D-glucano-4-glucano hidrolasa, pero en la presente especificación se utiliza el término abreviado endoglucanasa.

[0072] Las celulasas pueden comprender un módulo de unión de carbohidratos (CBM) que realizan la unión de la enzima a una fibra con celulosa y aumentan la eficacia de la parte activa catalítica de la enzima. Un CBM se define como una secuencia de aminoácidos contigua dentro de una enzima activa de carbohidrato con un pliegue discreto con actividad de enlace de carbohidratos. Para más información sobre los CBM véase el servidor de internet CAZy (Supra) o Tomme et al., (1995) en *Enzymatic Degradation of Insoluble Polysaccharides* (Saddler, J.N. & Penner, M., eds.), *Cellulose-binding domains: classification and properties*. Págs. 142-163, American Chemical Society, Washington.

[0073] La actividad de celulasa puede, en una forma de realización preferida, derivar de una fuente fúngica, tal como una cepa del género *Trichoderma*, preferiblemente una cepa de *Trichoderma reesei*; una cepa del género *Humicola*, tal como una cepa de *Humicola insolens*; o una cepa de *Chrysosporium*, preferiblemente una cepa de *Chrysosporium lucknowense*.

[0074] En una forma de realización preferida, las celulasas pueden ser una preparación tal y como se define en la aplicación pendiente de la solicitud US # 60/941,251, que por la presente es incorporada como referencia. En una forma de realización preferida, la preparación con celulasa que comprende un polipéptido con actividad celulolítica de aumento (GH61A), preferiblemente aquella descrita en el documento WO2005074656. La preparación con celulasa puede comprender, además, una beta-glucosidasa, como la proteína de fusión descrita en el documento US 60/832,511. En una forma de realización, la preparación con celulasa también comprende un CBH II, preferiblemente *Thielavia terrestris* celobiohidrolasa II CEL6A. En una forma de realización, la preparación con celulasa también comprende una preparación de enzimas de celulasa, preferiblemente aquella derivada de *Trichoderma reesei*. En una forma de realización preferida, la preparación de celulasa es la preparación con celulasa A utilizada en el ejemplo 1 descrita en la solicitud pendiente US # 60/941,251.

[0075] En una forma de realización, la celulasa es el producto CELLUCLAST® de 1,5 L disponible comercialmente o CELLUZYME™ (Novozymes A/S, Dinamarca).

[0076] Se puede añadir una celulasa para hidrolizar el material pretratado que contiene lignocelulosa. La celulasa se puede dosificar en el rango de 0,1-100 FPU por gramo de sólidos secos (DS), preferiblemente 0,5-50 FPU por gramo de DS, especialmente 1-20 FPU por gramo de DS.

Hemicelulasas

[0077] La hemicelulosa puede descomponerse mediante hemicelulasas y/o hidrólisis ácida para liberar sus cinco y seis componentes de azúcar de carbono. En una forma de realización de la invención del material derivado de lignocelulosa se puede tratar con una o más hemicelulasas.

[0078] Se puede utilizar cualquier hemicelulasa adecuada para el uso en la hemicelulosa hidrolizada. Las hemicelulasas preferidas incluyen xilanasas, arabinofuranosidasas, acetil xilano esterasa, feruloil esterasa, glucuronidasas, endo-galactanasas, manasas, endo- o exoarabinasas de sialidasa, exo-galactanasas, y mezclas de dos o más de las mismas. Preferiblemente, la hemicelulasa para uso en la presente invención es una hemicelulasa exo-actuante, y más preferiblemente, la hemicelulasa es una hemicelulasa exo-actuante que tiene la capacidad de hidrolizar la hemicelulosa bajo condiciones ácidas por debajo del pH 7, preferiblemente pH 3-7. Un ejemplo de hemicelulasa adecuada para el uso en la presente invención incluye VISCOZYME™ (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

[0079] La arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) cataliza la hidrólisis de residuos de alfa-L-arabinofuranosida terminales no reductores en alfa-L-arabinosidas.

[0080] La galactanasas (EC 3.2.1.89), arabinogalactano endo-1,4-beta-galactosidasa, cataliza la endo hidrólisis de enlaces 1,4-D-galactosídicos en arabinogalactanos.

[0081] La pectinasa (EC 3.2.1.15) cataliza la hidrólisis de los enlaces 1,4-alfa-D-galactosidurónicos en pectato y otros galacturonanos.

[0082] La xiloglucanasa cataliza la hidrólisis del xiloglucano.

