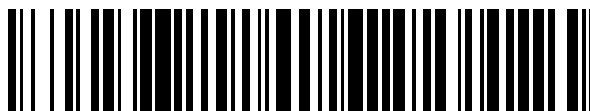


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 480 265**

51 Int. Cl.:

C12P 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2009 E 09743982 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2344650**

54 Título: **Mejora de la hidrólisis enzimática de material que contiene lignocelulosa pretratado con granos secos de destilería**

30 Prioridad:

30.09.2008 US 101450 P

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

25.07.2014

73 Titular/es:

**NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC. (100.0%)
77 Perry Chapel Church Road P.O. Box 576
Franklinton, NC 27525, US**

72 Inventor/es:

**LI, XIN y
HAAGENSEN, FRANK DROESCHER**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 480 265 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

Mejora de la hidrólisis enzimática de material que contiene lignocelulosa pretratado con granos secos de destilería

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] Se divulgan métodos para producir productos de fermentación de material que contiene lignocelulosa, y más particularmente, un método para aumentar la eficiencia de producir productos de fermentación de material que contiene lignocelulosa tratando el material con granos secos de destilería y/o granos secos de destilería con

10 solubles.

Los métodos incluyen pretratamiento con ácido y calentamiento a una temperatura en la gama de 160-220° C.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0002] El material que contiene lignocelulosa o biomasa, se puede utilizar para producir azúcares fermentables, que a su vez se pueden utilizar para producir productos de fermentación tales como combustibles renovables y productos químicos.

El material que contiene lignocelulosa es una estructura compleja de fibras celulósicas envuelto en una funda de lignina y hemicelulosa.

20 La producción de productos de fermentación de material que contiene lignocelulosa incluye tratamiento previo, hidrolización, y fermentación del material que contiene lignocelulosa.

[0003] La conversión de material que contiene lignocelulosa en combustibles renovables y productos químicos implica frecuentemente tratamiento físico, biológico, químico y enzimático de la biomasa con enzimas.

25 En particular, las enzimas hidrolizan celulosa a D-glucosa, que es un simple azúcar fermentable.

En el material que contiene lignocelulosa, se necesitan dosis altas de enzima para degradar la celulosa si se quieren obtener rendimientos altos porque se cree que la lignina y los derivados de lignina inhiben la(s) enzima(s) de la hidrolización de la celulosa.

30 Tal inhibición puede ocurrir al menos de dos maneras: la lignina o los derivados de lignina pueden preferentemente enlazar con la enzima previniendo así que la enzima se una, o la hidrolización de la celulosa, y/o la lignina o los derivados de lignina pueden cubrir partes de la celulosa reduciendo así el acceso de la enzima a la celulosa.

Consecuentemente, cuando se procesa la biomasa, algunas enzimas menores pueden estar disponibles para degradar celulosa debido a que la lignina o sus derivados pueden eliminar la enzima o bloquear su actividad.

35 Incluso para las enzimas que están disponibles para degradar la celulosa, la enzima disponible puede no ser capaz de contactar con la celulosa porque la lignina puede estar revistiendo la celulosa.

Así, la eficacia del proceso para digerir celulosa es reducida.

Además, los costes de las enzimas son altos.

Así, cuando la cantidad de enzimas necesitada para degradar la celulosa es alta, los costes del tratamiento son altos y económicamente irrealizables.

40 [0004] La reducción en la cantidad de enzima necesitada para obtener un rendimiento satisfactorio de azúcar puede tener un impacto significativo en la economía del proceso.

Por lo tanto, mejorar el uso de la eficiencia de la enzima es una necesidad mayor en el proceso de bioconversión.

Diferentes factores están pensados para influir en la hidrólisis enzimática de la celulosa.

45 Estos factores incluyen contenido de lignina, contenido de hemicelulosa, contenido de acetilo, superficie de celulosa y cristalinidad de celulosa.

