

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 115**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

C13K 1/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2010 E 10724349 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014 EP 2435576**

54 Título: **Combinación de enzimas para licuar biomasa**

30 Prioridad:

25.05.2009 EP 09161030

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

30.04.2014

73 Titular/es:

**SÜD-CHEMIE IP GMBH & CO. KG (100.0%)
Lenbachplatz 6
80333 München, DE**

72 Inventor/es:

**KOLTERMANN, ANDRE;
RARBACH, MARKUS;
BRÜCK, THOMAS;
GERLACH, JOCHEN;
UNTERSTRASSER, ISABEL;
KOHL, ANDREAS;
DRAGOVIC, ZDRAVKO y
KETTLING, ULRICH**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 458 115 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

Combinación de enzimas para licuar biomasa

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un material de biomasa de remolacha azucarera y/o caña de azúcar licuado así como a métodos de producción y usos del mismo.

10 **Antecedentes técnicos y técnica anterior**

La remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) y la caña de azúcar (*Saccharum sp.*) son fuentes valiosas de azúcar refinado tal como sacarosa líquida o cristalina para uso industrial y particular. Las raíces de la remolacha azucarera contienen sacarosa y pulpa de remolacha azucarera, conteniendo esta última pectina, celulosa y hemicelulosa. La caña de azúcar contiene sacarosa y pulpa de caña de azúcar, conteniendo esta última celulosa, hemicelulosa, pectinas y lignina. El procedimiento de refinado de azúcar es un procedimiento para extraer sacarosa de o bien remolacha azucarera o bien caña de azúcar seguido por la retirada de impurezas y la cristalización de sacarosa. Tras la retirada de barro, arena, malas hierbas y hojas, las remolachas azucareras se alimentan al interior de cortadoras y se cortan en trozos largos llamados cosetas. Las cosetas se descargan al interior de un tanque de escaldado que conduce al difusor. Aquí el azúcar se retira de las cosetas disolviéndose en agua caliente en un procedimiento a contracorriente continuo. Los productos de este procedimiento son la disolución azucarada llamada jugo crudo y la denominada pulpa de remolacha, secándose ésta última en una secadora de pulpa. El jugo crudo se mueve a través de diversas fases de purificación y filtración para retirar impurezas y sustancias no azucaradas para proporcionar jugo denso (contenido del 65-70% de s.s.) o, tras la cristalización, azúcar fino refinado. Además de refinarse para dar azúcar cristalino, la sacarosa en forma de azúcar crudo o jugo denso es un sustrato de fermentación valioso para la producción biotecnológica de productos químicos y biomoléculas. Debido al costoso procedimiento de refinación, el uso de sacarosa y otros azúcares como materias primas de fermentación para la producción de productos tales como combustibles o elementos estructurales de polímeros es relativamente caro. Por tanto, se desean sustratos de fermentación más económicos.

La biomasa de remolacha azucarera no puede usarse de manera eficaz para los procedimientos de fermentación típicos tales como producción de etanol, butanol, ácido láctico o ácido propiónico sin tratamiento adicional para licuar la biomasa e hidrolizar los polímeros.

Se han descrito procedimientos de tratamiento químico para la liberación de azúcares monoméricos y sacarosa de biomasa que contiene celulosa, pectina y hemicelulosa tales como biomasa de remolacha azucarera. Procedimientos no selectivos tales como tratamiento con ácido sulfúrico pueden usarse para hidrolizar biomasa de remolacha azucarera; sin embargo tal tratamiento no es eficaz a bajas temperaturas. A temperaturas más altas (por ejemplo pretratamiento de vapor de ácido diluido a 200-250°C) conduce a componentes inhibidores tales como hidroximetilfurfural (HMF) o furfural que hace que un procedimiento de fermentación posterior sea problemático (Jing *et al.*, 2009).

El documento US 4.886.672 (Baynast *et al.*) describe un procedimiento para la licuación de biomasa de remolacha azucarera mediante tratamiento enzimático. El procedimiento incluye lavar y moler de manera gruesa biomasa de remolacha azucarera, mezclar el producto molido con una mezcla enzimática, ajustar el pH a de 3 a 5,5, moler de manera fina adicionalmente el sustrato y recuperar el líquido resultante. La mezcla de enzimas usada en este procedimiento contiene al menos una "SPS-asa" ("SP 249", una preparación de enzimas obtenida a partir de *Aspergillus aculeatus*), una celulasa ("Celluclast", una preparación de enzimas obtenida a partir de *Trichoderma reesei*) y una celobiasa ("Novo 188", una preparación de enzimas obtenida a partir de *Aspergillus niger*). En este procedimiento pueden añadirse agentes bacteriostáticos tales como formol. Aunque la adición de tales agentes bacteriostáticos no es deseable para procedimientos de fermentación posteriores que usan la biomasa licuada, su adición se describe como esencial para evitar proliferaciones microbianas, por ejemplo para proporcionar una biomasa estable en almacenamiento.

55 **Sumario de la invención**

El objetivo subyacente de la presente invención es por tanto proporcionar un procedimiento para producir una biomasa que pueda usarse en un procedimiento de fermentación posterior incluso después de almacenamiento prolongado.

En un primer aspecto, la invención proporciona por tanto un procedimiento para la producción de una biomasa licuada, que comprende las siguientes etapas:

- (a) proporcionar biomasa sólida derivada de remolacha azucarera y/o caña de azúcar;
- (b) licuar dicha biomasa someténdola a una mezcla de enzimas que comprende actividad celobiohidrolasa,

beta-glucosidasa y poligalacturonasa para dar una biomasa licuada con un contenido de sólidos insolubles restantes de menos del 2% (p/p).

5 En una realización preferida de la invención, se añade un producto químico o microorganismo para hacer que la biomasa licuada sea estable en almacenamiento.

En una realización particularmente preferida de la invención, se añade el producto químico o microorganismo antes de o durante la etapa (b).

10 El producto químico es preferiblemente un ácido que se añade en una cantidad para ajustar el pH de la biomasa licuada a un pH inferior a 3.

15 La invención también proporciona una biomasa licuada derivada de remolacha azucarera y/o caña de azúcar, que es estable en almacenamiento y fermentable, y que puede obtenerse mediante el procedimiento de la presente invención. Esta biomasa licuada puede usarse para la producción de un producto que resulta de fermentación.

En otro aspecto, la invención proporciona por tanto un procedimiento para la producción de una biomasa licuada, que comprende las siguientes etapas:

20 (a) proporcionar biomasa sólida derivada de remolacha azucarera y/o caña de azúcar;

(b) licuar dicha biomasa someténdola a una mezcla de enzimas que comprende actividad celobiohidrolasa, beta-glucosidasa y poligalacturonasa a una biomasa licuada con un contenido de sólidos insolubles restantes de menos del 2% (p/p); y

25 (c) fermentar los azúcares liberados de la biomasa licuada para dar uno o más productos de fermentación.

30 En una realización preferida de este aspecto, las etapas (b) y (c) se llevan a cabo simultáneamente. En otra realización preferida de la invención, se añade un producto químico o microorganismo para hacer que el material del procedimiento sea estable en almacenamiento.

Figuras

35 La figura 1 muestra la influencia de dosificar enzimas sobre la composición y el rendimiento de azúcar.

La figura 2 muestra el efecto de la adición de H₂SO₄ sobre el rendimiento de sacáridos y el pH de reacción.

40 La figura 3 muestra los perfiles de crecimiento microbiano y de glucosa de hidrolizado de remolacha azucarera (SBH, *sugar beet hydrolysate*) no esterilizado con (ensilado) y sin (no ensilado) adición de *Lactobacillus amylovorus*.

La figura 4 muestra una comparación de la licuación enzimática concurrente/secuencial y procedimientos de ensilado.

45 La figura 5 muestra el perfil de pH y el crecimiento celular de *Clostridium saccharobutylicum* (DSMZ 13864) en un medio de remolacha azucarera licuada.

La figura 6 muestra la producción de ABE por *Clostridium saccharobutylicum* (DSMZ 13864) en un medio de remolacha azucarera licuada.

50 La figura 7 muestra la fermentación etanólica de hidrolizado de remolacha azucarera usando *S. cerevisiae*.

Descripción detallada de la invención

55 En la etapa (a) del procedimiento de la presente invención, se proporciona biomasa de remolacha azucarera y/o biomasa de caña de azúcar.

60 El término "biomasa de remolacha azucarera" se refiere al tejido de raíz completo y sin procesar de *Beta vulgaris* incluyendo la piel externa y la pulpa interna. El tejido seco de *Beta vulgaris* contiene un 80% (p/p) de sacarosa soluble, mientras que la pulpa de remolacha está compuesta por aproximadamente un 90% de azúcares poliméricos, incluyendo un 7% de pectina, un 7% de celulosa y un 7% de hemicelulosa en forma de arabinano. El término "biomasa de caña de azúcar" se refiere a los tallos completos y sin procesar de *Saccharum sp.* incluyendo la piel externa y la pulpa interna. El tejido seco de *Saccharum sp.* contiene un 80% (p/p) de sacarosa soluble, mientras que el bagazo de caña seco está compuesto por aproximadamente un 70% de azúcares poliméricos, incluyendo un 45% de celulosa, un 23% de lignina y un 25% de hemicelulosa principalmente en forma de xilano.

