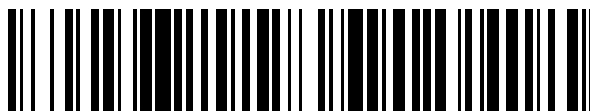


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 731**

51 Int. Cl.:

C12P 7/56 (2006.01)

C12P 7/40 (2006.01)

C12N 1/22 (2006.01)

C12M 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2008 E 08793837 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 2191004**

54 Título: **Pretratamiento alcalino suave y sacarificación y fermentación simultáneas de biomasa lignocelulósica en ácidos orgánicos**

30 Prioridad:

23.08.2007 EP 07114875

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

31.10.2013

73 Titular/es:

**STICHTING DIENST LANDBOUWKUNDIG
ONDERZOEK (100.0%)
Droevendaalsesteeg 4
6708 PB Wageningen, NL**

72 Inventor/es:

**BAKKER, ROBERT REURD CHRISTOPHOR;
DE JONG, ED;
MAAS, RONALD HUBERTUS WILHELMUS;
WEUSTHUIS, RUUD ALEXANDER;
VISSER, DIANA;
WINKELAAR, HENDRIK MARTINUS y
JANSEN, MICKEL LEONARDUS AUGUST**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 427 731 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

Pretratamiento alcalino suave y sacarificación y fermentación simultáneas de biomasa lignocelulósica en ácidos orgánicos.

5 Campo de la invención

[0001] La invención se refiere a un método para la producción de ácidos orgánicos como un producto de fermentación de biomasa lignocelulósica, donde la biomasa lignocelulósica es pretratada usando un agente alcalino. La invención además se refiere a un reactor para llevar a cabo el método de la invención.

10

Antecedentes de la invención

[0002] Materias primas de biomasa lignocelulósica se pueden utilizar para procesos de fermentación, en particular, bioetanol y ácido láctico. Procesos convencionales para convertir materiales lignocelulósicos en productos químicos en masa, tal como ácido láctico, requiere pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación microbiana. Biomasa lignocelulósica es una fuente de carbono renovable muy disponible y poco costosa que no tiene valor alimenticio competitivo. Lignocelulosa consiste principalmente en celulosa y hemicelulosa; polímeros se desarrollan principalmente de azúcares de hexosa y azúcares de pentosa, que se introducen en una matriz del polímero fenólico de lignina. La ruta principal para derivar azúcares fermentables de lignocelulosa es a través de hidrólisis enzimática por enzimas hemicelulolíticas y celolíticas. Un pretratamiento químico y mecánico de la lignocelulosa se requiere para reducir tamaño de partícula, para modificar y/o para eliminar la lignina y con aquello mejorar la accesibilidad de los polisacáridos para hidrólisis enzimática (Claassen et al. (1999) Microbiol. Biotecnol. 52:741-755).

15

20

25

30

35

40

[0003] Varios pretratamientos químicos de biomasa han sido estudiados en la investigación y desarrollo de tecnología de producción de lignocelulosa-a-etanol (Mosier et al. (2005) Bioresour. Technol. 96:673-686). Pretratamiento alcalino de biomasa lignocelulósica con cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) a temperaturas moderadas ($<100^\circ\text{C}$) se mostró que era un pretratamiento prometedor para mejorar hidrólisis enzimática, y se puede caracterizar por una alta degradabilidad enzimática sin deslignificación significativa o degradación de xilano del sustrato lignocelulósico (Chang et al. (1998) Appl. Biochem. Biotecnol. 74:135-159). Sin embargo, este pretratamiento alcalino en un valor de pH relativamente alto (>10) no es atractivo ya que la actividad de enzimas xilanolíticas y celolíticas comunes, necesario para la despolimerización de (hemi)-celulosa, es baja en este pH. Por ejemplo, cepa de especie Bacillus 36D1 fue descrita como un biocatalizador para producción de ácido láctico a través de sacarización y fermentación simultáneas (por sus siglas en inglés SSF) en la que azúcares derivados de ambas hemicelulosa y celulosa se fermentan en un vaso único y donde la productividad volumétrica de SSF a ácido láctico era óptima con pH 5.0 a 50°C (Patel et al. biotecnol. Prog. 2005, 21,1453-1460)). Por lo tanto, reducir el pH es esencial para conseguir una hidrólisis enzimática eficaz de los polisacáridos. Un método para eliminar hidróxido cálcico es lavando la biomasa tratada de cal antes de la hidrólisis enzimática (Chang et al. (1998) Appl. Biochem. Biotecnol. 74:135-159); no obstante, esto conduce al uso de altas cantidades de agua. Otra manera para reducir el pH del material pretratado es neutralizando hidróxido cálcico con ácidos, tales como ácido sulfúrico y ácido acético, o con CO_2 . Aún esto produce la formación de las sales de valor bajo como subproducto, tal como yeso o carbonato cálcico. Por lo tanto, este problema de alto valor de pH (>10) de material lignocelulósico después del pretratamiento con cal y antes de la hidrólisis enzimática, aún no ha sido debidamente resuelto.

45

[0004] La presente invención proporciona un método para la producción de un ácido orgánico como un producto de fermentación de biomasa lignocelulósica, un reactor para llevar a cabo el método de la invención y uso del reactor para llevar a cabo el método de la invención, donde la naturaleza alcalina de la biomasa pretratada alcalina se usa en el proceso de sacarificación y fermentación simultánea para controlar el pH durante fermentación.

Descripción de la invención

50 [0005] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para la producción de un ácido orgánico como un producto de fermentación de biomasa lignocelulósica, que incluye las etapas de:

a) pretratamiento de biomasa lignocelulósica con un agente alcalino para obtener biomasa lignocelulósica pretratada alcalina con un pH de entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 14,0

55 b) sacarificación y fermentación simultánea (SSF) de la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina de fase a) en un fermentador, por la cual la reducción en pH, provocada por la producción del ácido orgánico, es neutralizada por la adición de biomasa lignocelulósica pretratada alcalina como obtenida en la fase a) con un pH de entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 14,0, opcionalmente en combinación con un álcali, para adaptar el pH por debajo de aproximadamente 8,0 y/o para mantener el pH a un específico pH por debajo de 8,0, permitiendo actividad óptima del microorganismo(s) y/o enzimas añadidas; y

60 c) opcionalmente recuperación del producto de fermentación; donde el SSF de paso b) comprende una fase de pre-hidrólisis donde el pH de una parte de la biomasa pretratada alcalina obtenida por paso a) se adapta por adición de uno o varios

ácidos hasta entre 2,0 y 8,0 para permitir la conversión de biomasa pretratada alcalina en azúcares fermentables para iniciar la conversión microbiana de biomasa en ácidos orgánicos.

5 [0006] El término "ácido orgánico como un producto de fermentación" es aquí definido como un producto que ha sido obtenido por fermentación por uno o más microorganismos, en el que el producto es una molécula orgánica que comprende al menos un grupo carboxilo. En una forma de realización, el producto de fermentación que se produce por el método de la presente invención es seleccionado del grupo que consiste en, pero no se limita a: ácido láctico, ácido cítrico, ácido itacónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido acético, ácido glutámico, ácido málico, ácido maleico, ácido propiónico, ácido butírico, ácido glucónico y combinaciones de lo mismo. En una forma de realización particularmente preferida, el producto de fermentación es ácido láctico.

10 [0007] Alternativamente o en combinación con formas de realización preferidas precedentes, en otra forma de realización preferida, la biomasa lignocelulósica es seleccionada del grupo que consiste en, pero se no limita a: césped, madera, bagazo, paja, papel, material vegetal (paja, heno, etc.), y combinaciones de lo mismo. En una forma de realización, la biomasa lignocelulósica es paja de trigo, paja de maíz, paja de cebada, paja de arroz, paja de centeno o paja de cualquier planta cultivada.

15 [0008] Alternativamente o en combinación con formas de realización preferidas precedentes, en otra forma de realización, la biomasa lignocelulósica es aire seco, teniendo al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 89.5, 90 o 95% (p/p) de materia seca. En otra forma de realización, la biomasa lignocelulósica no es secada, es decir biomasa fresca puede ser utilizada.

20 [0009] Alternativamente o en combinación con formas de realización preferidas precedentes, en otra forma de realización preferida, la biomasa lignocelulósica sufre una pre-extracción antes del pretratamiento para eliminar componentes solubles no fermentables tales como proteínas, aminoácidos o componentes inorgánicos solubles contenidos en la biomasa que puedan interferir con hidrólisis posterior y fermentación. En otra forma de realización preferida, componentes solubles fermentables se pueden quitar de la biomasa lignocelulósica. El término "pre-extracción" es aquí definido como cualquier tratamiento que elimina componentes solubles de la biomasa lignocelulósica.

25 [0010] Alternativamente o en combinación con formas de realización preferidas precedentes, en otra forma de realización preferida, el pretratamiento de biomasa lignocelulósica es precedido por o se combina y/o se integra con una trituración mecánica de biomasa lignocelulósica. Trituración mecánica se realiza para cambiar la distribución del tamaño de las partículas de la biomasa lignocelulósica de manera que la eficiencia del pretratamiento y procesos posteriores son mejorados, y el agente alcalino es íntegramente mezclado en la biomasa lignocelulósica. En una forma de realización preferida, la trituración mecánica comprende, pero no se limita a: fresado, refinación mecánica y extrusión.

30 Paso a) pretratamiento de biomasa lignocelulósica con un agente alcalino

35 [0011] Pretratamiento de biomasa lignocelulósica se requiere para liberar la matriz lignocelulósica, eliminando o modificando la lignina y aumentando el área de superficie de celulosa. El término "pretratamiento" es aquí definido como cualquier método realizado antes de la hidrólisis procurando aumentar el grado de hidrólisis después de hidrolización de lignocelulosa. Pretratamiento de biomasa lignocelulósica es preferiblemente realizado hasta que al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente al menos aproximadamente 75%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 85% de componentes de carbohidrato en la biomasa pretratada se convierten por una o más enzima(s) hidrolítica(s) en uno o más azúcares monoméricos dentro de un periodo temporal razonable, tal como aproximadamente 24 horas.

40 [0012] En combinación con formas de realización preferidas precedentes, en otra forma de realización preferida, la presente invención se refiere al pretratamiento de biomasa lignocelulósica con un agente alcalino para obtener biomasa lignocelulósica pretratada alcalina con un pH dispuesto entre aproximadamente 8.0 y aproximadamente 14.0, preferiblemente entre aproximadamente pH 8,0 y pH 12,5 o 12,0. Así, una cantidad adecuada de uno o más agentes alcalinos se añaden a la biomasa y son incubados para un periodo de tiempo adecuado y a una temperatura adecuada, como indicado aquí posteriormente. Durante el pretratamiento alcalino de la biomasa lignocelulósica, el pH puede descender aproximadamente 0.5 a aproximadamente 2.0 unidades debido a la liberación de ácidos contenidos en la biomasa lignocelulósica. En una forma de realización preferida, la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina según la invención tiene un valor de pH dispuesto entre aproximadamente 8.5 y aproximadamente 12.5, más preferiblemente dispuesto entre aproximadamente 9.0 y aproximadamente 12.0, dispuesto incluso más preferiblemente entre aproximadamente 9.5 y aproximadamente 12.0, de la forma más preferible un valor de pH de aproximadamente 11.8.