En general se entiende que la lignina presente en sustratos complejos tiene un efecto negativo en la actividad enzimática.

50 [0005] El papel exacto de la lignina y los derivados de lignina en la hidrólisis limitadora ha sido difícil de definir.

No obstante, es conocido que la eliminación del efecto de la lignina y sus derivados aumenta la hidrólisis de celulosa y aumenta el rendimiento de azúcar fermentable.

Esta acción puede abrir más superficie de celulosa para el ataque enzimático y puede reducir la cantidad de enzima que no es específicamente adsorbida en el sustrato lignocelulósico.

55 Así, son deseables los compuestos que eliminan el efecto de lignina y sus derivados haciendo así la celulosa más accesible a la degradación enzimática.

[0006] Lau et al. *Biotechnology and Bioengineering*; Vol. 99, nº 3, 15 de febrero de 2008, págs. 529-539, se refiere a la fermentación etanólica de hidrolizados de rastrojos de maíz tratados de Expansión de Fibra de Amoníaco (AFEX, por sus siglas en inglés) y Grano de Destilería sin detoxificación ni suplementación nutriente externa.

60

[0007] Perkins et al (2008). *Bioresource Technology* 99, 2008, págs. 5243-5249, revela un proceso de etanol de molienda seca modificado con reciclaje de granos de destilería pretratados y enzimáticamente hidrolizados.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] Se describen métodos para producir productos de fermentación de material que contiene lignocelulosa por tratamiento previo y/o hidrolización del material en presencia de granos secos de destilería y/o granos secos de destilería con solubles.

[0009] En un aspecto la invención se refiere a métodos para producir un producto de fermentación de un material que contiene lignocelulosa, que comprende:

- (a) combinar material que contiene lignocelulosa y granos secos de destilería con solubles (DDG/S);
- (b) tratar previamente con ácido el material que contiene lignocelulosa combinado y DDG/S y tratarlo térmicamente a una temperatura en la gama de aproximadamente 160-220°C durante un periodo de 1-60 minutos;
- (c) exponer el ácido pretratado y el material tratado térmicamente que contiene lignocelulosa combinado y DDG/S a una o varias enzimas de hidrolización; y
- (d) fermentar con un organismo fermentador para producir un producto de fermentación, donde los DDG/S se introducen al material que contiene lignocelulosa en una cantidad de 4-48 p/p DDG/S/material que contiene lignocelulosa.

[0010] En otro aspecto la invención se refiere a métodos para aumentar la hidrólisis enzimática de un material que contiene lignocelulosa, que comprende:

- (a) introducir una cantidad de bloqueo de lignina eficaz de DDG/S al material que contiene lignocelulosa antes del pretratamiento con ácido y del tratamiento térmico a una temperatura en la gama de aproximadamente 160-220°C para un periodo de 1-60 minutos, y
- (b) exponer el material pretratado con ácido y tratado térmicamente que contiene lignocelulosa y DDG/S a una o varias enzimas de hidrolización donde los DDG/S se introducen al material que contiene lignocelulosa en una cantidad de 4-48 % p/p DDG/S/material que contiene lignocelulosa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0011]

Figura 1. Efecto de DDGs en la hidrólisis enzimática de rastrojos de maíz pretratados con ácido diluido con DDGs.
Figura 2. Efecto de DDGs en la conversión de celulosa de rastrojos de maíz pretratados con ácido diluido con DDGs.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0012] Se describe un método mejorado y más eficaz para la hidrolización enzimática de biomasa que contiene lignina usando granos secos de destilería con solubles (DDG/S).