65 La biomasa se lava preferiblemente antes de someterla al tratamiento enzimático, y se retira el agua de lavado antes

- de un procedimiento adicional. Además, se prefiere proporcionar la biomasa en forma particulada por ejemplo cortando la biomasa antes de la etapa (b), preferiblemente en forma de cosetas. El tamaño de las partículas de biomasa es preferiblemente tal que el 90% (p/p) o más de las partículas tienen una longitud máxima de al menos 1 mm, más preferiblemente de 10 a 200 mm. En el caso de partículas en forma de disco, el diámetro es preferiblemente de al menos 1 mm. Sin embargo, la biomasa preferiblemente no se muele antes de o durante la etapa (b).
- Para la etapa de licuado, la biomasa se añade con un contenido en sólido seco preferiblemente del 5 al 30% (p/p), más preferiblemente del 15 al 25% (p/p). El término "sólido seco" (s.s.) se refiere a la razón de masa con respecto a biomasa determinada tras la retirada de agua de tejido fresco usando una balanza infrarroja.
- Antes de someter la biomasa sólida a la etapa (b), puede congelarse, aunque generalmente esto no es ni necesario ni deseable.
- En la etapa de procedimiento (b), la biomasa sólida, preferiblemente en forma particulada, se licúa entonces hasta que el contenido de sólidos insolubles restantes es de menos del 2% (p/p) (preferiblemente menos del 1% (p/p), incluso más preferiblemente menos del 0,5% (p/p)) usando una composición o mezcla de enzimas que comprende actividad celobiohidrolasa, beta-glucosidasa y poligalacturonasa. Ésta es la verdadera etapa de licuación. El término "licuación" significa la conversión hidrolítica de sustratos poliméricos insolubles en productos monoméricos u oligoméricos solubles mediante procedimientos químicos, físicos y/o enzimáticos tales como hidrólisis. El término "sustrato polimérico" significa sustancias compuestas de o bien un constituyente monomérico específico o una variedad limitada de constituyentes monoméricos definidos unidos covalentemente entre sí en una estructura molecular lineal o parcialmente ramificada.
- El término "actividad" de una enzima se refiere a la actividad catalítica de la enzima en condiciones apropiadas en las que la enzima sirve como catalizador de proteínas, que convierte sustratos poliméricos o artificiales específicos en productos oligoméricos o monoméricos específicos.
- El término "celobiohidrolasa" se refiere a una enzima de la clase E.C. 3.2.1.91, que cataliza la hidrólisis de celulosa polimérica a celobiosa y otros oligómeros de beta-D-glucosa. La actividad celobiohidrolasa se proporciona preferiblemente mediante un producto de celulasa que puede mostrar, además de actividad celobiohidrolasa (CBH I y/o CBH II), una o más de actividad endo-glucanasa (EG I y/o EG II), actividad exo-beta-glucosidasa y actividad endo-xilanasa.
- El término "poligalacturonasa" se refiere a una enzima de la clase E.C. 3.2.1.15, que cataliza la descomposición de pectina polimérica y ácido poligalacturónico a oligómeros de ácido galacturónico y ácido galacturónico monomérico. La actividad poligalacturonasa se proporciona preferiblemente mediante un producto de pectinasa que puede mostrar, además de la actividad poligalacturonasa, una o más actividades incluyendo actividad pectina liasa, actividad arabinofucosidasa, actividad endo-arabinasa, actividad endo-xilanasa, actividad pectato liasa, actividad pectinmetilesterasa, actividad poligalacturonidasa. En una realización preferida, la actividad poligalacturonasa muestra un valor óptimo dentro de un intervalo de pH de 2 a 7 y una actividad de al menos el 50% de su actividad óptima a un pH inferior a 3. En otra realización preferida, la actividad poligalacturonasa muestra un valor óptimo dentro de un intervalo de pH de 2 a 3.
- El término "beta-glucosidasa" se refiere a una enzima de la clase E.C. 3.2.1.21, que cataliza la hidrólisis de celobiosa, celotriosa, celotetraosa y otros oligómeros de beta-D-glucosa al correspondiente monómero de glucosa.
- El término "pectinmetilesterasa" se refiere a una enzima de la clase E.C. 3.1.1.11, que cataliza la hidrólisis de sustituyentes metilo a partir de la estructura principal de poligalacturonano modificado. El término "ramnogalacturonasa" se refiere a una enzima de la clase E.C. 3.2.1, que cataliza la hidrólisis de sustituyentes ramnosa de la estructura principal de poligalacturonano. El término "1,3-/1,6-D-glucanasa" se refiere a una enzima de la clase E.C. 3.2.1, que cataliza la hidrólisis de sustituyentes hexosa de polímeros de azúcar 1,3-/1,6-modificados.
- El término "mezcla de enzimas" significa una mezcla de entidades proteínicas que pueden convertir de manera catalítica sustratos poliméricos u oligoméricos en constituyentes oligoméricos o monoméricos más pequeños (elementos estructurales). Según la presente invención, la mezcla de enzimas usada en la etapa (b) comprende actividad celobiohidrolasa, beta-glucosidasa y poligalacturonasa.
- La mezcla de enzimas contiene preferiblemente del 1 al 50% (p/p), preferiblemente del 1 al 10%, más preferiblemente del 1 al 4% (p/p) de celobiohidrolasa, con respecto al peso total de la mezcla de enzimas. La mezcla de enzimas contiene preferiblemente del 1 al 10% (p/p), más preferiblemente del 1 al 4% (p/p) de beta-glucosidasa, con respecto al peso total de la mezcla de enzimas. La mezcla de enzimas contiene preferiblemente del 25 al 75% (p/p), más preferiblemente del 35 al 45% (p/p) de poligalacturonasa, con respecto al peso total de la mezcla de enzimas. Se prefieren particularmente mezclas de enzimas que contienen del 1 al 50% (p/p) de celobiohidrolasa, del 1 al 10% (p/p) de beta-glucosidasa y del 1 al 75% (p/p) de poligalacturonasa, particularmente del 30 al 40% (p/p) de

celobiohidrolasa, del 1 al 4% (p/p) de beta-glucosidasa y del 35 al 45% (p/p) de poligalacturonasa, con respecto al peso total de la mezcla de enzimas.

5 La razón en peso de celobiohidrolasa:beta-glucosidasa:poligalacturonasa está preferiblemente en el intervalo de 1:(de 0,01 a 0,2):(de 0,5 a 10), más preferiblemente en el intervalo de 1:(de 0,03 a 0,2):(de 1 a 2).

10 La mezcla de enzimas preferiblemente muestra también una o más actividades hemicelulasa o pectinasa adicionales seleccionadas preferiblemente de arabinasa, xilanasa, pectinmetilesterasa, ramnogalacturonasa y 1,3-/1,6-beta-D-glucanasa o una combinación de arabinasa y poligalacturonasa con ramnogalacturonidasa y/o pectina liasa. El término "hemicelulasa" se refiere a una colección de actividades hidrolasa que son responsables de la retirada y despolimerización de residuos hemicelulósicos en la biomasa (por ejemplo arabinano, arabinoxilano, galactano y xilano). Estas actividades de enzimas comprenden arabinasa, arabinofucosidasa, galactasa, galactosidasa, xilanasa xilosidasa, arabinogalactasa y 1,3-/1,6-beta-D-glucanasa. El término "pectinasa" se refiere a una colección de actividades hidrolasa, esterasa y liasa que son responsables de la retirada y despolimerización de residuos pectínicos en la biomasa (por ejemplo poligalacturonano, ramnogalacturonano, xilogalacturonano). Estas actividades de enzima comprenden ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, glucuronidasa, pectina liasa, pectinmetilesterasa, acetilesterasa, acetilgalacturonesterasa y pectato liasa.

20 El término "xilanasa" se refiere a una enzima de la clase E.C. 3.2.1.8, que cataliza la hidrólisis aleatoria de xilano polimérico, pectina polimérica o hemicelulosa que contiene residuos xilosa que da como resultado la formación de oligómeros de azúcar que contienen xilosa y/o residuos xilosa monoméricos. El término "arabinasa" se refiere a una enzima de la clase E.C. 3.2.1.99, que cataliza la hidrólisis aleatoria de arabinano y sustancias pectínicas que contienen residuos de arabinosa para disminuir los oligosacáridos que contienen unidades de arabinosa y residuos arabinosa monoméricos. El término "xilosidasa" se refiere a una enzima de la clase E.C. 3.2.1.37, que cataliza la hidrólisis de oligómeros que contienen xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa o xilosa a residuos xilosa monoméricos u oligómeros que contienen xilosa inferiores. El término "arabinofucosidasa" se refiere a una enzima de la clase E.C. 3.2.1.55, que cataliza la hidrólisis de arabinosa, arabinotriosa, arabinotetraosa u otros oligómeros de azúcar que contienen arabinosa a oligómeros más cortos o arabinosa monomérica.