45 [0013] Alternativamente o en combinación con formas de realización preferidas precedentes, en otra forma de realización preferida, el agente alcalino que se usará en la fase a) del método de la presente invención es seleccionado del grupo que consiste en, pero no se limita a: hidróxido cálcico ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), óxido de calcio (CaO), amoníaco (NH_3), hidróxido sódico (NaOH), hidróxido potásico (hidróxido de potasio), urea, o combinaciones de los mismos.

[0014] Alternativamente o en combinación con la forma de realización preferida precedente, en otra forma de realización preferida, la proporción de biomasa lignocelulósica del agente alcalino es dispuesta entre aproximadamente 1:100 y aproximadamente 20:100, más preferiblemente entre aproximadamente 2,5:100 y aproximadamente 17,5:100 y de la forma más preferible entre aproximadamente 5:100 y aproximadamente 15:100. El agente alcalino: proporción de biomasa lignocelulósica se puede seleccionar de tal manera que mejore la degradabilidad enzimática y fermentabilidad de celulosa y hemicelulosa. Alternativamente o en combinación con la forma de realización preferida precedente, en otra forma de realización preferida, el pretratamiento de biomasa lignocelulósica con un agente alcalino se realiza a una temperatura adecuada. La temperatura más adecuada para realizar el paso (a) de la invención es la temperatura resultante de los costes de producción mínimos del producto de fermentación, preferiblemente sin afectar la eficiencia de fermentación, para cualquier tipo seleccionado y concentración de biomasa, las otras condiciones seleccionadas de pretratamiento (p. ej., pH y período de tiempo) y las condiciones seleccionadas para SSF (por ejemplo; microorganismo(s), temperatura, enzima(s)). En una forma de realización preferida la temperatura adecuada es dispuesta entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 115°C, más preferiblemente entre aproximadamente 60°C y aproximadamente 95°C, más preferiblemente entre aproximadamente 70°C y aproximadamente 90°C, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 80°C y aproximadamente 90°C y de la forma más preferible aproximadamente 85°C.

[0015] Alternativamente o en combinación con la forma de realización preferida precedente, en otra forma de realización preferida, el pretratamiento de biomasa lignocelulósica con un agente alcalino se realiza durante un período de tiempo dispuesto entre aproximadamente 2 horas hasta aproximadamente 20 horas, más preferiblemente entre aproximadamente 4 horas y aproximadamente 16 horas, más preferiblemente entre aproximadamente 5 horas y aproximadamente 12 horas, más preferiblemente entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 10 horas, y de la forma más preferible durante un período de tiempo de aproximadamente 8 horas. El período de tiempo más adecuado para realizar el paso (a) de la invención es el período de tiempo, resultante de los costes de producción mínimos del producto de fermentación, preferiblemente sin afectar la eficiencia de fermentación, para cualquier tipo seleccionado y concentración de biomasa, las otras condiciones de pretratamiento seleccionadas (p. ej., pH y temperatura) y las condiciones seleccionadas para SSF (por ejemplo; microorganismo(s), temperatura, enzima(s)).

[0016] Alternativamente o en combinación con la forma de realización preferida precedente, en otra forma de realización preferida, la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina de la invención, está sujeta a uno o varios de los siguientes pasos antes de SSF: un paso de enfriamiento, un paso de lavado y/o un paso de deshidratación. En una forma de realización más preferida, la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina se enfría hasta aproximadamente 80°C, más preferiblemente hasta aproximadamente 70°C, más preferiblemente hasta aproximadamente 60°, más preferiblemente hasta aproximadamente 50°C, más preferiblemente hasta aproximadamente 40°C y de la forma más preferible aproximadamente 30°C. El término "deshidratación" o "drenaje" como se utiliza en este caso se define como eliminación del agua libre de la biomasa. En otra forma de realización preferida, el paso de deshidratación es realizado usando filtración mientras se aplica presión a la biomasa pretratada, donde la presión aplicada es dispuesta entre 0 y aproximadamente 100 bar. Otros métodos de deshidratación serán conocidos por el experto en la materia. En otra forma de realización más preferida, el paso de lavado se realiza para eliminar inhibidores de fermentación tales como ácidos orgánicos (p. ej., ácido acético). En una forma de realización preferida, el paso de lavado se realiza por adición de agua después de la deshidratación seguido de un paso siguiente de deshidratación.

[0017] Alternativamente o en combinación con una forma de realización preferida precedente, en otra forma de realización preferida de la presente invención, la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina del paso (a) se añade a la sacarificación y fermentación simultánea (SSF) proceso de paso (b) descrito abajo, más preferiblemente en una manera lote alimentado, para neutralizar la acidificación que se provoca por la fermentación microbiana en el paso (b). El término "neutralizar" o "neutralización" es aquí definido como adaptando y/o manteniendo el pH de la mezcla SSF a un pH igual a o por debajo de aproximadamente 8.0, tal como adaptando y/o manteniendo el pH a/en un específico pH de aproximadamente 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 u 8.0, dependiendo de pH óptimo de enzima(s) hidrolítica y/o microorganismo(s). Así, en el proceso SSF de paso (b) descrito abajo, biomasa lignocelulósica pretratada alcalina se añade a la mezcla SSF para neutralizar la disminución de pH provocada por la producción del ácido orgánico, manteniendo el pH a un nivel constante. El experto en la técnica sabrá elegir el nivel de pH que será mantenido en la mezcla SSF.

Paso b) sacarificación y fermentación simultánea

[0018] El término "sacarificación y fermentación simultánea" (SSF) es aquí definido como la hidrólisis enzimática simultánea de carbohidratos poliméricos de la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina en sacáridos fermentables y además la conversión de sacáridos en el producto de fermentación por uno o más microorganismo(s).

[0019] La presente invención se refiere a SSF de la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina en un fermentador, por la cual la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina se añade a la mezcla SSF, preferiblemente en una manera lote

alimentado para neutralizar la acidificación que se provoca por la fermentación microbiana en el paso (b).

[0020] Alternativamente o en combinación con una forma de realización preferida precedente, en otra forma de realización preferida de la presente invención, el proceso SSF del paso (b) se acciona en un modo de quimiostato, en el que la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina se usa como un nutriente. Un "modo de quimiostato" es aquí definido como un dispositivo fermentador para mantener los parámetros de fermentación, tal como concentración de nutrientes y pH, esencialmente constante. Alternativamente o en combinación con la forma de realización preferida precedente, en otra forma de realización preferida, la SSF comprende los pasos de: i) opcionalmente una fase de pre-hidrólisis; ii) hidrólisis enzimática con una enzima hidrolítica para obtener sacáridos fermentables; y iii) Fermentación microbiana que usa uno o más microorganismo(s) que es capaz de convertir los sacáridos del paso ii) en el producto de fermentación.

[0021] La SSF comprende una fase de pre-hidrólisis donde una parte de la biomasa pretratada alcalina, de la cual el pH se adapta al nivel deseado por adición de uno o más ácidos, se convierte en azúcares fermentables, proporcionando un entorno adecuado para el microorganismo(s) para iniciar la conversión microbiana de biomasa en ácidos orgánicos.

[0022] Alternativamente o en combinación con la forma de realización preferida precedente, en otra forma de realización preferida, la fase de pre-hidrólisis se realiza durante un periodo suficiente para aumentar la concentración de azúcar fermentable en el reactor hasta un valor de entre 0,5 y 10, más preferiblemente de entre 1 y 5 g/l.

[0023] Alternativamente o en combinación con la forma de realización preferida precedente, en otra forma de realización preferida, la SSF comprende una fase de hidrólisis enzimática con una o más preparaciones enzimáticas hidrolíticas para obtener sacáridos. Los sacáridos que se pueden obtener por hidrólisis enzimática pueden comprender por ejemplo glucosa, manosa, fructosa, lactosa, galactosa, ramnosa, xilosa, arabinosa, ácido galacturónico y sacáridos oligoméricos de (combinaciones de) estos.

[0024] La hidrólisis enzimática de carbohidratos poliméricos según el método de la invención es necesaria para formación de un sustrato que se puede utilizar por el(los) microorganismo(s) en el paso de fermentación. Una enzima hidrolítica para usar en el método de la invención, es decir que se añade en una cantidad adecuada al proceso SSF del paso (b), puede ser, pero no se limita a, el grupo que comprende: preparaciones con celulasa, preparaciones de hemicelulasa, celobiasa, preparaciones de xilanas, amilasa y pectinasa. Tales preparaciones enzimáticas son disponibles comercialmente y pueden por ejemplo ser obtenidas de Genencor International B.V. (Leiden, Países Bajos). Una cantidad adecuada de actividad enzimática hidrolítica para usar en el método de la invención es la cantidad de actividad enzimática hidrolítica, que resulta de los costes de producción mínimos del producto de fermentación mientras retiene actividad enzimática buena u óptima, con el tipo seleccionado y concentración de biomasa, las condiciones seleccionadas de pretratamiento (p. ej., pH, período de tiempo y temperatura) y las condiciones seleccionadas para la SSF (por ejemplo; microorganismo(s) y temperatura). Una cantidad adecuada de actividad enzimática hidrolítica por ejemplo estaría en la variedad de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 50, más preferiblemente aproximadamente 5 a aproximadamente 40 unidades de papel de filtro (FPU), aunque actividades enzimáticas hidrolíticas más altas pueden ser utilizadas. Alternativamente o en combinación con la forma de realización preferida precedente, en otra forma de realización preferida, la hidrólisis enzimática durante la SSF según el método de la invención produce un hidrolizado que comprende concentraciones muy bajas o incluso concentraciones insignificantes de compuestos de inhibición de fermentación. En una forma de realización preferida, las concentraciones de furfural, compuestos fenólicos y 5-HMF que se forman en la SSF son menos que 0.2 g/l. La cantidad de tales compuestos se pueden medir usando métodos estándar, tal como Análisis de HPLC.