[0083] La hemicelulasa puede añadirse en una cantidad eficaz para hidrolizar hemicelulosa, tal como, en cantidades de aproximadamente 0,001 a 0,5% en peso de sólidos secos (DS), más preferiblemente de aproximadamente 0,05 a 0,5% en peso de DS.

Alfa-amilasa

[0084] Según la invención, se puede utilizar una alfa-amilasa. En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida, por ejemplo, alfa-amilasa ácida fúngica o alfa-amilasa ácida bacteriana. El término "alfa-amilasa ácida" significa una alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) la cual añadida en una cantidad eficaz posee una actividad óptima a un pH en el rango de 3 a 7, preferiblemente de 3,5 a 6, o más preferiblemente de 4 a 5.

Alfa-amilasa bacteriana

[0085] Según la invención, la alfa-amilasa bacteriana se deriva preferiblemente del género *Bacillus*.

[0086] En una forma de realización preferida la alfa-amilasa de *Bacillus* se deriva de una cepa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* o *B. stearothermophilus*, pero también se puede derivar de otro *Bacillus sp.* Ejemplos específicos de alfa-amilasas contempladas incluyen la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en la SEQ ID n.º: 4 en el documento WO9919467, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* de la SEQ ID n.º: 5 en el documento WO9919467 y la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en la SEQ ID n.º: 3 en el documento WO9919467 (todas las secuencias incorporadas por la presente como referencia). En una forma de realización de la invención, la alfa-amilasa puede ser una enzima con un grado de identidad de al menos el 60%, preferiblemente al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 80%, incluso más preferiblemente al menos el 90%, tal como al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% a cualquiera de las secuencias mostradas en la SEQ ID n.º: 1, 2 o 3, respectivamente, en el documento WO9919467.

[0087] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o híbrido, especialmente uno descrito en cualquiera de los documentos WO9623873, WO9623874, WO9741213, WO9919467, WO0060059 y WO0210355 (todos los documentos incorporados por la presente como referencia). Las variantes de alfa-amilasa contempladas específicamente son descritas en las patentes estadounidenses con n.º 6,093,562, 6,297,038 o 6,187,576

[0088] (Por la presente incorporadas como referencia) e incluyen variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (alfa-amilasa BSG) con una delección de uno o dos aminoácidos en las posiciones R179 a G182, preferiblemente una delección doble descrita en el documento WO1996023873; véase, por ejemplo, la página 20, líneas 1-10 (por la presente incorporada como referencia), preferiblemente correspondiente a delta (181-182) en comparación con la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre de la alfa-amilasa BSG expuesto en la SEQ ID n.º: 3 descrito en el documento WO9919467 o la delección de los aminoácidos R179 y G180 de la SEQ ID n.º: 3 en el documento WO9919467 para numeración (cuya referencia es por la presente incorporada como referencia). Más preferidas son incluso las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente las alfa-amilasas de *Bacillus stearothermophilus*, que posee una delección doble correspondiente a delta (181-182) y, además, comprende una sustitución N193F (también denominada I181* + G182* + N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa BSG tipo silvestre expuesta en la SEQ ID n.º: 3 descrita en el documento WO9919467.

Alfa-amilasa híbrida bacteriana

[0089] Una alfa-amilasa híbrida específicamente contemplada comprende residuos de aminoácidos 445 C-terminales de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada en la SEQ ID n.º: 4 del documento WO9919467 y los residuos de aminoácidos 37 N-terminales de la alfa-amilasa derivada del *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrado en la SEQ ID n.º: 5 del documento WO9919467), con uno o más, especialmente todos, de la siguiente sustitución: G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S (usando la numeración de *Bacillus licheniformis* en la SEQ ID n.º: 4 del documento WO9919467). También se prefieren variantes con una o varias de las siguientes mutaciones (o mutaciones correspondientes en otra columna vertebral de alfa-amilasa de *Bacillus*): H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S y/o delección de dos residuos entre las posiciones 176 y 179, preferiblemente la delección de E178 y G179 (usando el SEQ ID n.º: 5 numeración del documento WO9919467).

Alfa-amilasa fúngica

[0090] Las alfa-amilasas fúngicas incluyen alfa-amilasas derivadas de una cepa del género *Aspergillus*, tales como, alfa-amilasas *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus kawachii*.

[0091] Una alfa-amilasa fúngica ácida preferida es una alfa-amilasa de tipo Fungamyl que es derivada de una cepa de *Aspergillus oryzae*. Según la presente invención, el término "alfa-amilasa de tipo Fungamyl" indica una alfa-amilasa que muestra una identidad alta, es decir, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85% al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o incluso el 100% de identidad con respecto a la parte madura de la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID n.º: 10 en el documento WO9623874.