30 La mezcla de enzimas preferiblemente carece de cualquier enzima invertasa.

El término "E/S" se refiere la razón en masa de enzima total aplicada a un determinado contenido en sólido seco (s.s.) de biomasa. La mezcla de enzimas se añade preferiblemente a la biomasa en una cantidad del 0,025 al 4% (p/p) de la biomasa, más preferiblemente del 0,05 al 0,5% (p/p) de la biomasa, prefiriéndose particularmente del 0,05 al 0,1% (p/p) de la biomasa.

40 En una realización preferida, la etapa (b) se lleva a cabo durante de 2 a 100 horas, más preferiblemente de 2 a 80 horas, prefiriéndose particularmente de 2 a 20 horas, incluso más preferiblemente por debajo de 10 horas. La temperatura de reacción está preferiblemente en el intervalo de 35 a 60°C, más preferiblemente de 40 a 50°C. En otra realización preferida, la etapa (b) se lleva a cabo durante más de 100 horas, y la temperatura de reacción está en el intervalo de 10 a 30°C, más preferiblemente la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiental sin calentamiento o enfriamiento.

45 Según la presente invención, se añade un producto químico o microorganismo antes de o durante la etapa (b) para hacer que la biomasa licuada sea estable en almacenamiento. La adición del producto químico o microorganismo ajusta preferiblemente el pH del producto licuado final a un valor de menos del 3. En una realización particularmente preferida, el producto químico y/o microorganismo se añade a la biomasa sólida antes que o junto con la mezcla de enzimas.

50 El producto químico es preferiblemente un ácido, más preferiblemente un ácido inorgánico tal como ácido sulfúrico. El ácido se añade preferiblemente en una cantidad para ajustar el pH de la biomasa licuada a un pH inferior a 3, más preferiblemente inferior a 1,5. Los agentes químicos para la conservación de biomasa incluyen pero no se limitan a ácidos minerales tales como H₂SO₄, H₂SO₃, HCl, H₃PO₄, H₂CO₃, HNO₃, HNO₂ y/o anhídridos ácidos tales como SO₂, CO₂, que se añaden 0 - 4 horas después de la iniciación de la licuación enzimática, preferiblemente a concentraciones del 0,01-0,1% (v/p), más preferiblemente del 0,01-0,03% (v/p). La concentración y el punto de tiempo para la adición de estos agentes químicos se optimizan, de modo que estos agentes no reduzcan la eficacia del procedimiento de licuación enzimática y no conduzcan a productos de degradación de azúcar. En una realización particularmente preferida, el ácido se añade a la biomasa antes que o junto con la mezcla de enzimas.

60 En otra realización de la invención, se añade un microorganismo antes de o durante la etapa (b) para hacer que la biomasa licuada sea estable en almacenamiento. Los microorganismos preferidos incluyen uno o más seleccionados de bacterias de ácido láctico, incluyendo *Bacilli*, *Lactobacilli* y *Lactococci*, levaduras incluyendo *Saccharomyces* y bacterias de producción de alcohol incluyendo *Clostridia*, que pueden producir un conservante. Los agentes biológicos que pueden añadirse para la conservación de biomasa licuada incluyen pero no se limitan a *Saccharomyces sp.*, *Schizosaccharomyces sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Clostridium sp.*, *Zymomonas sp.*, *Escherichia sp.* o *Propionibacterium sp.* La inoculación de suspensión de biomasa de

- remolacha azucarera o caña de azúcar con estos agentes biológicos tras el inicio del procedimiento de licuación enzimática da como resultado la formación de productos de fermentación, que comprenden pero no se limitan a etanol, butanol, acetona, 1,3-propanodiol, propanol, ácido acético, ácido láctico y ácido propiónico, que actúan como conservantes protegiendo el líquido resultante frente al deterioro por microorganismos. El tamaño de inóculo microbiano (y punto de tiempo exacto de adición de inóculo al procedimiento de licuación enzimática) se optimiza para cada agente biológico de manera que no se reduce la eficacia del procedimiento de licuación enzimática. En una realización preferida, el inóculo microbiano se añade a una densidad óptica de $DO_{600nm}=0,1$. Preferiblemente, el inóculo microbiano se añade 0 - 4 horas después de empezar la licuación enzimática. En una realización particularmente preferida, el microorganismo se añade a la biomasa antes que o junto con la mezcla de enzimas.
- Adicionalmente, los productos de fermentación resultantes se forman en cantidades mínimas en condiciones aeróbicas o anaeróbicas y sin control del pH, de manera que se conserva un valor máximo de azúcar liberado de la biomasa y de manera simultánea la concentración de dichos productos de fermentación es suficiente para inhibir el crecimiento de todas las entidades microbianas. Para el procedimiento de conservación biológica descrito, el valor de pH generalmente se autorregula con un pH final inferior a 3, preferiblemente entre 1,5 y 2,5, en el que la fermentación termina por sí misma sin interferencia manual. La producción de productos de fermentación conservantes en condiciones anaeróbicas plantea la ventaja adicional de que no hay que concebir un suministro de oxígeno al interior de la instalación de almacenamiento. Por tanto la instalación de almacenamiento pretendida puede ser un SILO de estilo agrícola sencillo para almacenamiento de biomasa.
- Los problemas de la técnica anterior para usar biomasa de remolacha azucarera y de caña de azúcar licuada como medios de fermentación rentables se superan por tanto proporcionando combinaciones de procedimientos secuenciales y/o paralelos para la licuación enzimática y la conservación química/biológica, lo que permite el uso de la biomasa licuada en procedimientos fermentativos aguas abajo para producir enzimas y productos químicos de valor añadido.
- Una ventaja adicional de las metodologías presentadas es que la licuación y conservación de biomasa enzimática puede llevarse a cabo en paralelo y en un único tanque, lo que proporciona una configuración de procedimiento única y rentable. Por tanto, la recogida de biomasa, el almacenamiento, la licuación y la conservación del líquido resultante pueden consolidarse en una única etapa de procedimiento. Para completar el procedimiento de licuación y conservación de biomasa de remolacha azucarera/caña de azúcar es posible por tanto simplemente transferir la biomasa cruda del campo a la instalación de almacenamiento, añadir enzimas de licuación, mezclar éstas con agentes químicos o biológicos para iniciar la conservación y finalmente cerrar la instalación para establecer un entorno anaeróbico.
- Aún otra ventaja del procedimiento es que las metodologías de conservación suaves descritas en el presente documento conservan el 90-100% (p/p) del contenido en azúcar inicial liberado por licuación enzimática de biomasa de remolacha azucarera y caña de azúcar, que por tanto está disponible para procedimientos de fermentación aguas abajo. Aún otra ventaja del procedimiento actual es que a diferencia de la técnica anterior la biomasa licuada no contiene agentes bacteriostáticos tales como formol o productos de degradación de azúcar, tales como hidroximetilfurfural (HMF), que actúan como inhibidores de fermentación en procedimientos aguas abajo.
- La invención por tanto también proporciona un material de biomasa de remolacha azucarera y/o caña de azúcar licuado, que es estable en almacenamiento y fermentable, y que puede obtenerse mediante el procedimiento de la presente invención. Su pH preferido está por debajo de 3, preferiblemente en el intervalo de 1,5 a 2,5. Su contenido en azúcar está preferiblemente por debajo del 65% (p/p), con respecto a la masa total del producto licuado. Su contenido en sacarosa esté preferiblemente en el intervalo del 0 al 90% (p/p), más preferiblemente del 0 al 50% (p/p), su contenido en fructosa está preferiblemente en el intervalo del 0 al 45% (p/p), más preferiblemente del 20 al 45% (p/p), y su contenido en glucosa está generalmente en el intervalo del 0 al 70% (p/p), preferiblemente del 50 al 70% (p/p), cada uno con respecto al contenido en azúcar total. En una realización preferida, el contenido en sacarosa está por debajo del 10% (p/p) y el contenido en glucosa y fructosa está por encima del 45% (p/p) y del 40% (p/p), respectivamente, del contenido de azúcar total. La suma del contenido en fructosa y el contenido en glucosa está preferiblemente por encima del 90% (p/p) del contenido en azúcar total. La estabilidad en almacenamiento puede conseguirse sin esterilización mediante tratamiento térmico o concentración del líquido resultante de la etapa de procedimiento (b).
- Un material de biomasa licuada se considera estable en almacenamiento si el aumento en unidades formadoras de colonia que se detectan en placas de agar LB sólido tras almacenamiento de 6 meses a TA es de menos de 1000 ufc/ml. Un material de biomasa licuada se considera fermentable si es al menos tan efectivo como el hidrolizado de almidón de maíz que tiene el mismo contenido de hexosa en la producción de etanol usando *S. cerevisiae*.
- En otro aspecto de la invención la concentración mínima del 0,2-15% (v/v) de conservantes químicos o biológicos y las condiciones de almacenamiento industrial son suficientes para impedir el deterioro de la biomasa licuada durante más de 4 meses. Se ha demostrado que la concentración del producto químico o los conservantes derivados biológicamente usados en los procedimientos descritos no tiene influencia significativa en procedimientos de fermentación aguas abajo para producir productos químicos de valor añadido, siempre que el pH y la concentración de disolvente orgánico cumpla con la especificación del procedimiento de fermentación deseado. Con el fin de

ajustar estos parámetros para el procedimiento de fermentación deseado los conservantes pueden retirarse alternativamente usando métodos energéticamente eficientes tales como precipitación de ácido y bases o retirada de disolvente usando rectificación por cambio de presión.