[0025] Uno o más microorganismo(s) para usar en el método de la invención, es decir que se añaden a la mezcla SSF del paso (b) anterior antes y/o durante la SSF, puede ser una bacteria, un hongo (incluyendo una levadura), una arquea o un alga. En una forma de realización preferida, la bacteria es seleccionada de una cepa de *Bacillus* termotolerante. En otra forma de realización preferida, el microorganismo es seleccionado del grupo consistiendo en, pero no limitado a: *Acetobacter acetii*, *A. hansenii*, *A. liquefaciens*, *A. mesoxidans*, *A. pasteurianus*, *A. suboxydans*, *A. xilinum*, *Achromobacter agile*, *A. lactium*, *Acinetobacter baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. genospecies*, *A. genospecies*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *Acinetobacter sp.*, *Actinomyces sp.*, *Actinoplanes missouriensis*, *Aerobacter aerogenes*, *A. cloacae*, *Aeromonas culicicola*, *A. formicans*, *Aeromonas, sp.*, *Agrobacterium radiobacter*, *A. rhizogenes*, *A. tumefaciens*, *Alcaligenes faecalis*, *Alcaligenes sp.*, *A. tolerans*, *A. viscolactis*, *Amylolatopsis mediterranei*, *Anabaena ambigua*, *A. subcylindria*, *Aquaspirillum intersonii*, *Arthroascus javanensis*, *Arthrobacter albidus*, *A. citreus*, *A. luteus*, *A. nicotinae*, *A. polychromogenes*, *A. simplex*, *Arthrobacter sp.*, *A. ureafaecalis*, *A. viscosus*, *Azomonas macrocytogenes*, *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*, *Azotobacter chroococcum*, *A. agilis*, *A. chroococcum*, *A. macrocytogenes*, *Azotobacter sp.*, *A. vinelandii*, *Azotomonas insolita*, *Bacillus aminovorans*, *B. amyloliquefaciens*, *B. aneurinolyticus*, *B. aporrhoeus*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. cereus subsp. mycoides*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. freudenreichii*, *B. globigii*, *B. laevolacticus*, *B. laterosporus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. macquariensis*, *B. marcescens*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. pantothenicus*, *B. pasteurii*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. racemilacticus*, *Bacillus sp.*, *B. sphaericus*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. zoppii*, *B. subtilis*, *Beijerinckia indica*, *B. lactiogenes*, *Bordetella bronchiseptica*, *Brettanomyces intermedius*, *Brevibacterium*

ammoniagene, *B. diverticatum*, *B. immariophilum*, *B. imperiale*, *B. linens*, *B. liquifaciens*, *B. luteum*, *B. roseum*, *B. saccharoliticum*, *B. vitarumen*, *Candida albicans*, *C. bombii*, *C. brumptii*, *C. catenulata*, *C. colliculosa*, *C. deformans*, *C. epicola*, *C. etchellsii*, *C. famata*, *C. freyschussii*, *C. glabrata*, *C. gropengiesseri*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lambica*, *C. lusitaniae*, *C. magnoliae*, *C. mannitofaciens*, *C. melibiosica*, *C. mucifera*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. rugosa*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *C. versatilis*, *C. wickerhamii*, *C. sake*, *C. shehatae* *Candida* Sp., *C. stellata*, *Cellulomonas bibula*, *C. bizotea*, *C. cartae*, *C. fimi*, *C. flavigena*, *C. gelida*, *C. uda*, *Chainia*, sp. *Chlorella pyrenoidosa*, *Chromatium* sp., *Citeromyces matritensis*, *Citrobacter freundii*, *C. acetobutylicum*, *C. felsineum*, *C. pasteurianum*, *C. perfringens*, *C. roseum*, *C. sporogenes*, *C. tetanomorphum*, *Corynebacterium rubrum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium* sp. *Cryptococcus laurentii*, *C. leteolus*, *C. neoformans*, *C. neoformans*, *Cryptococcus*, sp., *Cytophaga hutchinsonii*, *Debariomices castellii*, *D. fibuligera*, *D. hansenii*, *D. marama*, *D. poyimorphus*, *D. vanriji*, *Dekerra anomala*, *D. clausenii*, *D. bruxellensis*, *D. intermedia*, *D. naardensis*, *Desulfotomaculum nigrificans*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Enterobacter aerogenes*, *E. clocae*, *Erwinia cherysanthemi*, *Escherichia coli*, *E. intermedia*, *E. irregular*, *Euglena gracilis*, *Filobasidium capsuligenum*, *F. uniguttulatum*, *Flavobacterium dehydrogenans*, *F. devorans*, *F. odoratum*, *Flavobacterium* sp., *Geotrichum*, sp. *Gluconobacter melanogenes*, *G. melanogenus*, *G. oxydans*, *G. roseus*, *Guilliermondella selenospora*, *Hafnia alvei*, *Halobacterium cutirubrum*, *H. halobium*, *H. salinarium*, *H. trapinium*, *Haneseniaspora vineae*, *Hansenula beckii*, *H. beijerinckii*, *H. canadensis*, *H. capsulata*, *H. ciferrii*, *H. polymorpha*, *H. valbiensis*, *Hormoascus ambrosiae*, *Issatchenkia orientalis*, *Janthinobacter lividum*, *jensinia canicruria*, *Klebsiella aerogenes*, *K. pneumoniae*, *K. terrigena*, *Klockera corticis*, *K. javancia*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyvera citrophila*, *K. lodderi*, *K. marxianus*, *K. marxianus* var. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. casei* var. *rhamnosus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. jugurti*, *L. lactis*, *L. leichmannii*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *Lactobacillus* sp., *L. sporogenes*, *L. viridescens*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. oenos*, *Leuconostoc* sp., *Leucosporidium frigidum*, *Lineola longa*, *Lipomyces lipofera*, *L. starkeyi*, *Metschnikowia pulcherrima*, *M reukaufii*, *Micrococcus* sp. *Micrococo flavus*, *M glutamicus*, *M luteus*, *Microcycclus aquaticus*, *M flavus*, *Morexella* it, sp. *Mycobacterium phlei*, *M smegmatis*, *Mycobacterium* sp., *Micoplana bullata*, *M dimorpha*, *Microciclus aquaticus*, *Nadsonia elongata*, *Nematospora coryli*, *Nitrobacter*, sp. *Nitrosomona*, sp. *Nocardia asteroides*, *N. calcaria*, *N. cellulans*, *N. hydrocarbonoxydans*, *N. mediterranei*, *N. rugosa* *Nocardia* sp., *Nocardiopsis dassonvillei*, *Nostoc elipsosporum*, *N. entrophytum*, *N. muscorum*, *N. punctiforme*, *Oerskovia xantineolytica*, *Oosporidium margaritifera*, *Pachysolen tannophilus*, *Pachytichospora transvaalensis*, *Pediococcus acidilactici*, *P. cerevisiae*, *P. pentosaceus*, *Pichia anomala*, *P. carsonii*, *P. farinosa*, *P. fermentans*, *P. fluxuum*, *P. guilliermondii*, *P. haplophila*, *P. ohmeri*, *P. pastoris*, *P. pijperi*, *P. rhodanensis*, *P. toletana*, *P. trihalophila*, *P. stipitidis*, *Propionibacterium freudenreichii*, *P. shermanii*, *P. toenii*, *P. zeae*, *Protaminobacter alboblavus*, *Proteus mirabilis*, *P. morgani*, *P. morgani*, *P. vulgaris*, *Prototheca moriformis*, *Providencia stuartii*, *pseudomonas aeruginosa*, *P. acidovorans*, *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *P. auruginosa*, *P. azotogensis*, *P. cariophylli*, *P. cepacia*, *P. convexa*, *P. cruciviae*, *P. denitrificans*, *P. desmolytica*, *P. desmolyticum*, *P. diminuta*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. glutaris*, *P. hydrophila*, *P. lemonnierii*, *P. maltophilia*, *P. mildenbergi*, *P. oleovorans*, *P. ovalis*, *P. pictorum*, *P. pisi*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. pseudoflava*, *P. putida*, *P. reptilivora*, *P. resinivorans*, *P. solanacerum*, *Pseudomonas* sp., *P. stutzeri*, *P. syringae*, *P. testosteronei*, *P. viridiflava*, *Rhizobium indigofera*, *R. japonicum*, *R. leguminosarum*, *R. lupini*, *R. meliloti*, *R. phaseoli*, *Rhizobium* sp, *R. trifoli*, *Rhodococcus* sp., *R. terrae*, *Rhodospiridium torrelloides*, *Rhodotorula aurantiaca*, *R. glutinis*, *R. graminis*, *R. marina*, *R. minuta*, *R. rubra*, *Rhodotorula*, sp. *Saccharomyces capsularies*, *S. cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Saccharomicopsis fibuligera*, *Salmonella abony*, *S. typhimurium*, *Sarcina lutea*, *Sarcina* sp., *S. subflava*, *Scenedesmus abundans*, *Schizosaccharomyces octosporus*, *S. pombe*, *S. slooffii*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Serratia marcescens*, *S. marinorubra*, *S. plymuthia*, *Spirulina* sp. *Sporobolomyces holsaticus*, *S. roseus*, *S. salmonicolor*, *Sreptomycetes diastaticus*, *S. olivaceus*, *S. rimosus*, *Sreptomycetes* sp., *S. venezuelae*, *Staphylococcus afermentans*, *S. albus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *S. cremoris*, *S. diacetylactis*, *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. lactis*, *S. pyogenes*, *S. salivaris*, *Streptococcus* sp., *S. thermophilus*, *S. zymogenes*, *S. peuceticus*, *S. albogriseolus*, *S. albus*, *S. antibioticus*, *S. atrofaciens*, *S. aureofaciens*, *S. caelastis*, *S. diastaticus*, *S. erythraeus*, *S. fluorescens*, *S. fradiae*, *S. griseoflavus*, *S. griseus*, *S. hawaiiensis*, *S. hygrosopicus*, *S. kanamyceticus*, *S. lavendulae*, *S. lividans*, *S. nataliensis*, *S. nitrosporeus*, *S. niveus*, *S. noursei*, *S. olivaceus*, *S. olivaceus*, *S. phacochromogenes*, *S.*, *pseudogriseolus*, *Streptomycetes* sp., *S. termonitrificans*, *S. venezualae*, *S. vinaceus*, *S. viridefaciens*, *Streptosporangium*, sp. *Streptoverticillium cinnamoneum*, *S. mobaraense*, *Streptoverticillium* sp., *Thermospora* sp., *Thiobacillus acidophilus*, *T. ferrooxidans*, *T. novellus*, *T. thiooxidans*, *Torulaspora delbrueckii*, *Torulopsis ethanolitolerans*, *T. glabrata*, *Torulopsis* sp., *Tremella mesenterica*, *Trichosporon beigellii*, *T. capitatum*, *T. pullulans*, *Trichosporon* sp, *Trigonopsis variabilis*, *Williopsis californica*, *W. saturnus*, *Xanthomonas campestris*, *X malvacearum*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomices bisporus*, *Z. rouxii*, *Z. bisporus*, *Z. priorionus*, *Zygosporium aromyces*, *Z. priorionus*, *Zymomonas anaerobia*, *Z. mobilis*, *Absidia coyimbifera*, *Acremonium chrysogenum*, *Actinomucor* sp., *Agaricus bitorquis*, *Alternaria alternata*, *A. brassicicola*, *Alternaria* sp., *A. terreus*, *Arthrobotrys conoides*, *A. oligospora*, *A. gossipii*, *Aspergillus awamori*, *A. candidus*, *A. clavatus*, *A. fischeri*, *A. flavipes*, *A. flavus*, *A. foetidus*, *A. funiculosus*, *A. luchuensis*, *A. nidulans*, *A. Noger*, *A. oryzae*, *A. oryzae* var. *viridis*, *A. proliferans*, *A. sojae* *Aspergillus* sp, *A. terreus*, *A. terreus* var. *aureus*, *A. ustus*, *A. versicolor*, *A. wentii*, *Aureobasidium mausonii*, *A. pullulans* *Auricularia poyitricha*, *Basidiobolus haptosporus*, *Beauveria bassiana*, *Benjaminella multisporea*, *B. poitrasii*, *Botryodiplodia theobromae*, *Botryotrichum piluliferum*, *Botrytis allii*, *Cephalophora irregularis*, *Cephalosporium* sp., *Chaetomella raphigera*, *Chaetomium*, *globosum*, *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium* sp., *Claviceps paspali*, *C. purpurea*, *Cokeromyces recurvatus*, *Coriolus versicolor*, *Cunninghamella blakesleeana*, *C. echinulata*, *C. elegans*, *C. sp.*, *Curvularia brachyspora*, *C. cymbopogonis*, *C. fallax*, *C. lunata*, *Daedalea flavida*, *Datronia mollis*, *Dipodascus uninucleatus*,