En un aspecto la invención se refiere a métodos para producir un producto de fermentación de un material que contiene lignocelulosa, que comprende:

- (a) combinar material que contiene lignocelulosa y granos secos de destilería con solubles (DDG/S);
- (b) tratar previamente con ácido el material que contiene lignocelulosa combinada y DDG/S y tratar térmicamente a una temperatura en la gama de aproximadamente 160-220°C durante un periodo de 1-60 minutos;
- (c) exponer el material que contiene lignocelulosa combinado pretratado con ácido y tratado térmicamente y los DDG/S a una o varias enzimas de hidrolización; y
- (d) fermentar con un organismo fermentador para producir un producto de fermentación, donde los DDG/S se introducen al material que contiene lignocelulosa en una cantidad de 4-48 % p/p DDG/S/material que contiene lignocelulosa.

[0013] La lignina es un polímero fenólico que puede derivar de la polimerización deshidrogenativa de alcohol coniferílico y/o alcohol sinapílico y se encuentra en las paredes celulares de muchas plantas.

Como se utiliza en este caso, el término "lignina" se refiere a la estructura intacta del polímero de lignina al igual que cualquier fragmento derivado o compuesto del polímero intacto que resulta de la interrupción de la estructura de lignina, incluyendo derivados de lignina soluble, lignina condensada y lignina precipitada insoluble.

Se cree que los derivados de lignina interactúan con los DDG/S en una variedad de maneras.

Por ejemplo, la lignina insoluble puede directamente combinarse con los DDG/S y los derivados de lignina solubles producidos durante el pretratamiento se pueden adsorber por los DDG/S.

[0014] Como se utiliza en este caso, el término "compuesto acuoso de biomasa" se refiere al material de biomasa acuosa que sufre hidrólisis enzimática.

El compuesto acuoso de biomasa se produce mediante la mezcla de biomasa, por ejemplo, rastrojos de maíz, bagazo, etc., con agua, tampón, y otros materiales de pretratamiento.

El compuesto acuoso de biomasa se puede pretratar antes de la hidrólisis.

[0015] Como se utiliza en este caso, el término "bloqueo de lignina" se refiere a la reducción o eliminación de los efectos deletéreos de lignina en el proceso de biomasa de conversión a un producto de fermentación. Además, como se utiliza en este caso, el término "cantidad eficaz de bloqueo de lignina" se refiere a cualquier cantidad útil para facilitar el bloqueo de lignina.

5 [0016] El método de la invención utiliza DDG/S, que se cree que pueden preferentemente enlazar con la lignina más fácilmente que con la celulosa.

La lignina que contiene biomasa se puede mezclar con DDG/S, por ejemplo, mezclando DDG/S directamente con biomasa seca antes de que la biomasa sea tratada.

10 La biomasa combinada y los DDG/S pueden luego ser mezclados y pretratados juntos.

Se supone que los DDG/S pueden preferentemente enlazar con lignina en el compuesto acuoso combinado cubriendo así la lignina que se ha precipitado sobre la superficie de la celulosa, impidiendo así que la lignina precipitada se una a la enzima hidrolizante.

15 Se supone además que los DDG/S pueden ser capaces de absorber la lignina que no se ha precipitado sobre la superficie de celulosa.

Las enzimas hidrolizantes de celulosa pueden luego hidrolizar celulosa de forma más eficaz y rápida.

Sin el tratamiento de la biomasa que contiene lignina con DDG/S, la lignina puede enlazarse con una parte de las enzimas que hidrolizan celulosa dejando a estas incapaces de hidrolizar celulosa, o puede cubrir partes de la celulosa, dejando a esta inaccesible para las enzimas hidrolizantes.

20 [0017] Sin estar ligado a ninguna teoría particular, se cree que la lignina funciona de muchas maneras para inhibir a las enzimas de hidrolizar celulosa en la biomasa.

La lignina limita el grado al que la celulosa se puede convertir en azúcares monoméricos a través de enzimas hemicelulolíticas y celulolíticas.

25 El foco de muchas actividades de investigación ha estado dirigido a la comprensión de la naturaleza de lignina en paredes celulares y desarrollo de procesos de pretratamiento que son eficaces para su eliminación.

Comprendiendo el modo según el cual la lignina inhibe la actividad enzimática, es posible reducir los efectos perjudiciales generalmente provocados por lignina en la biomasa.