[0092] Otra alfa-amilasa ácida preferida se deriva de una cepa de *Aspergillus niger*. En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa fúngica ácida es una de las *A. niger* descritas como "AMYA_ASPNG" en la base de datos Swiss-prot/TrEMBL bajo el registro primario n.º P56271 y es descrita en el documento WO8901969 (ejemplo 3). Una alfa-amilasa fúngica de ácido disponible comercialmente derivada de la *Aspergillus niger* es SP288 (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

[0093] Otras alfa-amilasas contempladas de tipo salvaje incluyen aquellas derivadas de una cepa de los géneros *Rhizomucor* y *Meripilus*, preferiblemente una cepa de *Rhizomucor pusillus* (documento WO2004055178 incorporado como referencia) o *Meripilus giganteus*.

[0094] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa se deriva del *Aspergillus kawachii* y es descrita por Kaneko et al. J. Ferment. Bioeng. 81:292-298(1996) "Molecular-cloning and determination of the nucleotide-sequence of a gene encoding an acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus kawachii*."; y además como EMBL:#AB008370.

[0095] La alfa-amilasa fúngica también puede ser una enzima tipo salvaje que comprende un dominio de unión al almidón (SBD) y un dominio catalítico de alfa-amilasa (es decir, no híbrido), o una variante del mismo. En una forma de realización, la alfa-amilasa tipo salvaje se deriva de una cepa de *Aspergillus kawachii*.

Alfa-amilasa híbrida fúngica

[0096] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa de ácido fúngico es una alfa-amilasa híbrida. Ejemplos preferidos de alfa-amilasas híbridas fúngicas incluyen aquellos descritos en el documento WO2005003311 o en la publicación de patente estadounidense n.º 2005/0054071 (Novozymes) o la solicitud de patente estadounidense n.º 60/638,614 (Novozymes) que se incorpora por la presente como referencia. Una alfa-amilasa híbrida puede comprender un dominio catalítico de alfa-amilasa (CD) y un dominio/módulo de unión a carbohidratos (CBM), tal como un dominio de unión al almidón, y opcionalmente un enlazador.

[0097] Ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellos descritos en las tablas 1 a 5 de los ejemplos en la solicitud de patente estadounidense n.º 60/638,614, incluyendo la variante Fungamyl con dominio catalítico JA118 y *Athelia rolfsii* SBD (SEQ ID n.º:100 en el documento US 60/638,614), alfa-amilasa *Rhizomucor pusillus* con enlazador AMG de *Athelia rolfsii* y SBD (SEQ ID n.º:101 en el documento US 60/638,614), alfa-amilasa *Rhizomucor pusillus* con de *Aspergillus niger* y SBD (que es descrito en la tabla 5 como una combinación de secuencias de aminoácidos SEQ ID n.º: 20 SEQ ID n.º: 72 y SEQ ID NO: 96 en la solicitud de patente estadounidense n.º 11/316,535 y además como SEQ ID n.º: 13 aquí) o como V039 en la tabla 5 en el documento WO2006069290, y alfa-amilasa de *Meripilus giganteus* con enlazador de glucoamilasa de *Athelia rolfsii* y SBD (SEQ ID n.º: 102 en el documento US 60/638,614). Otras alfa-amilasas híbridas contempladas específicamente son cualquiera de aquellas enumeradas en las tablas 3, 4, 5, y 6 en el ejemplo 4 en la solicitud de patente estadounidense n.º 11/316,535 y el documento WO2006069290 (incorporados por la presente como referencia).

[0098] Otros ejemplos específicos de las alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellos descritos en la publicación de patente estadounidense n.º 2005/0054071, incluyendo aquellos descritos en la tabla 3 en la página 15, tales como alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con enlazador de *Aspergillus kawachii* y dominio de unión de almidón.

[0099] También se contemplan las alfa-amilasas que muestran una identidad alta para cualquiera de las alfa-amilasas mencionadas arriba, es decir, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85% al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o incluso el 100% de identidad para las secuencias de enzima madura.

[0100] Según la invención, se pueden añadir unas alfa-amilasas ácidas en una cantidad de 0,1 a 10 AFAU/g de DS, preferiblemente 0,10 a 5 AFAU/g de DS, especialmente 0,3 a 2 AFAU/g de DS.