5 *Flammulina velutipes*, *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *Fusarium sp.*, *F. tricinctum*, *Ganoderma lucidum*,
Georchium candidum, *Gibberella fujikuroi*, *G. saubinetti*, *Gliocladium roseum*, *Gongronella butleri*, *Helminthosporium*, *sp.*
Humicola grisea, *Hymenochaete rubigonosa*, *Laetiporus sulphureus*, *Lenzites striata*, *Lepiota rhacodes*, *Monilinia fructicola*,
Mucor hiemalis, *M. plumbeus*, *Mucor sp.*, *Mycotypha africana*, *M. microspora*, *Myrothecium roridum*, *M. verrucaria*,
10 *Neurospora crassa*, *N. sitophila*, *Paecilomyces sp.*, *P. varioti*, *Pencillium ochrocloron*, *Pencillium sp.*, *P. argillaceum*, *P.*
asperosporum, *P. chrisogenum*, *P. citrinum*, *P. frequentans*, *P. funiculosum*, *P. janthinellum*, *P. lignorum*, *P. notatum*, *P.*
ochrocloron, *P. pinophilum*, *P. purpurogenum*, *P. roqueforti*, *P. variable*, *Phaenerochaete chrysosporium*, *Phialofora bubakii*,
P. calciformis, *P. fastigiata*, *P. lagerbergii*, *P. richardsiae*, *Phialophora sp.*, *Phoma exigua*, *Phycomyces blakesleeanus*,
Pleurotus flabellatus, *P. Florida*, *P. floridanus*, *P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *Polyporus meliae*, *Poria placenta*, *Ptychogaster*
15 *sp.*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *P. sanguineus*, *Rhizopus oryzae*, *R., stolonifer Saccharomyces cerevisiae*, *Sclerotium rolfsii*,
Scopulariopsis brevicaulis, *Sporothecium sp.*, *Sporotrichum sp.*, *Stachybotrys chartarum*, *Stemphylum sarcinaeforme*,
Stemphylium sp., *Tolypocladium inflatum*, *Trametes cubensis*, *T. hirsuta*, *T. lactinea*, *T. serialis*, *T. versicolor*, *T. inaequalis*,
T. harzianum, *T. reesei*, *Trichoderma sp.*, *T., viride Trichosporon*, *Trichothecium. roseum*, *Ustilago maydis*, *Volvariella*
diplosia, *Volvariella sp.* y *V. volvacea*. La mayoría de los microorganismos preferidos para usar en el método de la invención
20 son *Acetobacter species*, *Bacillus coagulans*, *B. racemilacticus*, *B. laevolacticus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia*
coli, *Gluconobacter species*, *Pseudomonas species*, bacterias del ácido láctico, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* y
Saccharomyces cerevisiae. Una densidad de inóculo adecuado de microorganismo(s) para usar en el método de la
25 invención es la densidad de microorganismo(s), que resulta de los costes de producción mínimos del producto de
fermentación mientras proporciona buen crecimiento, capacidades metabólicas y de fermentación, con el tipo seleccionado y
concentración de biomasa, las condiciones seleccionadas de pretratamiento (p. ej., pH, período de tiempo y temperatura) y
las condiciones seleccionadas para SSF (por ejemplo; enzima(s) y temperatura). En un forma de realización preferida la
30 densidad de microorganismo(s) es desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 50, más preferiblemente desde
aproximadamente 2 a aproximadamente 20, aún más preferiblemente desde aproximadamente 5 a aproximadamente 10 g
de microorganismo(s)/kg de biomasa lignocelulósica pretratada.

25 [0026] Alternativamente o en combinación con una forma de realización preferida precedente, en otra forma de realización
preferida, la concentración de sólidos totales en la variedad SSF oscila desde aproximadamente 5% a aproximadamente
50%, tal como desde aproximadamente 5% a aproximadamente 40%, 30% o 25%, de la forma más preferible desde
aproximadamente 40% a aproximadamente 50%.

30 [0027] La temperatura óptima para realizar SSF, depende de la temperatura óptima del microorganismo(s) y/o de la enzima
o mezclas enzimáticas. El experto en la técnica sabrá determinar la temperatura óptima para realizar SSF. La temperatura
óptima para ser usada en combinación con uno o más microorganismo(s) y/o enzima(s) se puede establecer por análisis de
la actividad del microorganismo(s) y/o enzima(s) bajo condiciones de temperatura diferentes usando métodos conocidos. En
35 una forma de realización preferida, la temperatura durante la SSF está en el rango desde aproximadamente 20 a
aproximadamente 80°C, más preferiblemente en el rango desde aproximadamente 25 a aproximadamente 60°C, y de la
forma más preferible en el rango desde aproximadamente 30 a aproximadamente 50°C.

40 [0028] Alternativamente o en combinación con forma de realización preferida precedente, en otra forma de realización
preferida, el pH durante la SSF se ajusta y/o se mantiene entre aproximadamente 2.0 y 10.0, más preferiblemente entre
aproximadamente 4.0 y 8.0, más preferiblemente entre aproximadamente 5.0 y 7.0 y de la forma más preferible el pH
durante la SSF se ajusta y/o se mantiene para estar en aproximadamente 6.0. El pH se puede controlar por (p. ej.
45 automático) adición de biomasa pretratada alcalina y opcionalmente álcali en forma de una solución o suspensión, por
ejemplo mediante una bomba o alimentador cuya salida se fija por un controlador (ordenador) basándose en el valor de pH
deseado y el valor de pH como determinado por un electrodo de pH estándar.

[0029] Alternativamente o en combinación con forma de realización preferida precedente, en otra forma de realización
preferida el pH durante SSF se puede controlar por adición de la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina, sin la
50 necesidad de una fuente adicional de álcali y sin fluctuaciones grandes en pH. En otra forma de realización preferida, el pH
durante la SSF se puede controlar por adición de la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina y un agente alcalino.

[0030] En una forma de realización preferida, la SSF puede comprender una fase de pre-hidrólisis, una fase lote alimentado
con control de pH por adición de biomasa lignocelulósica pretratada alcalina y una fase de lote con control de pH por adición
55 de un álcali. En una forma de realización preferida, la fase lote alimentado es acompañada y/o seguida de una fase de lote
en la que el álcali se añade para neutralizar la reducción de pH provocada por la producción del ácido orgánico,
manteniendo el pH a un nivel constante. En una forma de realización preferida, el álcali es seleccionado del grupo que
consiste en, pero no se limita a: hidróxido cálcico (Ca(OH)₂), óxido de calcio (CaO), amoníaco (NH₃), hidróxido sódico
(NaOH), hidróxido potásico (hidróxido de potasio), carbonato de sodio, urea y combinaciones de los mismos.

60 [0031] Alternativamente o en combinación con una forma de realización preferida precedente, en otra forma de realización
preferida, el producto de fermentación se produce en una cantidad de al menos 50%, más preferiblemente al menos 70%,

incluso más preferiblemente al menos 90%, incluso más preferiblemente al menos 95%, incluso más preferiblemente al menos 98%, de la forma más preferible 100% del máximo teórico. El máximo teórico se puede calcular según la siguiente ecuación:

$$5 \quad LA_{theor\ max} = DM * F * HF * FF$$

donde

DM = sustancia seca total de biomasa lignocelulósica pretratada alcalina (g);

10 F = fracción de polisacáridos (g) por gramo de biomasa lignocelulósica pretratada alcalina;

HF = factor de hidrólisis para convertir el peso molecular de los polisacáridos en los monosacáridos resultantes;

FF = factor de fermentación de 1.00 g de producto de fermentación por g de monosacáridos.

15 Paso c) recuperación

[0032] El término "recuperación" es aquí definido como cualquier método o combinación de métodos en el que el producto de fermentación de la invención se obtiene de la mezcla SSF del paso (b) de manera más pura y/o más concentrada, por ejemplo para obtener el producto de fermentación con una concentración inferior de otros componentes o un número inferior de otros componentes en comparación con la mezcla SSF del paso (b).

20 [0033] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un reactor que comprende un contenedor para el pretratamiento alcalino de biomasa lignocelulósica opcionalmente o temporalmente enlazado a un fermentador para la sacarificación y fermentación simultánea (SSF) de la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina, donde el reactor es para el uso en el método de la presente invención, y donde:

25 1) el contenedor comprende:

I) un dispositivo de mezcla;

II) un dispositivo de calefacción; y

III) opcionalmente, medio para pre-extracción de componentes solubles de la biomasa lignocelulósica;

30 2) el fermentador comprende:

I) control de pH automático; y

II) una entrada para biomasa lignocelulósica pretratada alcalina obtenible por reivindicación 1 paso a) del contenedor, que se controla por el control de pH automático.

35 [0034] En una forma de realización preferida, el dispositivo de mezcla es capaz de mezclar un agente alcalino en la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina.

40 [0035] En otra forma de realización preferida, el dispositivo de calefacción es capaz de calentar la mezcla de un agente alcalino y la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina a la temperatura de proceso requerida. En una forma de realización preferida, la mezcla se calienta por calefacción eléctrica o por vapor.

45 [0036] En una forma de realización preferida, el dispositivo de conexión o medio de conexión entre el contenedor y el fermentador es una bomba, preferiblemente un alimentador roscado para permitir alimentación automática de la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina en el fermentador. El dispositivo de conexión o medio de conexión no tiene que estar presente necesariamente, o no necesita estar físicamente enlazado, durante la fase de pretratamiento, pero es preferiblemente establecido, unido o añadido al menos antes de y/o durante la fase SSF. El dispositivo de conexión o medio de conexión puede así estar temporal u opcionalmente presente. En una forma de realización diferente el dispositivo de conexión o medio de conexión entre el contenedor y el fermentador está presente permanentemente .

50 [0037] En una forma de realización preferida, el álcali se puede seleccionar del álcali que se describió anteriormente.

[0038] En otra forma de realización preferida, el fermentador comprende uno o más de lo siguiente: una entrada para alimentación automática de un álcali, que se controla por el control de pH automático; una entrada para una o más enzima(s) o mezcla(s) enzimática, para uno o más microorganismo(s) y/o un ácido o base, por ejemplo ácido sulfúrico o $Ca(OH)_2$, más preferiblemente ácido sulfúrico 3M o 20% p/v $Ca(OH)_2$; una salida para muestreo y/o monitor; regulación de la temperatura automática; y/o un ensamblaje de agitador.

60 [0039] En otro aspecto, la invención se refiere al uso del reactor de la invención como se ha descrito anteriormente, para la producción de un ácido orgánico de biomasa lignocelulósica según el método de la invención.