5 En un aspecto particular de la invención se demostró que la biomasa de remolacha azucarera/caña de azúcar licuada y conservada era un componente excelente de los medios de fermentación industrial para organismos bacterianos, de levadura y fúngicos que producen productos de valor añadido tales como enzimas, productos farmacéuticos o químicos.

10 Los ejemplos de microorganismos para la fermentación de biomasa de remolacha azucarera/caña de azúcar licuada tras ajuste de pH comprenden pero no se limitan a bacterias, levaduras u hongos filamentosos.

15 En una realización preferida de la invención, los microorganismos se seleccionan del grupo de *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Clostridium sp.*, *Escherichia sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Acetobacter sp.*, *Gluconobacter sp.*, *Corynebacterium (Brevibacterium) sp.*, *Cryptococcus sp.*, *Achromobacter sp.*, *Streptomyces sp.*, *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Erwinia sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Leuconostoc sp.* o *Ralstonia sp.*

20 En otra realización preferida de la invención, los microorganismos se seleccionan del grupo de *Saccharomyces sp.*, *Schizosaccharomyces sp.*, *Candida utilis*, *Mucor sp.*, *Torulopsis sp.*, *Pichia sp.*, *Hansenula sp.* o *Rhodotorula sp.*

25 Los productos de valor añadido que resultan de la fermentación bacteriana (Schmid, 2006) de biomasa de remolacha azucarera/caña de azúcar licuada comprenden pero no se limitan a ácidos orgánicos (por ejemplo ácido acético, ácido láctico, ácido fumárico, ácido propiónico y ácido glucurónico), aminoácidos (por ejemplo ácido glutámico, leucina, lisina, treonina, ácido aspártico, fenilalanina, cisteína), caprolactamas (por ejemplo alfa-aminocaprolactama), antibióticos (por ejemplo bleomicina, virginiamicina, lincomicina, monensina, blasticidina, tetraciclina), vitaminas (por ejemplo vitamina B2, B12 y C), enzimas, nucleótidos/nucleósidos (por ejemplo NADH, ATP, cAMP, FAD, coenzima A), biopolímeros (por ejemplo polihidroxibutirato, poliamidas/fibroínas), polisacáridos (por ejemplo xantano, dextrano), aminoglucanos (por ejemplo ácido hialurónico) así como disolventes orgánicos y biocombustibles (por ejemplo acetona, etanol, butanol, propanodiol).

30 Los productos de valor añadido (Schmid, 2006) que resultan de fermentación con levadura de biomasa de remolacha azucarera/caña de azúcar licuada comprenden pero no se limitan a disolventes orgánicos (por ejemplo etanol, propanol), nucleótidos (por ejemplo ARN), biotensioactivos (por ejemplo lípidos de soforosa), enzimas y biopolímeros (por ejemplo espidroínas).

35 Los ejemplos de fermentaciones fúngicas que usan biomasa de remolacha azucarera/caña de azúcar licuada y conservada como medio tras ajuste de pH mínimo comprenden pero no se limitan a *Aspergillus sp.*, *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.*, *Acremonium sp.*, *Rhizopus sp.* y *Talaromyces sp.*

40 Los productos de valor añadido que resultan de fermentación fúngica (Schmid, 2006) con biomasa de remolacha azucarera/caña de azúcar licuada comprenden pero no se limitan a ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido fumárico), antibióticos (por ejemplo penicilina, cefalosporina), enzimas y polisacáridos (por ejemplo quitina).

45 Los procedimientos de fermentación preferidos incluyen:

Un procedimiento de fermentación, en el que la biomasa licuada se somete a fermentación usando *S. cerevisiae* para producir etanol.

50 Un procedimiento de fermentación, en el que la cepa pertenece al género *Clostridium* y en el que el producto de fermentación es n-butanol, acetona o etanol.

Un procedimiento de fermentación, en el que la cepa pertenece al género *Escherichia* y en el que el producto de fermentación es una enzima recombinante o un producto bioquímico tal como un ácido, un aminoácido, o un alcohol.

55 Un procedimiento de fermentación, en el que la cepa pertenece al género *Propionibacterium* y en el que el producto de fermentación es ácido propiónico.

Un procedimiento de fermentación, en el que la cepa pertenece al género *Corynebacterium* y en el que el producto de fermentación es un aminoácido.

60 Un procedimiento de fermentación, en el que la cepa pertenece al género *Aspergillus* y en el que el producto de fermentación es un ácido orgánico o una enzima.

65 Un procedimiento de fermentación, en el que la cepa pertenece al género *Lactobacillus* y en el que el producto de fermentación es un ácido orgánico.

En una realización preferida, la biomasa sólida se licúa manera simultánea usando una mezcla de enzimas y se inocula con un microorganismo, tal como levadura (por ejemplo *S. cerevisiae*) dando como resultado un procedimiento de licuación y fermentación de una etapa. Preferiblemente el producto de fermentación principal (por ejemplo etanol) estará presente en una concentración que hace que todo el líquido del procedimiento sea estable en almacenamiento.

En otra realización preferida, la biomasa licuada se somete a fermentación usando una cepa de levadura, fúngica o bacteriana que puede producir un alcohol o un ácido orgánico y en el que el alcohol o ácido orgánico se separa del caldo de fermentación (i) extrayendo el alcohol o ácido orgánico del caldo de fermentación. En una realización particularmente preferida, la biomasa licuada se somete a fermentación usando una cepa de levadura, fúngica o bacteriana que puede producir un alcohol y en la que el alcohol se separa del caldo de fermentación (i) extrayendo el alcohol del caldo de fermentación, preferiblemente usando dióxido de carbono o aire o una mezcla de los mismos, (ii) adsorbiendo el alcohol en un material adsorbedor, y (iii) la posterior desorción del alcohol del material adsorbedor.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos tienen sólo fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitativos para la invención.

Ejemplo 1: Licuación enzimática de remolacha azucarera entera

Se preparó material de remolacha azucarera entera a partir de raíces de remolacha azucarera frescas tomadas en Sulzemoos, Alemania. Se lavaron las raíces de remolacha para retirar la tierra restante y se cortaron en trozos de 10 mm x 10 mm (cosetas) usando una mezcladora Waring. El material de remolacha azucarera tenía en promedio un contenido en s.s. del 24,7%.

Se usaron las siguientes enzimas: arabinasa (E-EARAB, Megazymes Inc., Irlanda), arabinofucosidasa (E-AFASE, Megazymes Inc., Irlanda), xilanasa (EXYTR1, Megazymes Inc., Irlanda), poligalacturonidasa (E-PGALUSP, Megazymes Inc., Irlanda), celulasa (Celluclast, Novozymes, Dinamarca; que contiene actividades CBH I, CBH II, EG I, EG II, BGL, endo-xilanasa), celulasa B (Ecostone Cellulase, AB Enzymes GmbH, Darmstadt, Alemania; preparación de enzimas *T. reesei*, que contiene actividades CBH I, CBH II, EG I, EG II, BGL, endo-xilanasa), beta-glucosidasa (Novo 188, Novozymes, Dinamarca) y pectinasa (Pectinex Ultra SP-L, Novozymes, Dinamarca; que contiene actividades pectina liasa, arabinofucosidasa, endo-arabinasa endo-xilanasa, pectato liasa, pectinmetilesterasa y poligalacturonidasa). Cuando fue necesario se desalinizaron y concentraron las enzimas con 45 ml de tampón acetato de sodio (50 mM, pH 5) usando 50 ml de dispositivos de ultrafiltración Amicon (límite de 10 kDa; Millipore, Maidstone, RU).

Además, se usaron las siguientes enzimas: preparación de enzima celulasa derivada de *Trichoderma reesei* (ATCC 56764, 60787); preparación de enzima pectinasa derivada de *Aspergillus niger* (DSMZ: 737, DSM 7840); preparación de enzima pectinasa derivada de *Aspergillus aceulatus* (CBS 589.94); preparación de enzima beta-glucosidasa derivada de *Aspergillus niger* (DSMZ 737).

Se determinaron las concentraciones de proteína mediante el método Bradford (Bradford, 1976). Se midieron las actividades endo- y exo-celulasa usando p-nitrofenil-beta-D-celobiosido (Wood y Bhat, K., 1988). Se determinó la actividad arabinofuranosidasa usando 4-nitrofenil-alfa-L-arabinofuranósido (pNP-Araf) (Taylor *et al.*, 2006). Se determinó la actividad xilosidasa usando beta-D-xilopiranosido sustituido con o-nitrofenol (Chen *et al.*, 1986; Taguchi *et al.*, 1996).

Ejemplo 1.1: Licuación de biomasa de remolacha azucarera en condiciones técnicas

Se preparó la siguiente mezcla de enzimas:

0,8 ml de Celluclast (0,5% p/p de s.s.), 0,13 ml de Novo 188 (0,1% p/p de s.s.), 3,7 ml de Pectinex Ultra SP-L (0,5% p/p s.s.), 30,4 ml de tampón NaAc 50 mM (pH 5).