Productos comerciales de alfa-amilasa

[0101] Las composiciones comerciales preferidas que comprenden alfa-amilasa incluyen MICOLASA de DSM, BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYME™ X y SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L (Novozymes A/S) y CLARASE™ L-40,000, DEX-LO™, SPEZYME™ FRED, SPEZYME™ AA, y SPEZYME™ DELTA AA (Genencor Int.), y la alfa-amilasa ácida fúngica se vende con el nombre comercial SP288 (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

Enzima generadora de fuente de carbohidratos

[0102] El término "enzima generadora de fuente de carbohidratos" incluye glucoamilasa (son generadores de glucosa), beta-amilasa y amilasa maltogénica (son generadores de maltosa). Una enzima generadora de fuente de carbohidratos es capaz de producir un carbohidrato que se puede usar como una fuente de energía por el(los) organismo(s) de fermentación en cuestión, por ejemplo, cuando se usa en un proceso de la invención para producir un producto de fermentación, tal como etanol. El carbohidrato generado se puede convertir directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado, preferiblemente etanol. Según la invención, se puede utilizar una mezcla de enzimas generadoras de fuente de carbohidratos. Las mezclas especialmente contempladas son mezclas de al menos una glucoamilasa y una alfa-amilasa, especialmente una amilasa ácida, incluso más preferiblemente una alfa-amilasa ácida fúngica. La proporción entre actividad de alfa-amilasa fúngica ácida (AFAU) por actividad de glucoamilasa (AGU) (AFAU por AGU), en una forma de realización de la invención, puede estar al menos en 0,1, en particular al menos en 0,16, así como en el rango de 0,12 a 0,50 o más.

Glucoamilasas

5 [0103] Una glucoamilasa utilizada según la invención se puede derivar de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, derivarse de un microorganismo o una planta. Las glucoamilasas preferidas son de origen bacteriano o fúngico, seleccionadas del grupo que consiste en glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular glucoamilasa de *A. niger* G1 o G2 (Boel et al. (1984), EMBO J. 3 (5), p. 1097- 1102), o variantes de la misma, tal como aquella descrita en los documentos WO9200381, WO0004136 y WO0104273 (de Novozymes, Dinamarca); la glucoamilasa de *A. awamori* descrita en el documento WO8402921, la glucoamilasa de *A. oryzae* (Agric. Biol. Chem. (1991), 55 (4), p. 941-949), o variantes o fragmentos de las mismas. Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes con termoestabilidad mejorada: G137A y G139A (Chen et al. (1996), Prot. Eng. 9,499-505); D257E y D293E/Q (Chen et al. (1995), Prot. Eng. 8,575-582); N182 (Chen et al. (1994), Biochem. J. 301,275-281); enlaces de disulfuro, A246C (Fierobe et al. (1996), Biochemistry, 35, 8698-8704; e introducción de residuos Pro en la posición A435 y S436 (Li et al. (1997), Protein Eng. 10,1199-1204.

15 [0104] Otras glucoamilasas incluyen glucoamilasa *Athelia rolfsii* (previamente denominada *Corticium rolfsii*) (ver patente estadounidense n.º 4,727,026 y (Nagasaka, Y. Et al. (1998) "Purification and properties of the raw starch degrading glucoamylases from *Corticium rolfsii*, Microbiol Appl biotecnol 50:323-330), glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular derivadas de *Talaromyces emersonii* (W09928448), *Talaromyces leycettanus* (patente estadounidense n.º RE 32,153), *Talaromyces duponti*, *Talaromyces thermophilus* (patente estadounidense n.º 4,587,215).

20 [0105] Las glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (EP 135,138), y *C. thermohydrosulfuricum* (WO86/01831) y *Trametes cingulata* descrita en el documento WO2006069289 (que es incorporado por la presente como referencia).

25 [0106] La glucoamilasa híbrida también está contemplada según la invención. En el documento WO2005045018 se describen ejemplos de glucoamilasas híbridas. Los ejemplos específicos incluyen la glucoamilasa híbrida descrita en las tablas 1 y 4 del ejemplo 1 (cuyos híbridos se incorporan por la presente como referencia).

30 [0107] También se contemplan las glucoamilasas que muestran una identidad alta para cualquiera de las glucoamilasas mencionadas anteriormente, es decir, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85% al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o incluso el 100% de identidad para las secuencias de enzimas maduras.

35 [0108] Las composiciones disponibles comercialmente que comprenden glucoamilasa incluyen AMG 200L; AMG 300 L; SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA, SPIRIZYME™ PLUS, SPIRIZYME™ FUEL, SPIRIZYME™ B4U y AMG™ E (de Novozymes A/S); OPTIDEX™ 300 (de Genencor Int.); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUS (de DSM); G-ZYME™ G900, G-ZYME™ y G990 ZR (de Genencor Int.).