[0040] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que están incluidos los elementos después de la palabra, pero los elementos no específicamente mencionados no son excluidos. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "uno" o "una" no excluye la posibilidad que más de uno de los elementos esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y sólo uno de los elementos. El artículo indefinido "uno" o "una" así normalmente significa "al menos uno".

Descripción de las figuras

[0041]

Figura 1. Representación esquemática de la sacarificación y fermentación simultánea de paja de trigo tratada con cal (por sus siglas en inglés, LTWS) a ácido láctico.

Figura 2. Control de pH (A) durante la sacarificación y fermentación simultánea de paja de trigo tratada con cal por preparación enzimática comercial GC 220 y *Bacillus coagulans* DSM 2314 (B). Las áreas entre las líneas punteadas representan la fase de pre-hidrólisis (I), la fase lote alimentado (II) con control de pH por adición de LTWS alcalino y enzimas, y la fase de dosificación (III) con control de pH por adición de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en suspensión. Preparación enzimática Extra GC220 fue añadida en los tiempos indicados por las flechas.

Figura 3. Perfiles de glucosa (\square), xilosa (\diamond), arabinosa (\triangle) (A) y ácido láctico (\blacklozenge) (B) en la sacarificación y fermentación simultánea de paja de trigo tratada con cal por preparación enzimática comercial GC 220 y *Bacillus coagulans* DSM 2314. Las áreas entre las líneas punteadas representan la fase de pre-hidrólisis (I), la fase lote alimentado (II) y la fase de dosificación (III). Preparación enzimática Extra GC220 fue añadida en los tiempos indicados por las flechas.

Figura 4. Fracción Insoluble (\square) y fracción soluble hidrolizada (\blacksquare) (g) (calculada por la diferencia entre cantidades iniciales y cantidades insolubles analizadas) del glucano polisacárido (A), xilano (B) y arabinano (C) en varios puntos temporales durante la sacarificación y fermentación simultánea de paja de trigo tratada con cal. Figura representa también el porcentaje de polisacárido hidrolizado en productos solubles (\blacktriangle). Las barras de error indican la desviación de análisis por duplicado.

Ejemplos

Ejemplo 1. Materia prima y pretratamiento

[0042] La paja de trigo fue seleccionada como materia prima demodelo de lignocelulosa y fue comprada en una granja en el nordeste de Países Bajos. La paja de trigo era aire seco (89.5% (p/p) sustancia seca) y tierra a través de un filtro 2-mm. El pretratamiento de cal fue realizado rellenando dos mezcladores 15 1 (Terlet, Países Bajos), ambos con 1650 g paja de trigo de tierra, 13 kg agua del grifo y 165 g hidróxido cálcico. Esta suspensión de paja de trigo fue calentada y mantenida a 85°C durante 16 horas bajo continua agitación a 30 r.p.m. La suspensión de paja de trigo tratada con cal (LTWS) fue posteriormente enfriada a 30°C, deshidratada colocando el LTWS en una bolsa de algodón, y presionando la suspensión que usa un pistón de presión manual a presión hasta 9.7 kg/m². Después de la deshidratación, una cantidad de 11.45 kg LTWS con un contenido medio de sustancia en seco de 27.0% (p/p) y pH 11.8 se obtuvo y sirvió como sustrato para experimentos sucesivos. La composición química de LTWS fue determinada como se describe por Van den Oever et al. (Van den Oever et al. (2003) J. Mater. Sci. 38:3697-3707).

Ejemplo 2. Preparación enzimática

[0043] La preparación enzimática GC 220 (Genencor-Danisco, Rochester, EEUU) que contiene celulasa, celobiasa y actividad de xilanasas de 116,215 y 677 U/ml, respectivamente, (Kabel et al. (2006) biotechnol. Bioeng. 93(1):56-63) y fue usada para este estudio. La preparación tenía una densidad relativa de 1.2 g/ml y contenía 4.5 mg/ml glucosa, 2.9 mg/ml manosa y 0.8 mg/ml galactosa.

Ejemplo 3. Microorganismo y pre-cultivo

[0044] La bacteria cepa de *Bacillus coagulans* DSM 2314 (disponible al DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Alemania) fue usada como microorganismo productor de ácido láctico. Células bacterianas fueron mantenidas en un 10% (p/p) solución madre de glicerol y almacenadas a -80°C. Productos químicos, a menos que se indique de otra manera, fueron comprados en Merck (Darmstadt, Alemania). Placas de gelrite fueron preparadas con medio que contenía (por litro) glucosa, 10 g; Gelrite, 20 g (Duchefa, Haarlem, Países Bajos); extracto de levadura, 10 g (Duchefa); $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.5 g; BIS-TRIS, 10 g (USB, Ohio, USA); $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g. Glucosa y Gelrite fueron disueltos en solución madre A (4 veces concentrada). El pH de esta solución madre fue ajustada a 6.4 con ácido clorhídrico 2M y sometida a autoclave durante 15 min a 125°C. Los nutrientes

restantes fueron disueltos en solución madre B (1.33 veces concentrado) que fue también ajustada a pH 6.4 con ácido clorhídrico 2M pero fue esterilizado por filtro (filtro de acetato de celulosa con tamaño de los poros de 0.2 μm , Minisart, Sartorius). Después de la esterilización, el medio fue preparado combinando solución madre A y B y fueron vertidas Placas de gelrite. Las bacterias fueron cultivadas en las Placas de gelrite durante 48 h a 50°C.

5 Una colonia aislada fue usada para inocular un caldo de 100 ml con composición similar y preparación como se ha descrito anteriormente, no obstante sin la adición de Gelrite. El cultivo fue incubado estáticamente durante 24 h a 50°C y funcionaba como inóculo para un caldo de 1400 ml. Este cultivo fue incubado también estáticamente durante 12 h a 50°C y sirvió como un 10% (v/v) pre-cultivo para los experimentos SSF.

10 Ejemplo 4. Sacarificación y fermentación simultánea

[0045] La SSF de LTWS se efectuó en un fermentador de 20L (Applikon, Schiedam, Países Bajos) con pH y regulación de la temperatura (biocontrolador ADI 1020). Al principio de SSF, el fermentador se llenó de 6.0 kg agua del grifo y 1400 g de LTWS deshidratado (DM contenido de 27.0% (p/p)). Los siguientes nutrientes fueron luego añadidos a la suspensión de LTWS: extracto de levadura, 150 g (Duchefa); $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$, 30 g; $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 52.5 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g. La suspensión de LTWS fue luego calentada a 50°C y el pH fue ajustado a 6.0 con 101 g ácido sulfúrico 3M (- 30 g H_2SO_4). El proceso SSF de LTWS a ácido láctico consistía en tres fases; I) la fase de pre-hidrólisis de LTWS pre-cargado, II) la fase lote alimentado con alimentación automática de LTWS desde un alimentador roscado y III) la fase de dosificación con control de pH por una suspensión de hidróxido cálcico y sin alimentación LTWS. Una representación esquemática de la disposición experimental se muestra en Figura 1. La pre-hidrólisis fue iniciada por adición de 40 ml de preparación enzimática (88 mg enzima/g DM sustrato) a la suspensión de LTWS y fue incubada durante dos horas a 50°C bajo continua agitación a 250 r.p.m. La fase lote alimentado fue iniciada por adición de 1500 ml de pre-cultivo de *B. coagulans* DSM 2314 al fermentador. El ácido láctico producido por las bacterias fue neutralizado por la adición automática de 8623 g LTWS deshidratado (DM de 27.0%) al fermentador a través de un alimentador (K-Tron Soder Feeders, Canadá) y fue regulado por el pH del medio que fue establecido en 6.0. En toda la fase de lote alimentado, una cantidad de 280 ml de preparación enzimática (carga de enzima total de 98 mg/g DM sustrato) fue añadida de manera proporcional al nivel de adición de LTWS en el fermentador. Durante la fase de dosificación, el pH fue controlado a 6.0 por la adición de 20.0% (p/v) suspensión de hidróxido cálcico. Las muestras fueron retiradas para sustancia seca, sustrato y análisis del (sub)-producto.

30 Ejemplo 5. Métodos analíticos

[0046] Para el análisis de azúcares monoméricos, las muestras de caldo de fermentación fueron centrifugadas (3 min a 17400xg), el pH del sobrenadante fue ajustados a 5.0 con carbonato de bario que usa un indicador de pH (Azul de bromofenol) seguido de filtración del líquido. El análisis fue realizado por cromatografía de cambio aniónico de alto rendimiento usando una columna Carbopack PA1 (temperatura de columna de 30°C) y un detector amperométrico pulsado (ED50) (Dionex, Sunnyvale, CA). Antes de la inyección, el sistema fue equilibrado con 25.5 mM NaOH durante 10 min a una velocidad de flujo de 1.0 ml/min. Para la separación de azúcares monoméricos, en la inyección la fase móvil fue desplazada a agua desionizada durante 30 min. La adición de post-columna de hidróxido sódico fue usada para detección de los azúcares monoméricos neutros.

[0047] La determinación de azúcares oligoméricos solubles fue realizada por centrifugado durante 5 minutos a 3000 r.p.m. (Centaur 2, Beun de Ronde, Países Bajos) de muestras prepesadas y liofilización del sobrenadante durante toda la noche. Los gránulos fueron pesados, hidrolizados con ácido sulfúrico y azúcares monoméricos neutros fueron determinados según el método como se describe por Van den Oever et al. (Van den Oever et al. (2003) J. Mater. Sci. 38:3697-3707). Para los cálculos, un peso molecular medio de oligómeros de glucano y xilano de 166 y 132 g/mol, respectivamente, fueron aplicados, dando como resultado un factor de hidrólisis de 1.08 y 1.14, respectivamente.

[0048] Para el análisis de azúcares poliméricos insolubles, muestras de 25 gramos fueron centrifugadas durante 5 min a 3000 r.p.m. (Centaur 2, Beun de Ronde, Países Bajos), el sobrenadante fue quitado y el granulado fue lavado por resuspensión en 25 ml de agua fresca desmineralizado seguido por un paso de centrifugado de 5 minutos a 3000 r.p.m. (Centaur 2, Beun de Ronde, Países Bajos). La secuencia de resuspensión y centrifugado fue repetida tres veces. Después de la última eliminación del sobrenadante, los gránulos fueron liofilizados durante toda la noche. Los gránulos fueron pesados (valores usados para el cálculo de sustancia seca (DM)), material polimérico hidrolizado con ácido sulfúrico y azúcares neutros analizados según el método como se describe por Van den Oever et al. (Van den Oever et al. (2003) J. Mater. Sci. 38:3697-3707). Para los cálculos, un peso molecular de glucano y xilano de 162 y 132 g/mol, respectivamente, fueron aplicados y dando como resultado un factor de hidrólisis de polímero para monómero de 1.11 y 1.14, respectivamente.

[0049] El análisis de ácidos orgánicos fue realizado por cromatografía en fase líquida de alta presión según el procedimiento descrito por Maas et al. (Maas et al. (2006) Appl. Microbiol. Biotechnol. 72:861-868).