Se mezcló esta mezcla de enzimas con material de remolacha azucarera fresca (cosetas) en diversas razones en masa (0-0,1% (p/p) de enzima/sustrato, E/S). La mezcla de reacción final contenía un 15% de s.s. de material de remolacha azucarera. Se incubó la mezcla sin ningún tratamiento mecánico adicional a 45°C durante 6 horas. Tras la incubación, la biomasa de remolacha azucarera estaba casi completamente licuada. Sólo el 0,35% (p/p) de la biomasa de remolacha azucarera inicial permaneció como sólidos insolubles tal como se determinó mediante mediciones de balanza infrarroja. Se filtró la dispersión resultante a través de un filtro de nailon de 0,2 µm y se aplicaron posteriormente 100 µl a análisis HPLC. Se analizó la mezcla de hidrólisis resultante mediante HPLC (Agilent, Alemania) con una columna de intercambio de iones Aminex HPX 87 (BioRad Labs, Hercules, EE.UU.) (eluyente: 100% de agua, T: 85°C, Caudal: 0,6 ml/min, detección por infrarrojos). La composición de sacárido resultante en el sobrenadante con respecto a diversas razones de dosificación de enzimas se muestra en la figura 1. Los datos muestran que el procedimiento de licuación se completó en 6 horas, lo que distingue al procedimiento de

la técnica anterior, en la que se necesitaban un mínimo de 20 horas para la licuación (de Baynast *et al.*, 1989).

Los resultados también indican que no se requiere aporte de energía mecánica adicional antes de o durante la etapa de licuación de remolacha azucarera. El procedimiento no requiere moler la biomasa para una licuación de biomasa eficaz. En las condiciones experimentales se consigue una licuación completa y una liberación cuantitativa de todos los componentes de azúcar de la biomasa de remolacha azucarera. Una dosificación del 0,1% de E/S da como resultado una licuación eficaz.

Ejemplo 2: Licuación y conservación de biomasa

Ejemplo 2.1: Licuación y conservación química de biomasa

Se usó ácido mineral (H_2SO_4) para conservar químicamente remolacha azucarera licuada e impedir el crecimiento microbiano sin afectar a la licuación e hidrólisis de biomasa enzimática. Efecto de la concentración de H_2SO_4 y el tiempo de adición sobre el rendimiento de la licuación enzimática: Se preparó biomasa de remolacha azucarera fresca tal como se describió anteriormente. Para iniciar la licuación de biomasa de remolacha azucarera (20 g; 20% final (p/p de s.s.)) se añadió una preparación de enzimas (0,1% de E/S) que contenía las siguientes actividades: pectinasa al 50% (p/p), celulasa al 50% (p/p), beta-glucosidasa 4 CBU/ml. Además se dosificó la materia prima con diferentes concentraciones de H_2SO_4 (0,2%, 0,3% (v/p)). Entonces se llevó a cabo la licuación en un matraz Erlenmeyer cerrado a lo largo de 7 días a 45°C sin mezclado. Tras el período de incubación de 7 días, se determinó el procedimiento de licuación enzimática en presencia de H_2SO_4 usando procedimientos de HPLC normalizados (véase anteriormente). Los datos se muestran en la figura 2. Se añadió el ácido al comienzo de la reacción enzimática. La adición de un 0,2% (v/p) de H_2SO_4 (pH 2,5) condujo a la licuación completa de la biomasa de remolacha. Sorprendentemente, la licuación enzimática pudo llevarse a cabo a un pH de 2,5.

Ejemplo 2.2: Licuación y conservación biológica de biomasa con *Lactobacilli* (ensilado inducido por ácido láctico)

Se generó materia prima de fermentación estable a partir de biomasa de remolacha azucarera mediante licuación y conservación inducida por ácido láctico (ensilado) simultáneas. Se activaron cultivos de *Lactobacillus* (*Lactobacillus amylovorus*, DSMZ 16698) en medio MRS que contenía un 5% (p/p) de glucosa adicional. Se preparó biomasa de remolacha azucarera fresca tal como se describió anteriormente. Para inducir la licuación de biomasa (20% (p/p)), se añadió una preparación de enzimas que contenía las siguientes actividades: pectinasa al 0,25%, celulasa al 0,25%, beta-glucosidasa 4 CBU/ml (dosificación: 0,1% de E/S). Se inoculó de manera simultánea biomasa de remolacha azucarera con cultivos de *Lactobacillus* ($DO_{600nm}=0,1$) (hidrolizado de biomasa ensilado) o, alternativamente, no se inoculó (control, no ensilado). Se llevó a cabo la licuación de biomasa/el cultivo microbiano simultáneos en condiciones anaeróbicas en matraces Erlenmeyer a 40°C durante 350 horas. Sorprendentemente, la adición del cultivo microbiano no tuvo efecto sobre el procedimiento de licuación enzimática que se completó en las condiciones experimentales en el plazo de 72 horas. Durante todo el tiempo de incubación, se siguió de manera espectrométrica el crecimiento celular microbiano a DO_{600nm} mientras que la concentración de glucosa se monitorizó mediante HPLC. El pH de los hidrolizados de biomasa tanto ensilado como no ensilado disminuyó ligeramente de pH 4 a 3,5, lo que está relacionado con la liberación de metabolitos ácidos como ácido láctico y acético. Los datos en la figura 3 muestran que en la muestra ensilada (tratada con *Lactobacillus*) el crecimiento celular es más rápido que en el control no ensilado pero se detuvo tras un período de incubación de 95 horas. A diferencia de ello, en el control no ensilado el crecimiento celular continúa hasta el final del período de muestreo. De la manera más importante, en el control no ensilado el crecimiento celular continuado da como resultado una pérdida del 50% (p/v) de glucosa al final del tiempo de muestreo. Los datos muestran que la licuación enzimática y el ensilado biológico simultáneos con *Lactobacilli* es un método factible para conservar ~90% (p/v) de azúcares en el hidrolizado de remolacha azucarera (medio de fermentación).

Se ha examinado la conservación microbiana en otra serie experimental con inoculación de *Lactobacilli*. La cantidad de biomasa tratada y el cóctel de enzimas aplicado para la licuación son equivalentes a los experimentos descritos anteriormente. Condiciones experimentales:

1. mezcla de enzimas (sólo licuación enzimática, no ensilado; control);
2. mezcla de enzimas + adición de *Lactobacillus* de ensilado ($DO_{600nm} = 0,1$) tras 0 horas de licuación;
3. mezcla de enzimas + adición de *Lactobacillus* de ensilado ($DO_{600nm} = 0,1$) tras 8 horas de licuación.

El procedimiento de licuación de biomasa y los procedimientos de conservación se monitorizaron para glucosa y ácido láctico mediante HPLC tras 8, 48 y 240 horas. Los resultados acumulativos se muestran en la figura 4. Los datos muestran que en ausencia de cultivos de *Lactobacillus* de ensilado, el contenido en glucosa disminuye rápidamente. La adición directa de cultivos de *Lactobacillus* de ensilado conducen a la rápida formación de ácido láctico y pérdidas de glucosa limitadas (~10% (p/v)) confirmando la conservación inducida por ácido láctico. Por el contrario, la adición de cultivos de *Lactobacillus* de ensilado 8 horas tras el inicio de la licuación enzimática dio como resultado menos producción de ácido láctico y mayores pérdidas de glucosa.

Ejemplo 2.3 Licuación de biomasa y conservación química separadas

Se usó ácido mineral (H_2SO_4) para conservar químicamente remolacha azucarera licuada e impedir el crecimiento microbiano tras la licuación e hidrólisis de biomasa enzimática. Se licuó remolacha azucarera tal como se describió en el ejemplo 1.1. Se añadió H_2SO_4 a la biomasa licuada tras 4 h y se incubó a TA en un matraz Erlenmeyer, al que se le instaló un tubo de fermentación para liberar cualquier sustancia gaseosa formada. Se monitorizó el contenido en azúcar de la biomasa licuada a lo largo de 190 días. Se tomaron muestras de manera aseptica a los 15, 46, 99 y 190 días y se midieron las concentraciones de azúcar usando procedimientos de HPLC descritos anteriormente. Los datos en la figura 7 muestran que no pudo detectarse ninguna pérdida de azúcares a lo largo del período de muestreo, lo que indica que puede conseguirse una conservación a largo plazo de biomasa de remolacha azucarera licuada mediante la adición de ácido sulfúrico hasta una concentración final del 0,5 o del 1% v/v. Se determinó que el pH de la biomasa conservado fue de 1,33 y 1 para las muestras que contenían el 0,5 o el 1% de H_2SO_4 v/v respectivamente.

Ejemplo 3: Biomasa de remolacha azucarera licuada como medio de fermentaciónEjemplo 3.1: Producción de acetona, butanol y etanol

Se preparó hidrolizado de remolacha azucarera tal como se describió en el ejemplo 1.1. Se añadió *Clostridium saccharobutylicum* (DSMZ 13864, inóculo $DO_{600nm} = 1$) a un medio de fermentación que contenía un 15% (p/v) de hidrolizado de remolacha azucarera como única fuente de carbono.