40 [0109] En una forma de realización, las glucoamilasas se pueden añadir en una cantidad de 0,02-20 AGU/g de DS, preferiblemente 0,1-10 AGU/g de DS, especialmente entre 1-5 AGU/g de DS, tal como 0,5 AGU/g de DS.

Amilasa maltogénica

45 [0110] La amilasa también puede ser una alfa-amilasa maltogénica. Una "alfa-amilasa maltogénica" (glucano 1,4-alpha-maltohidrolasa, E.C. 3.2.1.133) es capaz de hidrolizar amilosa y amilopectina en maltosa en la configuración alfa. Una amilasa maltogénica de la cepa *Bacillus stearothermophilus* NCIB 11837 está comercialmente disponible en Novozymes A/S. Las alfa-amilasas maltogénicas se describen en las patentes estadounidenses n.º 4,598,048, 4,604,355 y 6,162,628, las cuales se incorporan por la presente como referencia.

50 [0111] En una forma de realización preferida, la amilasa maltogénica se puede añadir en una cantidad de 0,05-5 mg total proteína/gramo de DS o 0,05-5 MANU/g de DS.

Proteasas

55 [0112] La proteasa puede ser cualquier proteasa según la invención. En una forma de realización preferida la proteasa es una proteasa ácida de origen microbiano, preferiblemente de origen bacteriano o fúngico.

60 [0113] Las proteasas adecuadas incluyen proteasas microbianas, tales como proteasas bacterianas y fúngicas. Las proteasas preferidas son proteasas ácidas, es decir, proteasas caracterizadas por la capacidad de hidrolizar proteínas bajo condiciones ácidas por debajo del pH 7.

65 [0114] Las proteasas fúngicas de ácido contempladas incluyen proteasas fúngicas derivadas de *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Candida*, *Coriolus*, *Endothia*, *Entomophtra*, *Irpex*, *Penicillium*, *Sclerotium* and *Torulopsis*. Se contemplan especialmente proteasas derivadas de *Aspergillus niger* (véase, por ejemplo, Koaze et al., (1964), Agr. Biol. Chem. Japón, 28, 216), *Aspergillus saitoi* (véase, por ejemplo, Yoshida, (1954) J. Agr. Chem. Soc. Japón, 28,66), *Aspergillus*

awamori (Hayashida et al., (1977) Agric. Biol. Chem., 42(5), 927-933, *Aspergillus aculeatus* (WO95/02044), o *Aspergillus oryzae*, tal como la proteasa pepA; y las proteasas ácidas de *Mucor pusillus* o *Mucor miehei*.

[0115] También se contemplan proteasas neutrales o alcalinas, tales como una proteasa derivada de una cepa de *Bacillus*. Una proteasa particular contemplada por la invención está derivada del *Bacillus amyloliquefaciens* y posee la secuencia que se puede obtener en Swissprot como n.º de registro P06832. También se contemplan las proteasas con al menos el 90% de identidad para la secuencia de aminoácidos que se pueden obtener en Swissprot como n.º de registro P06832 tal como al menos el 92%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, o particularmente al menos el 99% identidad.

[0116] Además, se contemplan las proteasas con al menos el 90% de identidad para la secuencia de aminoácidos descritas como SEQ ID n.º: 1 en el documento WO2003048353 tal como el 92%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, o particularmente al menos el 99% de identidad.

[0117] También se contemplan proteasas de tipo papaína, así como proteasas dentro de E.C. 3.4.22.* (proteasa de cisteína), tal como EC 3.4.22.2 (papaína), EC 3.4.22.6 (quimopapaína), EC 3.4.22.7 (asclepaina), EC 3.4.22.14 (actinidaina), EC 3.4.22.15 (catepsina L), EC 3.4.22.25 (glicil-endopeptidasa) y EC 3.4.22.30 (caricaina).

[0118] Se pueden añadir proteasas en las cantidades de 0,1-1000 AU/kg dm, preferiblemente 1-100 AU/kg de DS y más preferiblemente 5-25 AU/kg de DS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Enzimas:

[0119] Preparación A de celulasa: composición celulolítica que comprende un polipéptido con actividad de aumento celulolítico (GH61A) descrita en el documento WO2005074656; una beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (en la proteína de fusión descrita en el documento US 60/832,511), y una preparación de enzimas celulolíticas derivada a partir de *Trichoderma reesei*. La preparación A de celulasa se describe en la solicitud estadounidense pendiente # 60/941,251.