[0050] La pureza quiral (%) de ácido láctico fue determinada por derivatización de todos los lactatos usando metanol, después de lo cual ambos enantiómeros de metil lactato fueron separados en una columna quiral de cromatografía de gases y detectados usando un detector de ionización de llama. La pureza quiral fue expresada como el área del enantiómero principal dividida por la suma de áreas de ambos enantiómeros.

5

Ejemplo 6. Cálculos

[0051] La producción de ácido láctico de máximo teórico ($LA_{teor\ max}$. (g)) fue calculada según la siguiente ecuación [Eq. 1].

10

$$LA_{teor\ max} = DM_{sustrato} * F_{polisac} * HF_{monosac / polisac} * FF \quad [Eq. 1]$$

[0052] Donde $DM_{sustrato}$ = la sustancia seca total de sustrato LTWS (g); $F_{polisac}$ = polisacáridos de fracción por sustrato (g/g); $HF_{monosac/polisac}$ = Factor de hidrólisis de polisacáridos, incorporación de agua produce 1,11 g hexosa a partir de 1,00 g glucano y 1,14 g de pentosa de xilano y arabinano (g/g) y FF = Factor de fermentación de 1,00 g ácido láctico por g de azúcar monomérico.

15

[0053] La eficiencia de la hidrólisis enzimática (%; p/p) se basada en la cantidad de polisacáridos hidrolizados (g) (calculada por la diferencia entre cantidades iniciales y cantidades insolubles analizadas) dividida por la cantidad de polisacáridos (g) inicialmente presentes en el sustrato. La eficiencia de fermentación (%; p/p) se expresa como la cantidad de ácido láctico producida (g) dividida por la cantidad de azúcares monoméricos consumida (g) por las bacterias. La eficiencia total del SSF (%; p/p) fue calculada por la cantidad de ácido láctico producida (g) dividida por la cantidad de máximo teórico de ácido láctico (g) determinado como se describe en Eq. 1.

20

Ejemplo 7. Sacarificación y fermentación simultánea de LTWS a ácido láctico

25

[0054] La composición polisacárida de la paja de trigo tratada con cal (LTWS) consistía principalmente de glucano, xilano y arabinano de 33,0, 19,0 y 2,0% (p/p), respectivamente, mientras que la masa restante consistía en lignina, ceniza, extractivos y ácidos urónicos. Algunos de los componentes solubles en la paja de trigo fueron parcialmente quitados por la separación sólido/líquido (deshidratación) del LTWS. El foco de este estudio estaba en la conversión de glucano, xilano y arabinano que son los polisacáridos predominantes presentes en LTWS y contabilizados en el 99.8% (p/p) de los azúcares poliméricos totales. El trabajo precedente mostraba que la preparación con celulasa GC 220, usada para la sacarificación de polisacáridos, funcionaba óptimamente a 50°C y pH 5.0 (manuscrito en propuesta), mientras que condiciones de crecimiento para *Bacillus coagulans* DSM 2314 fueron 54°C y pH 6.5 (WO 2004/063382). En este estudio, la hidrólisis enzimática y la fermentación ocurrida simultáneamente en el mismo reactor en condiciones comprometedoras que fueron establecidas a 50°C y pH 6.0.

30

35

[0055] La SSF de LTWS a ácido láctico fue estudiada en un fermentador agitado controlado de 20L. Resultados previos mostraban que cuando este proceso se realizaba sin una pre-hidrólisis de una cantidad inicial de LTWS, la concentración de azúcares monoméricos era baja y daba como resultado, por lo tanto, una productividad de ácido láctico relativamente baja. Como una consecuencia, el nivel de adición lote alimentado del sustrato alcalino para neutralizar el ácido láctico producido era bajo (resultados no mostrados). Para iniciar la fermentación con una cantidad inicial sustancial de azúcares fermentables (> 2 g/l), una pre-hidrólisis de 378 g LTWS y preparación enzimática (88 mg por g DM LTWS) en aproximadamente 6 volumen de litro a pH 6.0 para dos horas fueron introducidos. Esto dio como resultado glucosa, xilosa y concentraciones de arabinosa de 2.0, 0.4 y 0.3 g/l, respectivamente (Fig. 3A).

45

[0056] La segunda fase (II) fue iniciada introduciendo un pre-cultivo de 1500 ml de *B. coagulans* DSM 2314. Una cantidad menor de ácido láctico producida en el pre-cultivo provocó una ligera reducción de pH y fue automáticamente neutralizada por la adición de LTWS (Fig. 2A, B). Después de una fase de latencia de cuatro horas, la concentración de oxígeno disuelto disminuyó rápidamente desde el 100% a condiciones que limitan el oxígeno por debajo de 1% (resultados no mostrados). En ese momento, una concentración de glucosa, xilosa y arabinosa de 3.3, 0.7 y 0.3 g/l, respectivamente, estaba presente (Fig. 3A). Estos azúcares fueron consumidos simultáneamente donde la glucosa fue utilizada más rápido que xilosa y arabinosa.

50

[0057] Simultáneamente al consumo de estos azúcares monoméricos, fue producido ácido láctico que fue neutralizado por la adición automática de LTWS alcalino. Por la adición de sustrato alcalino en toda la fase lote alimentado, el pH fue mantenido con precisión a 6.0 ± 0.1 (Fig. 2A, B). Al final de la fase II, una cantidad total de 10023 g LTWS deshidratado (-2706 g DM LTWS) y 320 ml de preparación enzimática se añadieron al fermentador. Una concentración de ácido láctico de 20.5 g/l sobrenadante fue detectada (Fig. 3B), que corresponde a un total de 342 g ácido láctico. La pureza quiral L(+) de ácido láctico fue determinada a 99.4% que es similar a la obtenida con xilosa como única fuente de carbono (WO 2004/063382).

55

60

[0058] Al final de la fase I, fue detectada una baja concentración de ácido acético en el medio que aumentó a 1,5 g/l en toda fase II pero, se mantuvo constante durante fase III (resultados no mostrados). Esto indica que ácido acético no fue muy probablemente un producto de fermentación formado por *B. coagulans*. Ácido acético se puede liberar sobre solubilización e hidrólisis de hemicelulosa durante pretratamiento químico (Palmqvist et al. (1999) Biotecnol. Bioeng. 63(1): 46-55). Por el procedimiento de deshidratación del LTWS, parte del ácido acético fue fácilmente separado del sustrato eliminando el agua a presión. Aparentemente, una cantidad restante de ácido acético fue proporcionada con el sustrato al fermentador. También, restos menores de otros ácidos orgánicos tales como ácido succínico y ácido fórmico (<0.5 g/l) fueron detectados en el caldo de fermentación.

[0059] La fase III fue iniciada cambiando el control de pH de la adición de LTWS alcalino a una suspensión de hidróxido cálcico 20% (p/v). Para mantener el pH a 6.0, adición de suspensión de hidróxido cálcico ocurrió de manera relativamente rápida pero cambió, no obstante, después de unas pocas horas a un nivel de adición inferior indicando un descenso de la productividad de ácido láctico volumétrico (Fig. 2B, 3B). Para excluir limitación (p. ej. por inactivación) de enzimas, una dosificación extra de preparación enzimática (80 ml) se añadió al fermentador después de 23.5 h de incubación. Esto resultó inmediatamente en una aceleración ligera del nivel de adición de hidróxido cálcico que indica una mayor productividad de ácido láctico y limitación de actividad enzimática (Fig. 3B). Sin embargo, después de 29.7 h de incubación, un descenso del nivel de adición de hidróxido cálcico fue observado nuevamente. Por lo tanto, una segunda dosificación extra de la preparación enzimática (240 ml) fue añadida y dio como resultado esta vez una ligera acumulación de glucosa y xilosa de 1.5 y 1.0 g/l (Fig. 3A), respectivamente, indicando que la conversión microbiana en vez de la hidrólisis enzimática era limitante. Después de 32 h de incubación, una concentración de ácido láctico de 37.1 g/l se obtuvo, con un ácido L(+)-láctico de pureza quiral 99.4%. La continuación del proceso SSF a un periodo de incubación total de 55 h resultó en una concentración de ácido láctico ligeramente aumentada de 40.7 g/l sobrenadante (-37.8 g caldo de fermentación ácido/kg láctico) con una productividad de ácido láctico volumétrico total de 0.74 g/l/h. A esta fase, un ácido L(+)-láctico de pureza quiral de 97.2% fue analizado. Este descenso ligero en la pureza de ácido láctico es posiblemente un resultado de infección con otros microorganismos no deseados que producen ácido láctico. Ya que el sustrato usado no era estéril y también el pretratamiento químico y fermentación ocurre en un sistema abierto bajo condiciones no estériles, es posible contaminación microbiana en todo el proceso de SSF.

Ejemplo 8. Eficiencia de conversión

[0060] La eficiencia de la hidrólisis enzimática del material polimérico presente en LTWS se muestra en Figura 4. La fracción polimérica insoluble fue determinada en varios puntos temporales en todo el experimento SSF. Al final de la pre-hidrólisis (2 h) de 378 g LTWS, 36% del glucano insoluble (Fig. 4A), 55% de xilano (Fig. 4B) y 62% de arabinano (Fig. 4C) fue convertido en sacáridos solubles incluyendo azúcares monoméricos y azúcares oligoméricos. Después de la fase lote alimentado (13 h), fueron añadidos 2706 g LTWS y resultó en una conversión de 42% de glucano, 57% de xilano y 63% de arabinano para productos que incluyen sacáridos solubles y ácido láctico. Entre 13 y 32 h de incubación, otra hidrólisis de los azúcares poliméricos fue observada. No obstante, durante las últimas 23 horas de SSF, tuvo lugar hidrólisis menor de los polisacáridos y esta correspondía con el descenso en la productividad de ácido láctico durante esta fase. Después 55 h, 398 g de glucano, 130 g de xilano y 11 g de arabinano estaban todavía presentes como material polimérico insoluble. Con estos valores, la eficiencia de hidrólisis del glucano inicial, xilano y arabinano presente en LTWS fueron calculados como 55,75 y 80%, respectivamente. Los azúcares monoméricos, derivados del LTWS, fueron parcialmente convertidos en ácido láctico (711 g) por *B. coagulans* y contabilizado por 81% (p/p) del máximo teórico, indicando la formación de otros productos tales como biomasa microbiana y dióxido de carbono. Un rendimiento de conversión total de 43% (p/p) del máximo teórico fue calculado según la ecuación 1. El índice de polisacáridos inicialmente presente en LTWS después 55 h de incubación se muestra en Tabla I. Una parte de los polisacáridos presentes en LTWS, se mantuvieron como polisacáridos insolubles (37% p/p) mientras que una parte menor fueron convertidos en azúcares oligoméricos solubles (5% p/p) y monoméricos (3% p/p). Otra parte de los polisacáridos iniciales presente en el LTWS no fue recuperada en forma de sacáridos o ácido láctico y fue por lo tanto asignado como 'no contabilizado'.

Tabla I. Destino de polisacáridos^a inicialmente presente en paja de trigo tratada con cal después de 55 h de sacarificación y fermentación simultánea. Valores presentados son promedios basados en mediciones analíticas duplicadas.