El material que contiene lignocelulosa o biomasa se puede pretratar con ácido antes de ser hidrolizado.

30 El pretratamiento con ácido altera químicamente el componente de lignina de la biomasa, formando derivados de lignina que incluyen lignina condensada que se precipita en la superficie de fibra de celulosa.

La lignina condensada puede evitar que las enzimas alcancen la celulosa a través del revestimiento de la superficie de fibra de celulosa.

35 Otros derivados de lignina formados durante el pretratamiento con ácido incluyen pequeños fragmentos que contienen fenol y compuestos que pueden inhibir la función enzimática.

[0018] Se cree además que el tratamiento de biomasa con DDG/S es eficaz, al menos en parte, a través de la unión de lignina, reduciendo así y/o inhibiendo la absorción de enzimas hidrolizantes a lignina.

40 El tratamiento de biomasa con DDG/S puede mejorar el procesamiento de sustratos que contienen lignina a través de la inhibición de enzimas y de la mejora de la actividad enzimática.

Los DDG/S pueden reducir la carga enzimática y/o mejorar el rendimiento enzimático debido a que las enzimas pueden no unirse a la lignina quedando así disponible para hidrolizar más eficazmente el sustrato de biomasa.

[0019] Se cree que el presente método reduce la carga enzimática en la hidrólisis de biomasa.

45 La cantidad de enzima que se necesita para proporcionar hidrólisis es significativamente reducida a través del tratamiento de la biomasa con DDG/S.

La reducción en la carga enzimática reduce los costes totales de los procesos de conversión de biomasa.

50 [0020] La invención también se refiere a métodos para reforzar la hidrólisis enzimática de un material que contiene lignocelulosa, que comprende:

(a) introducir una cantidad de DDG/S de bloqueo de lignina eficaz al material que contiene lignocelulosa antes del pretratamiento con ácido y del tratamiento térmico a una temperatura en la gama de aproximadamente 160-220°C durante un periodo de 1-60 minutos, y

55 (b) exponer el material pretratado con ácido y tratado térmicamente que contiene lignocelulosa y los DDG/S a una o varias enzimas hidrolizantes donde los DDG/S se introducen al material que contiene lignocelulosa en una cantidad de 4-48 % p/p DDG/S/material que contiene lignocelulosa.

[0021] Como se indica, se contempla que los DDG/S se pueden adicionar a biomasa seca.

60 La biomasa combinada y los DDG/S pueden luego ser mezclados y pretratados juntos.

La mezcla de biomasa pretratada y combinada puede luego ser lavada para ayudar en la eliminación de lignina soluble.

La mezcla de biomasa lavada puede luego ser expuesta a la enzima hidrolizante.

Típicamente, cualquier aditivo de bloqueo de lignina se añade después del pretratamiento.

65 El aditivo de bloqueo de lignina se pretrata separadamente de la mezcla de biomasa dando así como resultado dos procesos de pretratamiento, uno para la biomasa y uno para el aditivo.

Así, es ventajoso añadir DDG/S a la biomasa seca antes de la mezcla y del pretratamiento debido a que la biomasa y los DDG/S se pueden pretratar juntos eliminando así la necesidad de un paso de pretratamiento para la biomasa y DDG/S separadamente.

5 Granos secos de destilería con o sin solubles (DDG/S)

[0022] Los granos secos de destilería con o sin solubles (DDG/S) son un coproducto de las industrias de destilería. La mayoría de DDG/S en Norteamérica vienen de plantas que producen etanol para combustibles oxigenados, y la parte restante de DDG/S es producida por la industria de bebidas alcohólicas.

10 [0023] Los granos secos de destilería con o sin solubles son el residuo seco restante después de que la fracción de almidón de maíz se fermenta con levaduras seleccionadas y enzimas para producir alcohol y dióxido de carbono. Después de la fermentación completa, el alcohol se quita por destilación y los residuos de fermentación restantes son secados.