Determinación de identidad

[0120] La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos es descrita por el parámetro "identidad".

[0121] El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar por el método Clustal (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) usando el software LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineación múltiple: penalización del espacio de 10 y penalización de longitud del espacio de 10. Parámetros de alineación en parejas son ktuple=1, penalización de espacio=3, ventanas=5, y diagonales=5.

[0122] El grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se pueden determinar por el método Wilbur-Lipman (Wilbur y Lipman, 1983, Proceedings of the National Academy of Science, EE.UU 80: 726-730) usando el software LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineación múltiple: penalización del espacio de 10 y penalización de longitud del espacio de 10. Parámetros de alineación de pareja son ktuple=3, penalización de espacio=3, y ventanas=20.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

[0123] El forraje de maíz fue pretratado usando explosión de vapor a 205 °C durante 5,4 min. El forraje de maíz pretratado (PCS) 666 g con DS del 38% fue mezclado con 2L de solución de lavado acuosa (agua para proporción de peso PCS 3:1) e incubado con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución de lavado utilizada del PCS fue extraída a través de 8 capas de estameña y filtrada a través de 32 capas de estameñas. Se obtuvo aproximadamente 1800 ml de solución de lavado utilizada. La solución de lavado utilizada fue tratada por incubación con 500 g de resina D380 (promedio de solución de lavado utilizada para la proporción de resina aproximadamente 3:1) en un vaso de precipitación durante 60 minutos con agitación. D380 es un intercambiador de aniones débilmente básico macroporoso. Antes del uso, la resina fue lavada de una forma convencional. La solución de lavado tratada fue reciclada para lavar un lote nuevo de 600 g de PCS sin lavar, seguido de separación, filtración, y tratamiento y reciclaje de resina para un lavado todavía. Esta solución de lavado fue reciclada 5 veces para lavar 5 lotes de PCS sin lavar. Como tratamiento de control, la solución de lavado utilizada fue reciclada sin tratamiento de resina 5 veces. Aproximadamente el 90% de la solución de lavado fue recuperada por cada lavado. El tamaño de la parte PCS posterior disminuyó correspondientemente para mantener el agua constante para la proporción de peso PCS.

5 [0124] El PCS lavado fue sometido a un proceso de hidrólisis de lote alimentado empezando por una hidrólisis de lote que comprende 110 g de agua y sustrato con una concentración de sólidos secos iniciales del 12%. Se añadió penicilina para controlar la contaminación bacteriana. La composición de celulasa A fue utilizada para la hidrólisis enzimática en una concentración de 138 EGU/g celulosa. El PCS lavado fue añadido en 3 cargas adicionales a un peso final de 350 gramos y una concentración de sólidos secos final del 25%. El proceso de hidrólisis de lote alimentado fue realizada a 50 °C y pH 4,8. A menos que se especificara, el tiempo de hidrólisis total fue 96 horas. Los resultados se muestran en la tabla 1.

10 [0125] Los hidrolizados fueron juntados con levadura seca Anqi (0,5% p/p), 0,25% de urea y fermentaron a 32 °C durante 6 días. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 1. Hidrólisis de PCS lavado mediante el uso de agua reciclada con y sin tratamiento de resina. Rendimiento de glucosa de la celulosa (%). *Muestra tomada después de 120 horas de hidrólisis	
Ciclo n.º 1	62,14
Ciclo n.º 5 con resina	53,05
Ciclo n.º 5 sin resina*	44,99

Tabla 2. Fermentación de hidrolizados de PCS lavado en el agua de reciclaje con o sin tratamiento de resina de agua de lavado. Producción de etanol (g/L)						
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
Ciclo n.º 1	16,96	27,04	37,97	39,29	39,98	40,68
Ciclo n.º 5 con resina	4,80	15,50	30,28	34,34	36,37	37,76
Ciclo n.º 5 sin resina	0,49	0,67	0,77	0,87	0,91	1,00

15 [0126] La invención reivindicada y descrita aquí no debe ser limitada en su alcance por las formas de realización específicas aquí descritas, ya que estas formas de realización se destinan como ilustraciones de diferentes aspectos de la invención. Cualquier forma de realización equivalente está destinada a estar dentro del campo de esta invención. De hecho, varias modificaciones de la invención, además de aquellas descritas y mostradas aquí, serán evidentes para los expertos en la técnica de la descripción precedente. Dichas modificaciones también están destinadas a incluirse en el campo de las reivindicaciones anexas. En caso de conflicto, la presente divulgación incluyendo las definiciones, será determinante.