Fracción	Porcentaje (% p/p)
Polisacáridos (insoluble) ^b	37
Oligosacáridos (soluble)	5
Monosacáridos (soluble)	3
Ácido láctico (soluble)	43
No contabilizado (insoluble/soluble) ^c	13

^aTotal de glucano, xilano y arabinano

^bParte de los polisacáridos iniciales se mantuvieron presentes como polisacáridos insolubles

^cParte de los polisacáridos iniciales no fue recuperada y por lo tanto denominada como 'no

 contabilizado'

Ejemplo 9. Neutralización de ácido por sustrato alcalino

[0061] El ácido láctico producido (342 g) durante la fase lote alimentado (II) fue neutralizada con paja de trigo pretratado alcalino. Durante esta fase, una cantidad de 2328 g LTWS se añadió al fermentador. Junto con este sustrato, una cantidad de 230 g hidróxido cálcico se añadió al fermentador y se contabilizó para una proporción de 0.67 g hidróxido cálcico por g de ácido láctico. El ácido láctico (369 g) producido durante la fase de dosificación (III) fue neutralizado con 163 g hidróxido cálcico dando como resultado una proporción de 0.44 g ácido láctico por g hidróxido cálcico.

Discusión

[0062] Materias primas lignocelulósicas se consideran como sustratos atractivos potenciales para la producción de productos químicos en masa. Pretratamiento de biomasa se requiere para liberar la matriz lignocelulósica, una hidrólisis enzimática es necesaria para la hidrólisis de carbohidratos poliméricos. El pretratamiento de cal ha demostrado mejorar la digestibilidad enzimática de los polisacáridos presentes en lignocelulosas (Chang et al (1998) Appl. Biochem. Biotechnol. 74:135-159; Kaar y Holtzaple (2000) Biomasa y Bioenergía 18:189-199) y da como resultado, en comparación con otras vías de pretratamiento, una menor formación de inhibidores. No obstante, antes de la hidrólisis enzimática, es esencial ajustar el pH a un nivel óptimo para actividad enzimática. En este estudio, la reducción de pH mediante lavado o neutralización fue omitida usando el carácter alcalino de LTWS para neutralizar ácido láctico producido por fermentación microbiana durante un proceso SSF.

[0063] Los resultados mostraron que la parte más grande de los polisacáridos en LTWS fue convertida enzimáticamente y los azúcares resultantes fueron fermentados simultáneamente principalmente a ácido láctico por *B. coagulans* DSM 2314. Entre 10 y 30 h de incubación, las bacterias utilizaron los azúcares monoméricos, tan pronto como ellos aparecieron en el medio, dando como resultado concentraciones de azúcar monomérico relativamente bajas (< 2 g/l). Esto indica que en todo este periodo, la hidrólisis enzimática fue el paso que controla la velocidad. La máxima productividad de ácido láctico fue observada durante la fase lote alimentado y las horas iniciales de la fase de dosificación y disminuyó rápidamente después de aproximadamente 20 horas de incubación, como se muestra en Figura 3B. Una adición extra de preparación enzimática mostró una mejora ligera de la productividad de ácido láctico volumétrico pero cambió en unas horas otra vez a un índice de producción relativamente bajo. Una segunda adición de enzima extra no afectó la productividad de ácido láctico significativamente (Fig. 3B). Esta adición de nuevas enzimas resultó en una liberación modesta de azúcares de hemicelulosa (xilosa; arabinosa) pero no tuvo lugar más hidrólisis de glucano. Esto muestra que el glucano restante fue demasiado recalcitrante o no accesible a otras hidrólisis, dando como resultado productividad de ácido láctico decreciente. Otra explicación posible de la productividad de ácido láctico disminuida es la inhibición de enzimas y/o bacterias por la creciente concentración de ácido láctico.

[0064] Una concentración de ácido láctico de 40,7 g/l sobrenadante (?37,8 g ácido láctico/kg de caldo de fermentación) con una pureza quiral relativamente alta fue determinado después de 55 horas de incubación, correspondiente a un rendimiento de ácido láctico total de 43% del máximo teórico. Por otra parte, los rendimientos de la sacarificación enzimática y la fermentación fueron ambos determinados. Estos cálculos mostraron que, basado en análisis de residuo, al final del proceso SSF (55 h) 55% del glucano, 75% del xilano y 80% del arabinano presente en LTWS fue enzimáticamente hidrolizado lo que concuerda bien con resultados previamente obtenidos. Para mejorar el rendimiento es preciso reducir la terquedad o mejorar la accesibilidad de azúcares poliméricos en el LTWS por optimización del procedimiento de pretratamiento. Las concentraciones de monosacáridos y oligosacáridos solubles en el medio fueron relativamente bajas lo que pueden ser previsto en un proceso SSF. Un rendimiento de fermentación de 81% fue determinado y es ligeramente mejor que los resultados obtenidos por Otto (supra) que proporcionada la producción de 35 g/l ácido láctico de 50 g/l xilosa como única fuente de carbono. Ya que ningún otro producto de fermentación soluble fue detectado, el 19% restante del LTWS azúcares monoméricos derivados fueron más supuestamente convertidos en biomasa bacteriana y algún dióxido de carbono durante la parte aeróbica de la fermentación.

[0065] Durante la fase lote alimentado (II) era posible neutralizar la reducción de pH provocada produciendo ácido láctico por adición de la materia prima alcalina, mostrando que tratamiento de cal se puede combinar bien con la producción de una amplia variedad de ácidos orgánicos de biomasa lignocelulósica. En toda esta fase, la proporción de hidróxido cálcico en LTWS añadido por ácido láctico producido fue determinada a 0.67 g/g. La neutralización estequiométrica teórica de 1.00 g ácido láctico requiere 0.41 g hidróxido cálcico. Por lo tanto, sólo 61% del hidróxido cálcico inicialmente añadido a la paja de trigo fue usado para neutralización de ácido láctico. Por otro lado, en toda la fase de dosificación (III), una proporción alcalina/ácida de 0.44 g/g fue calculada de acuerdo con 93% de la suspensión de hidróxido cálcico añadida usada para neutralización de ácido láctico. La eficiencia baja del hidróxido cálcico añadido con el LTWS para neutralización de ácido láctico durante la fase II tiene tres explicaciones posibles. En primer lugar, parte del hidróxido cálcico podría haber sido usado durante el pretratamiento químico de la paja de trigo como la neutralización de ácido acético u otros ácidos orgánicos

5 y/o unión irreversible a la lignina. En segundo lugar, el hidróxido cálcico se puede liberar lentamente de las fibras de paja de trigo insolubles y podría por lo tanto haber sido parcialmente usado para neutralización de ácido láctico en la fase lote alimentado. Finalmente, además de producción de ácido láctico, otras reacciones de acidificación podrían haber contribuido a la reducción de pH y por lo tanto la demanda de sustrato alcalino. Por ejemplo la absorción y disociación del amonio de fuente de nitrógeno por el microorganismo en el amoníaco y protones (Guebel (1992) biotecnol. Letona. 14(12):1193-1198).

10 [0066] Los resultados en este documento muestran que es posible usar materiales lignocelulósicos para la producción de ácido láctico. La biomasa lignocelulósica es un sustrato relativamente poco costoso y esta afecta positivamente a los costes de materia prima para producción de ácido láctico. Sin embargo, en comparación con las materias primas tradicionales relativamente 'limpias' con composición bien definida, usar sustratos lignocelulósicos heterogéneos requerirá un tratamiento de flujo descendente (DSP) más intensificado para recuperar y purificar el ácido láctico del caldo de fermentación complejo. Los costes de materiales de materia prima y costes operativos del DSP contribuyen considerablemente a los costes de producción total de ácido láctico (Åkerberg y Zacchi (2000) Bioresour. Technol. 75:119-126). Si la reducción de costes del uso materias primas lignocelulósicas sobrepasa el aumento potencial de costes de DSP no fue analizado en el momento.

15 [0067] En resumen, paja de trigo tratada con cal fue convertida en ácido L(+)-láctico por *B. coagulans* a lo largo de un proceso de sacarificación y fermentación simultánea en una balsa de 20L. Los azúcares de pentosa y hexosa derivados del material polimérico fueron utilizados simultáneamente por *B. coagulans* dando como resultado una concentración de ácido láctico final de 40.7 g/l sobrenadante que justifica el 43% (p/p) del rendimiento teórico. Para nuestro conocimiento, esta es la primera evidencia de que un proceso con un pretratamiento alcalino combinado de biomasa lignocelulósica y control de pH en la fermentación de ácido orgánico produce un ahorro significativo de consumo de cal y evita la necesidad de reciclar cal.

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de un ácido orgánico como un producto de fermentación de biomasa lignocelulósica, que comprende los pasos de:
- 5 a) pretratamiento de biomasa lignocelulósica con un agente alcalino para obtener biomasa lignocelulósica pretratada alcalina con un pH de entre aproximadamente 8.0 y aproximadamente 14.0;
- b) sacarificación y fermentación simultánea (SSF) de la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina de paso a) en un fermentador, por la cual la reducción en pH, provocada por la producción del ácido orgánico, se neutraliza por la adición de biomasa lignocelulósica pretratada alcalina como obtenida en la fase a) con un pH de entre aproximadamente 8.0 y aproximadamente 14.0, opcionalmente en combinación con un álcali, para adaptar el pH por debajo de aproximadamente 8.0 y/o para mantener el pH a un específico pH por debajo de 8.0, permitiendo actividad óptima del microorganismo(s) y/o enzimas añadidas; y
- 10 c) opcionalmente recuperación del producto de fermentación;
- 15 donde la SSF del paso b) comprende una fase de pre-hidrólisis donde el pH de una parte de la biomasa pretratada alcalina obtenida por paso a) se adapta por adición de uno o más ácidos hasta entre 2.0 y 8.0 para permitir la conversión de biomasa pretratada alcalina en azúcares fermentables para iniciar la conversión microbiana de biomasa en ácidos orgánicos.
- 20 2. Un método según la reivindicación 1, donde la SSF del paso b) comprende además los pasos de:
- i) hidrólisis enzimática con una enzima hidrolítica para obtener sacáridos fermentables; y
- ii) fermentación microbiana usando un microorganismo que es capaz de convertir los sacáridos del paso i) en el producto de fermentación.
- 25 3. Un método según la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde la SSF del paso b) se acciona en un modo de quimiostato, en el que la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina se usa como un nutriente.
4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina se añade a la SSF del paso b) en una manera lote alimentado.
- 30 5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el pretratamiento de biomasa lignocelulósica es precedido por o combinado y/o integrado con una trituración mecánica de biomasa lignocelulósica, donde la trituración mecánica es preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en: fresado, refinación mecánica y extrusión.
- 35 6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina está sujeta a uno o varios de los siguientes pasos antes de SSF:
- i) un paso de enfriamiento;
- 40 ii) un paso de lavado; y/o
- iii) un paso de deshidratación;
- donde la deshidratación es preferiblemente realizada usando filtración mientras se aplica presión a la biomasa pretratada, donde la presión aplicada está entre 0 y aproximadamente 100 bar.
- 45 7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la temperatura durante SSF es dispuesta entre aproximadamente 20 hasta aproximadamente 80°C y/o donde el pH durante la SSF es controlada entre aproximadamente 2.0 y aproximadamente 10.0.
8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el pH durante SSF se controla por adición de la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina y un álcali y donde la SSF preferiblemente comprende una fase de pre-hidrólisis, una fase lote alimentado con control de pH por adición de biomasa lignocelulósica pretratada alcalina y una fase de dosificación con control de pH por adición de un álcali.
- 50 9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la biomasa lignocelulósica es seleccionada del grupo que consiste en: césped, madera, bagazo, paja, papel, material vegetal, y combinaciones de los mismos.
- 55 10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el agente alcalino usado en paso a) es seleccionado del grupo que consiste en: hidróxido cálcico ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), óxido de calcio (CaO), amoníaco (NH_3), hidróxido sódico (NaOH), carbonato de sodio, hidróxido potásico (KOH), urea y combinaciones de lo mismo.
- 60 11. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, donde la enzima hidrolítica de paso b) es seleccionada del

grupo que consiste en: preparaciones con celulasa, preparaciones de hemicelulasa, celobiasa, preparaciones de xilanasas, amilasa y pectinasa.