Composición del medio: hidrolizado de remolacha azucarera al 15% (p/v), triptona peptona (BD) 6 g/l, extracto de levadura 2 g/l, $NH_4CH_3COO^-$ 3 g/l, $MgSO_4$ 0,3 g/l, KH_2PO_4 0,5 g/l, $FeSO_4 \times 7 H_2O$ 0,01 g/l, biotina 0,2 g/l, ácido p-aminobenzoico 1 g/l, clorhidrato de cloruro de tiamina 1 g/l, resazurina 1 mg/l. Se llevó a cabo la fermentación a lo largo de 40 h a 35°C y pH 6,5. Se determinó la biomasa a través de mediciones de DO_{600nm} y se midió el pH. Se centrifugaron posteriormente muestras a 12.000 rpm durante 5 min. Se analizaron los sobrenadantes resultantes usando análisis de CG para determinar las concentraciones de acetona, butanol y etanol en la mezcla de reacción. La figura 5 muestra el desarrollo del perfil de pH y de la densidad celular durante el procedimiento de fermentación. La figura 6 muestra la formación de disolventes. Los datos demuestran que la producción de disolventes es factible cuando se hacen crecer cepas apropiadas de *Clostridia* en medios basados en hidrolizado de remolacha azucarera.

Se purificó adicionalmente el butanol mediante adsorción *in situ* de butanol fuera de la fase de vapor a un adsorbedor. Se llevó a cabo la adsorción a temperatura ambiental, lo que reduce significativamente la energía necesaria para la recuperación en comparación con los métodos convencionales. Se retiró el butanol del adsorbedor calentando el adsorbente y se recogió enfriando el vapor que contenía butanol que salía del adsorbedor en un condensador. En comparación con un procedimiento de extracción de gas, la concentración de la molécula orgánica con este método es significativamente más alta debido a la selectividad del adsorbedor para la molécula orgánica. Se consiguió recuperación de butanol del medio de fermentación usando un procedimiento de adsorción/desorción de butanol mediado por un material de zeolita. Para este procedimiento se preparó una zeolita MFI según el documento US 7.244.409. Se adsorbió el butanol desde la fase de vapor de sobrecarga de caldo de fermentación ABE (en un sistema cerrado). Se desorbió (recuperó) el butanol adsorbido a la zeolita calentando el adsorbente. Se condensó el vapor que salía del matraz en un condensador y se recogió. El contenido en butanol global en el condensado fue del 67%.

Ejemplo 3.2: Producción de etanol con *S. cerevisiae* usando hidrolizado de remolacha bruto como fuente de carbono

Se preparó hidrolizado de remolacha azucarera tal como se describió anteriormente y se usó como único componente de medio de fermentación para la producción de etanol con *S. cerevisiae* (DSMZ 1333).

Se inoculó hidrolizado de remolacha azucarera (30 ml) no diluido y no esterilizado con 1 g/l de células de *S. cerevisiae*. Se llevaron a cabo fermentaciones en matraces de agitación de 100 ml, que se incubaron a 28°C (200 rpm) durante 48 horas. Se incluyó un control negativo con medio de hidrolizado de remolacha no inoculado. Se determinaron concentraciones de etanol a 24 y 48 horas usando análisis de CG (Sillers *et al.*, 2008). No pudo detectarse ninguna formación etanol tras el tiempo de incubación de 48 horas en la muestra de control negativo. La figura 7 muestra los resultados de la fermentación etanólica. La fermentación dio como resultado un rendimiento de etanol del 64% (p/v) basándose en la glucosa contenida en hidrolizado de remolacha cruda (13-15% (p/v)). Este resultado indicaba que el hidrolizado enzimático de remolacha azucarera puede usarse directamente en fermentaciones etanólicas sin la necesidad de tratamiento adicional del hidrolizado.

Bibliografía:

Bradford M. M. (1976) A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Chen W.P., Matsuo M., Yasui T. (1986) *Agric. Biol. Che.*, 50, págs. 1183-1194.

- De Baynast, De Septfontaines R., Brouard F., Baret J.-L., Gicquiaux Y., Olsen H. (1988) Process for the liquefaction of beets and chicory roots by enzymatic hydrolysis and liquid hydrolysate. Documento US 4.886.672.
- 5 Ezeji T. C. Qureshi N., Blaschek H.P. (2004) Butanol fermentation research: upstream and downstream manipulations. Chem Rec, vol. 4, n.º 5, págs. 305-314.
- Jing X., Zhang X., Bao J. (2009) Inhibitor performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulose enzymes during cellulose hydrolysis. Appl. Biochem. Biotechnol., DOI 10.1007/s12010-009-8525-z (antes de la impresión).
- 10 Oosterveld A., Beldmann G., Voragen A.G.J., (2002) Enzymatic modification of pectic polysaccharides obtained from sugar beet pulp. Carbohydrate Polymers 48, págs. 73-81.
- Sakamoto T., Sakai T. (1995) Analysis and structure of sugar-beet pectins by enzymatic methods. Phytochemistry 39, págs. 821-823.
- 15 Schmid R.D. (2006) Pocket Guide to Biotechnology and Genetic Engin. Wiley-VCH editores.
- Sillers R., Chow A., Tracy B., Papoutsakis E.T. (2008) Metabolic engineering of the non-solvatogenic Clostridium acetobutyricum strain M5 to produce butanol without acetone demonstrate the robustness of the acid-formation pathways and the importance of electron balance. Metabol Engineer. 10, págs. 321-332.
- 20 Spagnuolo M., Crecchio C., Pizigallo M.D.R., Ruggiero. (1997) Synergistic effects of cellolytic and pectolytic enzymes in degrading sugar beet pulp. Bioresour. Technol. 60, págs. 215-222.
- 25 Taguchi H.; Hamasaki T., Akamatsu T, Okada H. (1996) A simple assay for xylanase using o-nitrophenyl-β-D-xylobioside. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 60, págs. 983-985.
- 30 Woskow y Glatz (1991) Propionic acid production by a propionic acid-tolerant strain of Propionibacterium acidipropionici in Batch and semicontinuous fermentation. Appl. Envir. Microbiol. 57, págs. 2821-2828.
- Wood T.M., Baht K.M., (1989) Methods for measuring cellulose activities. Methods in Enzymology. 160, págs. 87-112.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de un producto licuado, que comprende las siguientes etapas:
 - 5 (a) proporcionar material de biomasa de remolacha azucarera y/o caña de azúcar;
 - (b) licuar dicha biomasa sometiéndola a una mezcla de enzimas que comprende celobiohidrolasa, beta-glucosidasa y poligalacturonasa para dar un producto licuado con un contenido de sólidos insolubles restantes de menos del 2% (p/p).
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que un producto químico o microorganismo se añade antes de o durante la etapa (b) para hacer que el producto licuado sea estable en almacenamiento.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el producto químico se selecciona del grupo de ácido inorgánico, anhídridos inorgánicos o en el que el microorganismo es uno o más seleccionados de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Saccharomyces* y *Clostridium*.
- 20 4. Procedimiento según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (b) se lleva a cabo durante de 2 a 20 horas.
5. Procedimiento según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que la mezcla de enzimas se usa en una cantidad del 0,025 al 0,1% (p/p) de la biomasa.
- 25 6. Procedimiento según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que la mezcla de enzimas contiene del 1 al 4% (p/p) de celobiohidrolasa, del 1 al 4% (p/p) de beta-glucosidasa y del 35 al 45% (p/p) de poligalacturonasa, con respecto al peso total de la mezcla de enzimas.
7. Procedimiento según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que no se lleva a cabo ninguna reducción mecánica de tamaño durante la etapa de procedimiento (b).
- 30 8. Procedimiento según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que la mezcla de enzimas contiene adicionalmente una o más actividades hemicelulasa.
9. Procedimiento según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que no se añade nada de invertasa a la mezcla de enzimas.
- 35 10. Procedimiento según una o más de las reivindicaciones anteriores, que se lleva a cabo en un único tanque.
- 40 11. Procedimiento según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto químico o los microorganismos se añaden a la biomasa sólida antes que o junto con la mezcla de enzimas.
- 45 12. Biomasa licuada derivada de remolacha azucarera y/o caña de azúcar, que es estable en almacenamiento y fermentable, y que puede obtenerse mediante un procedimiento según una o más de las reivindicaciones 1 a 11, según lo cual estable en almacenamiento significa que el aumento en unidades formadoras de colonia que se detectan en placas de agar LB sólido tras almacenamiento de 6 meses a TA es de menos de 1000 ufc/ml.
- 50 13. Biomasa licuada según la reivindicación 12, que tiene un contenido en sacarosa del 0 al 50% (p/p), un contenido en fructosa del 20 al 45% (p/p) y un contenido en glucosa del 50 al 70% (p/p).
14. Uso de la biomasa licuada según una o más de las reivindicaciones 12 ó 13 para la producción de un producto que resulta de fermentación.
- 55 15. Procedimiento de fermentación, que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar una biomasa licuada según una o más de las reivindicaciones 12 ó 13,
 - (b) ajustar opcionalmente el pH de la biomasa licuada,
 - 60 (c) someterla a una fermentación con bacterias, levaduras u hongos, y
 - (d) separar el producto de fermentación.