[0127] Aquí se citan varias referencias, cuyas las descripciones se incorporan como referencia en su totalidad.

25 Ejemplo 2

30 [0128] El forraje de maíz fue pretratado utilizando la explosión de vapor a 200 °C durante 5,4 min. El forraje de maíz pretratado (PCS) 666 g con TS de 32,12% fue mezclado con 2L de solución de lavado acuosa (agua para proporción de peso PCS 3:1) e incubado mediante agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución de lavado utilizada del PCS fue extraída a través de 8 capas de estameña y filtrada a través de 32 capas de estameña. Se obtuvo aproximadamente 1800 ml de solución de lavado utilizada. La solución de lavado utilizada fue tratada por incubación con 500 g de resina D380 y H103 (promedio de solución de lavado utilizada para proporción de resina aproximadamente 3:1) en un vaso de precipitación durante 60 minutos con agitación. D380 es un intercambiador macroporoso aniónico débilmente básico y H103 es una resina macroporosa no polar. Antes de usar la resina, esta fue lavada de una forma convencional. La solución de lavado tratada fue reciclada para lavar un lote nuevo de 600 g de PCS sin lavar, seguido de la separación, filtración, y tratamiento de resina y reciclaje para un lavado todavía. Esta solución de lavado fue reciclada 5 veces para lavar 5 lotes de PCS sin lavar. Como tratamiento de control, se recicló una solución de lavado utilizada sin tratamiento de resina 5 veces. Se recuperó aproximadamente el 90% de la solución de lavado de cada lavado. El tamaño de la parte PCS posterior disminuyó correspondientemente para mantener el agua constante para la proporción de peso de PCS.

45 [0129] El PCS lavado fue sometido a un proceso de hidrólisis de lote alimentado empezando con una hidrólisis de lote que comprende 50 g de agua y sustrato con una concentración de sólidos secos iniciales del 12,60%. La penicilina fue añadida para controlar la contaminación bacteriana. La composición de celulasa A fue utilizada para la hidrólisis enzimática en una concentración de 45 mg EP/g de celulosa. El PCS lavado fue añadido en 3 cargas adicionales a un peso final de 300 gramos y una concentración final de sólidos secos del 30%. El proceso de hidrólisis de lote alimentado fue realizada a 50 °C y pH 4,8. Se tomaron las muestras a las 72 horas, 96 horas y 120 horas para realizar análisis de azúcar. Los resultados se muestran en la tabla 1.

50 [0130] Los hidrolizados fueron centrifugados y filtrados mediante papel de filtro. El hidrolizado filtrado fue juntado con levadura seca (0,5% p/p), 0,25% de urea y fermentada a 32 °C durante 7 días. Los resultados se muestran en la tabla 2.

ES 2 425 596 T3

Tabla 1. Hidrólisis de PCS lavado mediante el uso de agua reciclada con y sin tratamiento de resina D380 o H103. Rendimiento de glucosa de celulosa (% teórico). Probado después de 72 horas, 96 horas y 120 horas de hidrólisis.			
	72 Horas	96 Horas	120 Horas
Ciclo n.º 1	63,63	72,29	74,84
Ciclo n.º 5 D380	60,31	72,03	76,11
Ciclo n.º 5 H103	62,39	70,45	70,88
Ciclo n.º 5 sin resina	46,21	57,36	60,33

Tabla 2. Fermentación de hidrolizados de PCS lavado en agua de reciclaje con o sin tratamiento de resina D380 o H103 de agua de lavado. Producción de etanol (q/L) después de una fermentación de 7 días.	
Ciclo n.º 1	49,87
Ciclo n.º 5 D380	52,32
Ciclo n.º 5 H103	1,86
Ciclo n.º 5 sin resina	1,33