- 5 12. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ácido orgánico es seleccionado del grupo que consiste en: ácido láctico, ácido cítrico, ácido itacónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido acético, ácido glutámico, ácido málico, ácido maleico, ácido propiónico, ácido butírico, ácido glucónico y combinaciones de los mismos.
- 10 13. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el microorganismo es una bacteria, un hongo, una arquea o un alga, donde el microorganismo es preferiblemente seleccionado de especies de *Acetobacter*, *Bacillus coagulans*, *B. racemilacticus*, *B. laevolacticus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli*, *Gluconobacter species*, *Pseudomonas species*, bacterias del ácido láctico, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* y *Saccharomyces cerevisiae*.
- 15 14. Un reactor que comprende un contenedor para el pretratamiento alcalino de biomasa lignocelulósica unido a un fermentador para la sacarificación y fermentación simultánea (SSF) de la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina, donde el reactor es para usar en el método en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, y donde:
- 20 1) El contenedor comprende:
- 20 i) un dispositivo de mezcla;
- ii) un dispositivo de calefacción; y
- iii) opcionalmente, medios para pre-extracción de componentes solubles de la biomasa lignocelulósica;
- 25 2) El fermentador comprende:
- 25 i) control de pH automático; y
- ii) una entrada para biomasa lignocelulósica pretratada alcalina obtenible por paso de reivindicación 1 a) del contenedor, que se controla por el control de pH automático,
- 30 donde el medio de conexión entre el contenedor y el fermentador es preferiblemente una bomba, más preferiblemente un alimentador roscado para permitir alimentación automática de la biomasa lignocelulósica pretratada alcalina en el fermentador;
- donde el fermentador preferiblemente comprende uno o más de lo siguiente:
- 35 a) una entrada para alimentación automática de un agente alcalino, que se controla por el control de pH automático;
- b) una entrada para una enzima, un microorganismo y/o un ácido o base;
- c) una salida para muestreo y/o monitor; y/o
- d) regulación automática de la temperatura
- 40 e) un ensamblaje de agitador.
15. Uso del reactor según la reivindicación 14 para la producción de un ácido orgánico de biomasa lignocelulósica según el método de reivindicaciones 1 - 13.

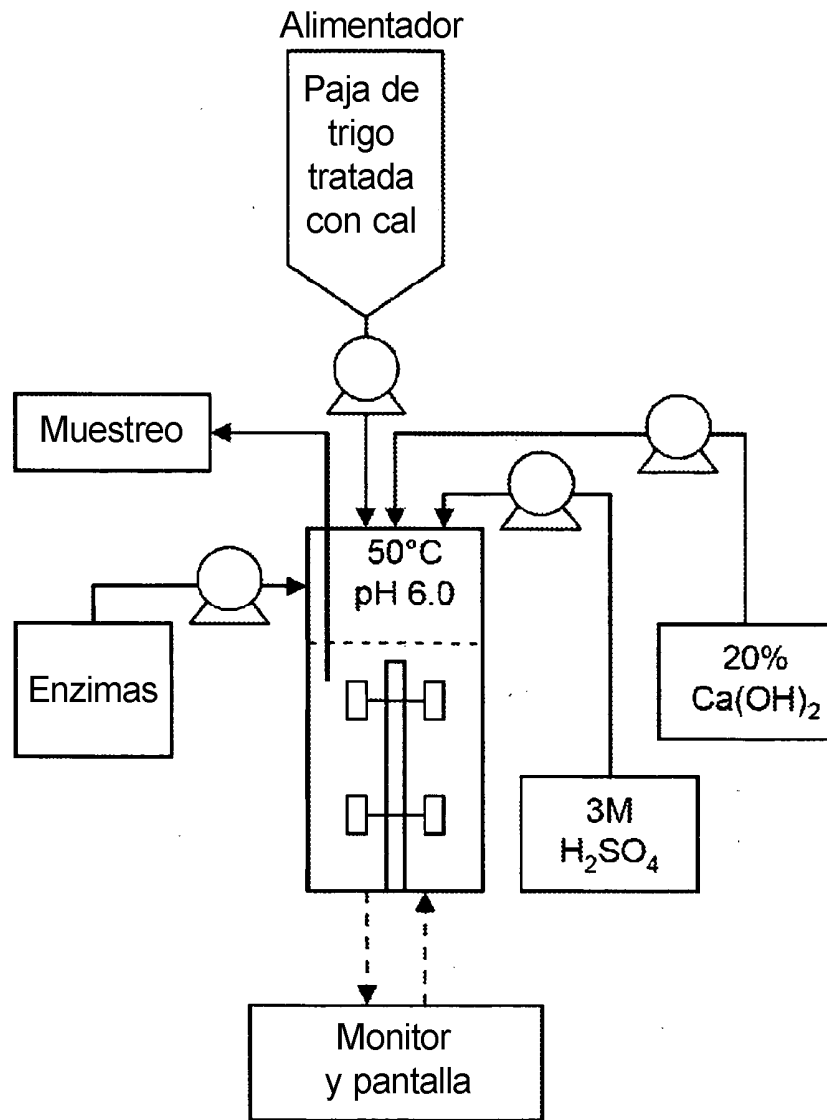


Fig 2a

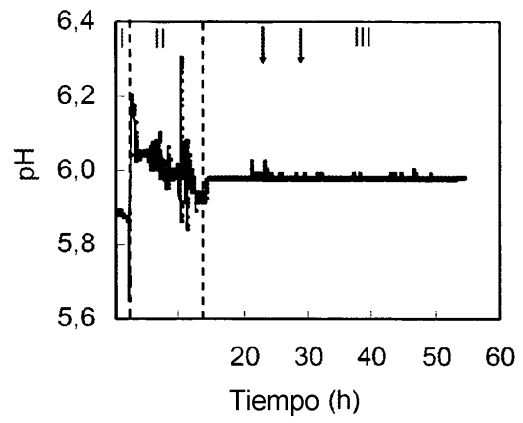


Fig 2b

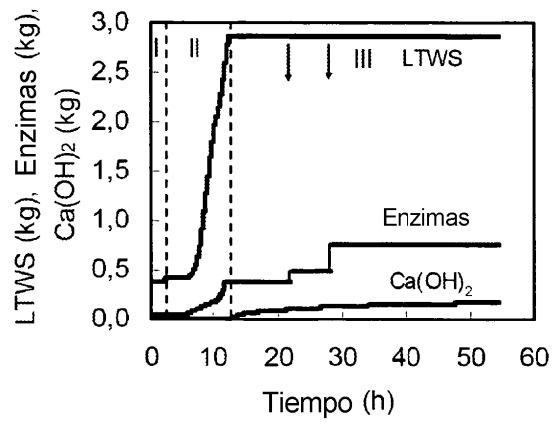


Fig 3a

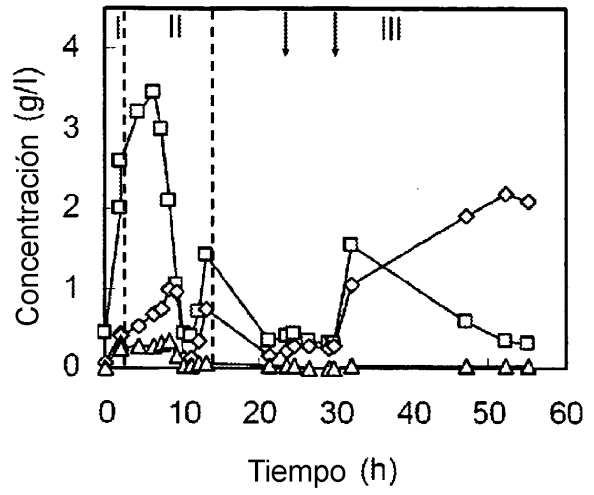


Fig 3b

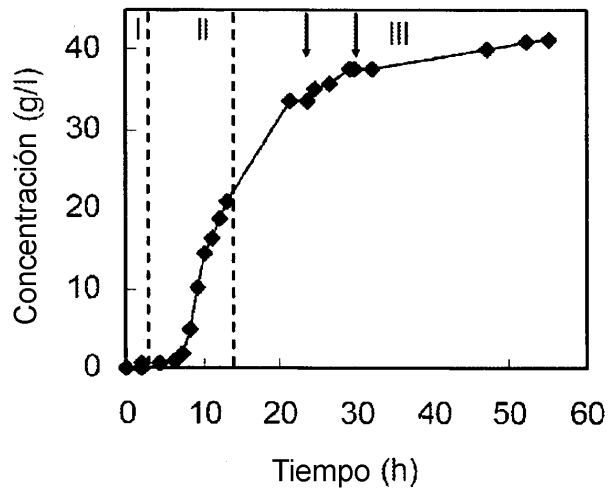


Fig 4a

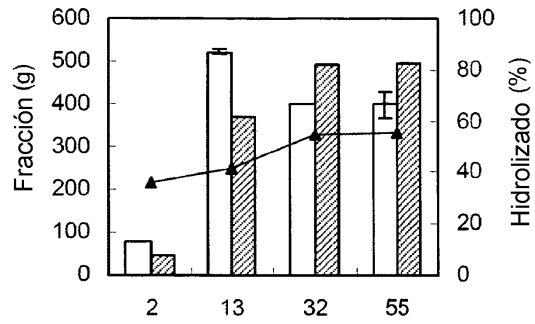


Fig 4b

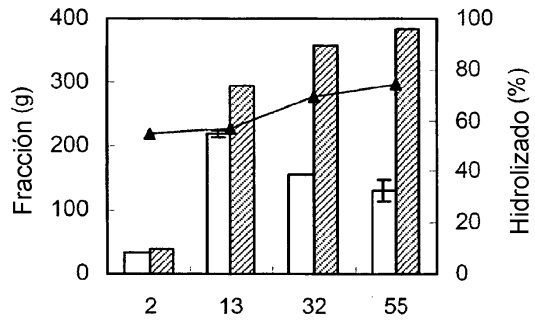


Fig 4c