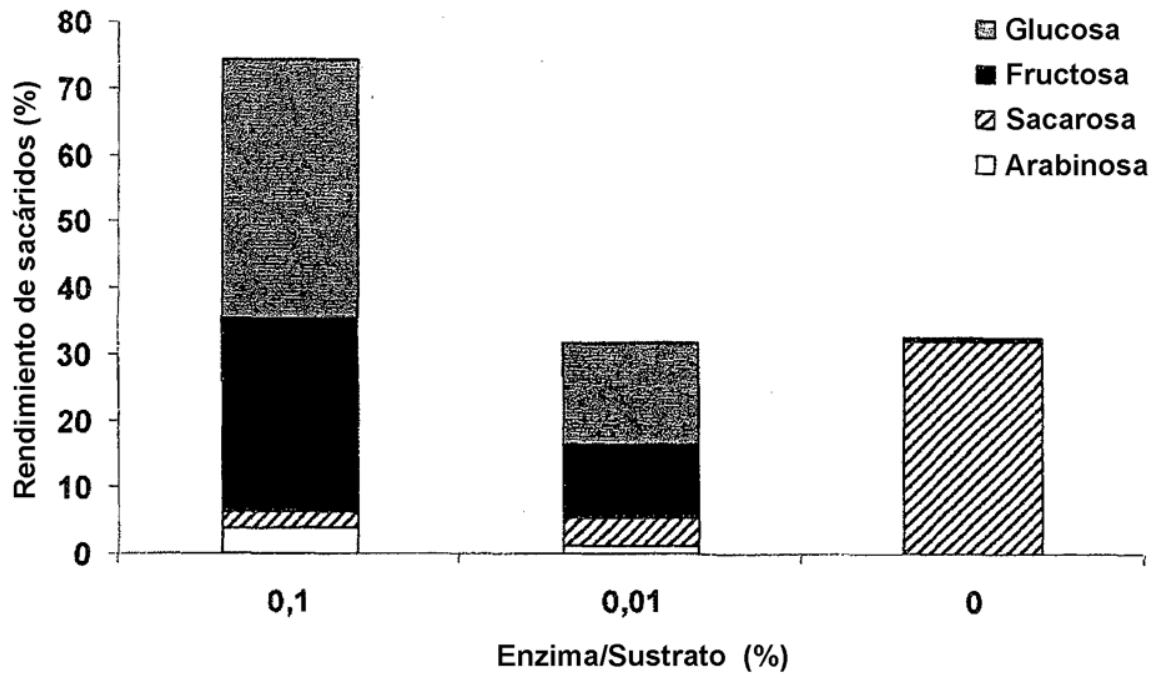


Fig. 1

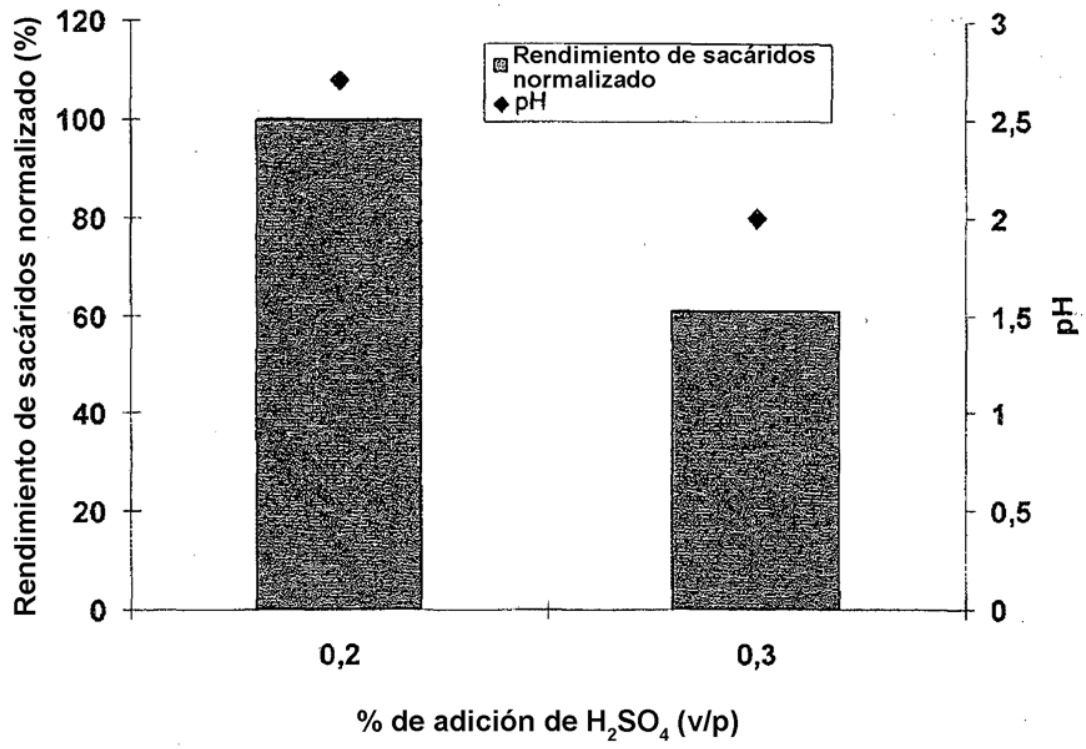


Fig. 2

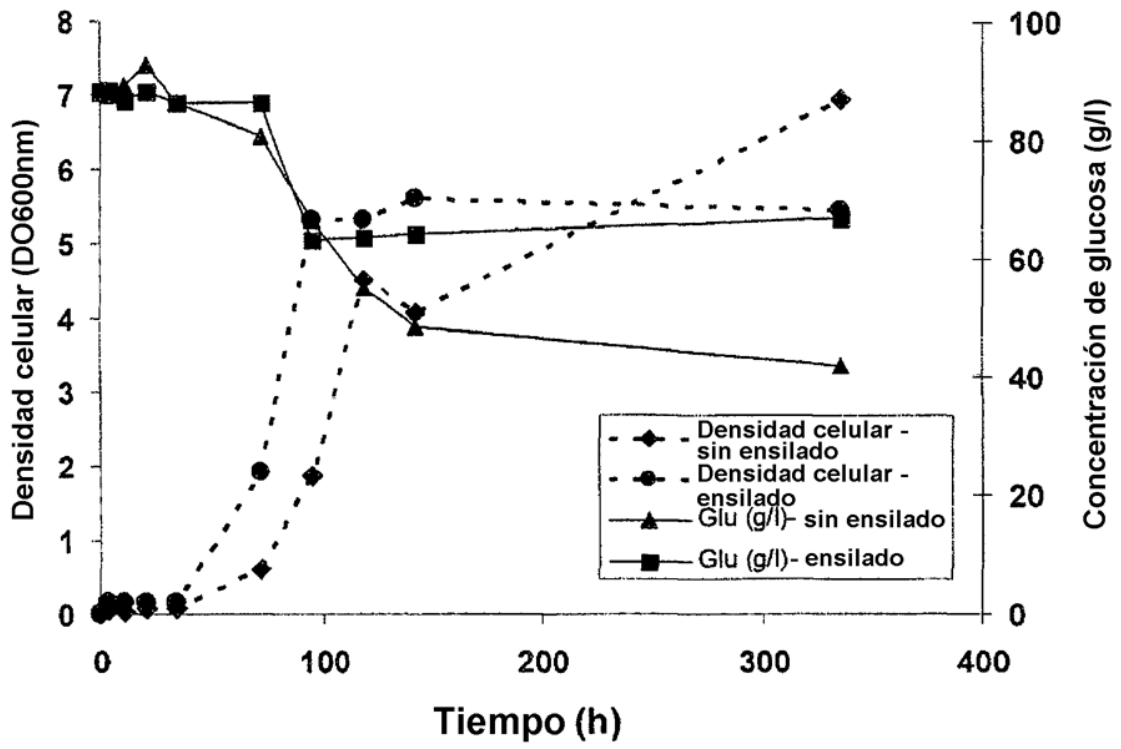


Fig. 3

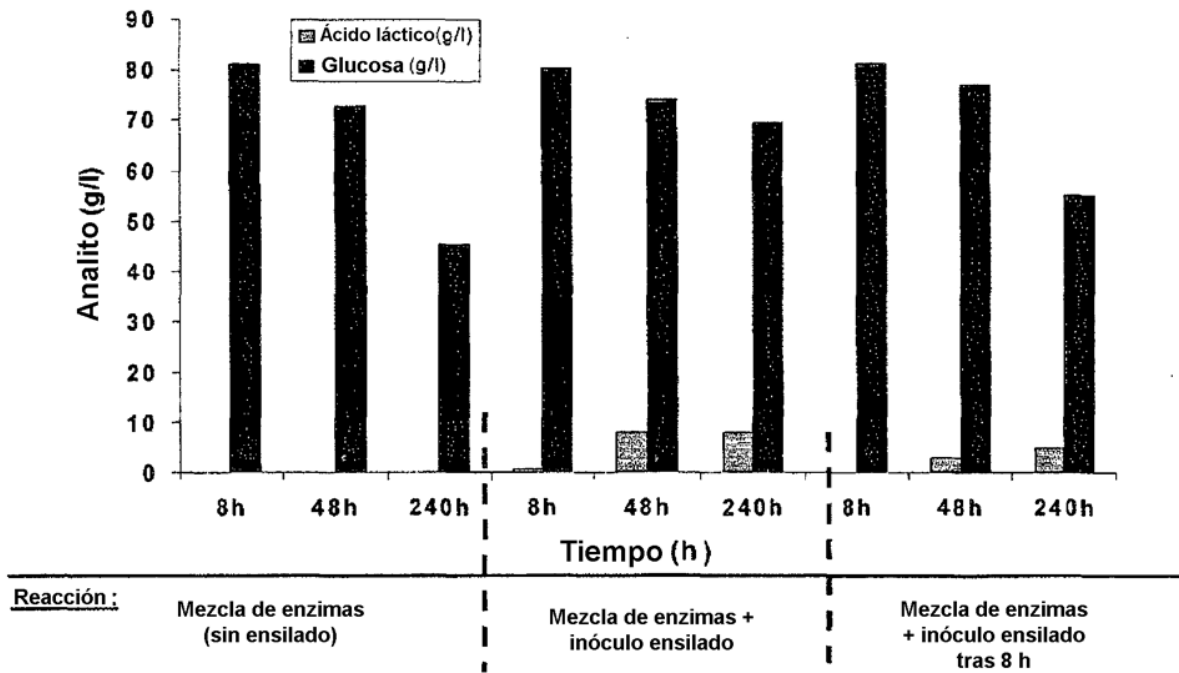