REIVINDICACIONES

1. Proceso para convertir un material que contiene lignocelulosa en un hidrolizado que comprende mono- y oligosacáridos, el método incluye las etapas de;
- 5 a) someter un material que contiene lignocelulosa a un pretratamiento,
 b) lavar el material pretratado que contiene lignocelulosa en una solución de lavado,
 c) separar la solución de lavado utilizada para obtener un material pretratado y lavado que contiene lignocelulosa,
 d) someter el material pretratado y lavado que contiene lignocelulosa a una hidrólisis enzimática dando como resultado al menos una hidrólisis parcial de la celulosa y/o hemicelulosa para obtener un hidrolizado que comprende mono- y/o oligosacáridos,
 10 y repetir continuamente los pasos (a) a (d), donde la solución de lavado utilizada del paso (b) se trata para eliminar un inhibidor enzimático y/o un inhibidor de un organismo fermentador antes de ser reciclada para el paso (b).
- 15 2. Proceso según la reivindicación 1, donde el material que contiene lignocelulosa se origina de materiales seleccionados del grupo que comprende: forraje de maíz, fibra de maíz, madera dura, tal como álamo y abedul, madera blanda, paja de cereal, tal como, paja de trigo, Panicum Virgatum, cáscara del arroz, residuos sólidos urbanos, residuos orgánicos industriales, papel de oficina, o mezclas de los mismos.
- 20 3. Proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el material que contiene lignocelulosa es pretratado químicamente y/o mecánicamente en la fase (a).
4. Proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el material que contiene lignocelulosa es pretratado químicamente en la fase (a) usando ácido.
- 25 5. Proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el material que contiene lignocelulosa es pretratado mecánicamente en la fase (a) a una alta temperatura y/o una alta presión.
6. Proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el material que contiene lignocelulosa es pretratado en la fase (a) mediante explosión de vapor, explosión de vapor de ácido diluido y/o oxidación en húmedo.
- 30 7. Proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la solución de lavado del paso (b) comprende agua, disolvente orgánico o una mezcla de agua y un disolvente orgánico.
- 35 8. Proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la solución de lavado acuosa utilizada del paso (b) es tratada por contacto de ésta con una columna de resina antes de ser reciclada al paso (b).
9. Proceso de las reivindicaciones 1 a 8, donde la resina comprende -NH₂ como grupo funcional.
- 40 10. Proceso de las reivindicaciones 1 a 9, donde los inhibidores de enzimas y/o inhibidores del organismo fermentador son terpenos, aldehído, aromáticos polihidroxi, alcohol 4-hidroxibencílico, 4-hidroxibenzaldehído, ácido 4-hidroxibenzoico, trimetil benzaldehído, ácido 2-furoico, ácido cumárico, ácido ferúlico, fenol, guayacol, veratrol, pirogalolol, pirogalol mono éter metílico, vainillil alcohol, vainillina, isovainillina, ácido vanílico, ácido isovanílico, 4-hidroxil-3-metoxifenilacetato, veratril alcohol, veratraldehído, ácido verátrico, ácido 2-O-metil gálico, siringil alcohol, siringaldehído, ácido sirngico, ácido trimetil gálico, homocatecol, vanillina etílica, creosol, 4-metilanisol, anisalaldehído, ácido anísico, o combinaciones de los mismos.
- 45 11. Proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la hidrólisis, y/o la fermentación se lleva a cabo usando una o más hidrolasas seleccionadas del grupo que consiste en celulasa, hemicelulasa, amilasa, proteasa, esterasa; tales como endoglucanasa, beta-glucosidasa, celobiohidrolasa, celobiasa, xilanasas, alfa-amilasa, alfa-glucosidasa, glucoamilasa, proteasas y lipasas, o una mezcla de los mismos.
- 50 12. Proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde la hidrólisis se realiza a una temperatura entre 25 °C y 70 °C, preferiblemente entre 40 °C y 60 °C, especialmente alrededor de 50 °C.
- 55 13. Proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde la hidrólisis se lleva a cabo a un pH en el rango de 3-8, preferiblemente un pH 4-6, especialmente alrededor de pH 5.
- 60 14. Proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que comprende, además, la puesta en contacto del hidrolizado del paso (d) con un organismo fermentador para producir un producto de fermentación.
15. Proceso según la reivindicación 14, donde la fermentación se lleva a cabo entre 25 °C y 40 °C, preferiblemente alrededor de 30 a alrededor de 38 °C, especialmente alrededor de 32 °C.
- 65 16. Proceso de cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, que comprende, además, un paso que comprende la recuperación del producto de fermentación, por ejemplo por destilación.

17. Proceso de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, donde el pH durante la fermentación se encuentra en el rango de 3-7, preferiblemente pH 4-6, especialmente entre pH 4 y 5.

5 18. Proceso de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, donde el organismo fermentador en el paso e) es una levadura.

19. Proceso de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, donde el producto de fermentación es un alcohol, preferiblemente etanol.

10

20. Proceso de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, donde el pH durante la fermentación se encuentra en el rango de 3-7, preferiblemente pH 4-6, especialmente entre pH 4 y 5.