Fig. 4

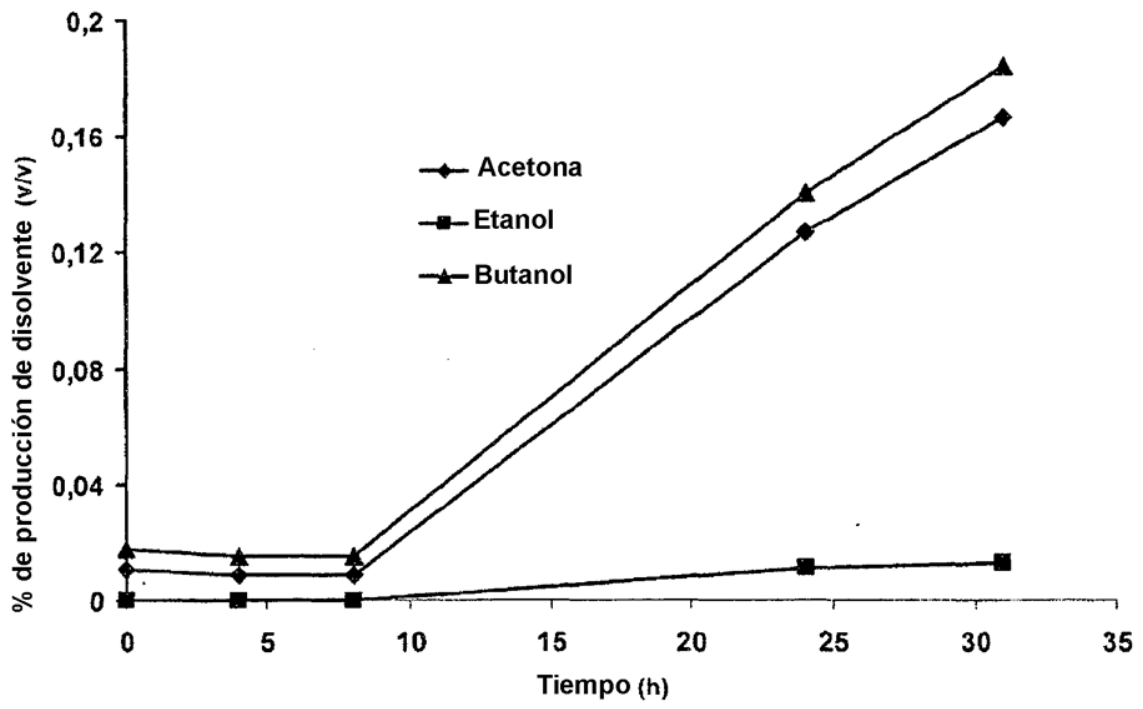


Fig.5

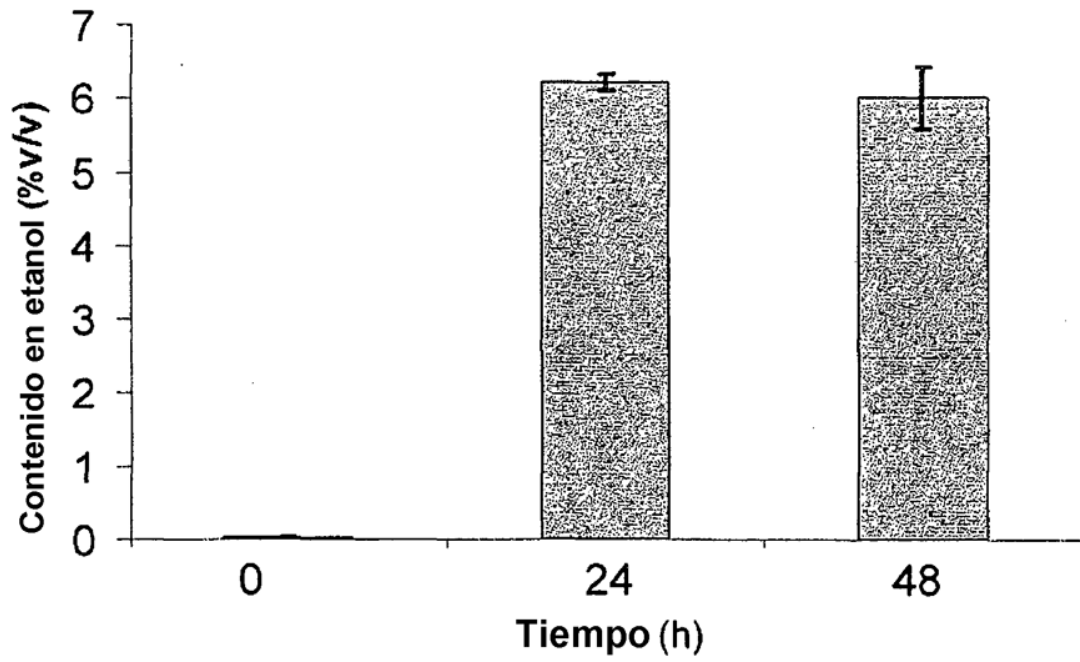


Fig. 6

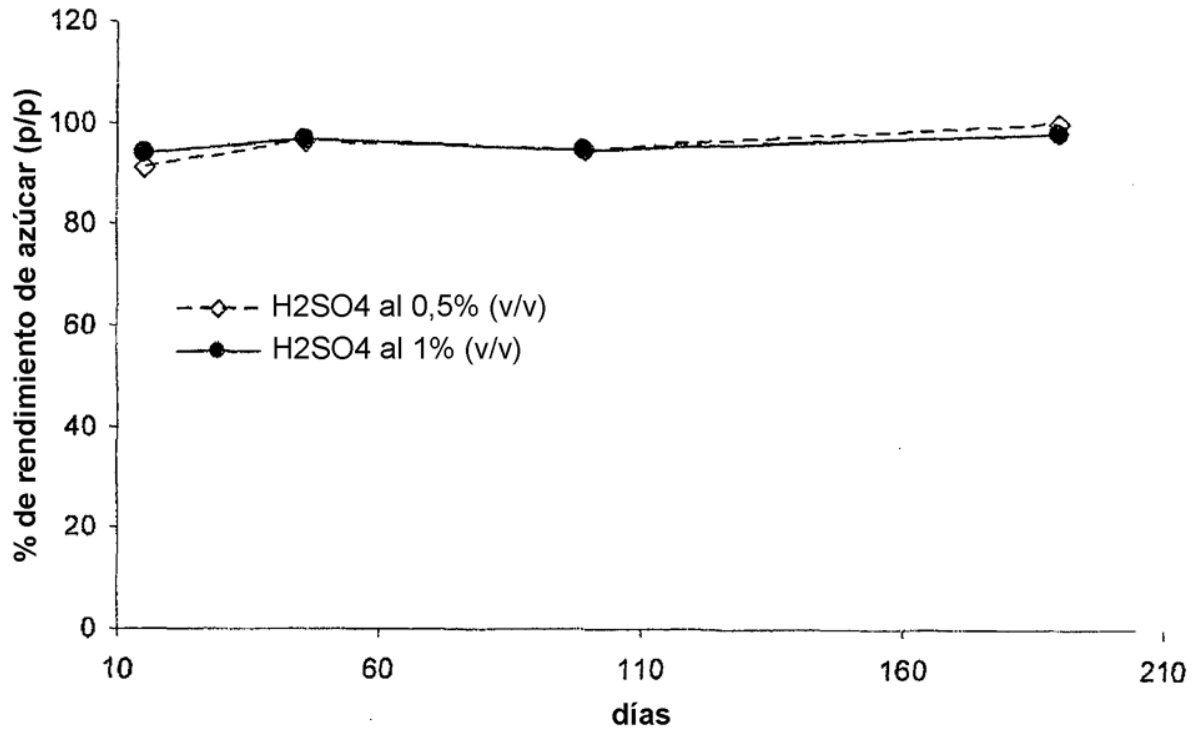


Fig. 7