15 [0024] Una tercera parte del grano que va a la producción de etanol sale como DDG/S. Generalmente cada fanega de grano usada en el proceso de fabricación de etanol produce aproximadamente 2,7 galones (10,2 litros) de etanol; aproximadamente 18 libras (8,2 kg) de DDG/S, y aproximadamente 18 libras (8,2 kg) de dióxido de carbono.

20 [0025] Los DDG/S se usan como pienso para animales. Es rico en cereal y proteínas de levadura residual, energía, minerales y vitaminas. Es una proteína digerible excelente y fuente de energía para ganado bovino. Puede también usarse en aplicaciones para pavo y puerco.

25 Los DDG/S generalmente comprenden aproximadamente 30 % de proteína cruda, aproximadamente 10 % de grasa, aproximadamente 6 % de fibra, y aproximadamente 50 % de carbohidratos.

[0026] Los DDG/S son además económicamente ventajosos para el proceso de bioconversión porque además de que la celulosa del material que contiene lignocelulosa es hidrolizada de forma más eficaz en azúcares fermentables, una parte de los DDG/S se puede convertir en glucosa.

30 Así, además de contribuir indirectamente al rendimiento de azúcar a través de la inhibición de los efectos perjudiciales de lignina, los DDG/S directamente contribuyen al rendimiento de azúcar a través de la conversión del componente de carbohidrato.

35 Se contempla que la amilasa se puede adicionar a la mezcla de biomasa después de cierto periodo de hidrólisis, por ejemplo, después de 72 horas de hidrólisis, para convertir los carbohidratos en DDG/S a glucosa, especialmente donde los métodos de pretratamiento ácido han sido empleados.

Una ventaja económica adicional para utilizar DDG/S es que el pretratamiento de DDG/S produce la liberación de polipéptidos.

40 Determinados organismos fermentadores tales como la levadura requieren nitrógeno adecuado para su propagación y fermentación.

Los polipéptidos liberados de los DDG/S pueden proporcionar el nitrógeno requerido de manera que otra fuente exógena no sea necesaria.

45 [0027] Como se ha indicado previamente, un beneficio adicional de utilizar DDG/S es que se pueden adicionar a biomasa seca antes de la mezcla y pretratamiento.

Anteriormente un paso de pretratamiento extra para el aditivo de DDG/S es económicamente ventajoso en el proceso de conversión de biomasa.

50 [0028] Se prevé que mezclar primero la biomasa seca con DDG/S, después de mezclar y pretratar la mezcla, y luego añadir enzima hidrolizante de celulosa a la mezcla, proporciona la máxima eficiencia en la conversión de celulosa.

Debido a que los DDG/S comprenden carbohidratos ellos mismos pueden ser hidrolizados, es posible hidrolizar una parte misma de los DDG/S, aumentando así la producción de azúcar.

Tratar la biomasa con DDG/S produce un rendimiento de hidrólisis de celulosa que se puede medir como mejora del porcentaje en el rendimiento de azúcar final o índice de conversión de celulosa.

55 Como ejemplo, una mejora aproximadamente del 12 % en el rendimiento final de azúcar se puede obtener en comparación con el rendimiento de hidrólisis de celulosa de una mezcla de biomasa que no se ha tratado con DDG/S.

60 Además, por medio de otro ejemplo, una mejora aproximadamente del 12 % en el índice de conversión de celulosa se puede obtener en comparación con el rendimiento de hidrólisis de celulosa de una mezcla de biomasa que no se trata con DDG/S.

[0029] Sin estar ligado a ninguna teoría en particular, se cree que la unión no específica de DDG/S a la lignina puede reducir la unión improductiva de enzimas a superficies de lignina o a la inhibición de la actividad enzimática debido a interacciones con lignina.

65 Así, el uso de DDG/S en un proceso para la conversión de lignocelulosa facilita ventajosamente una reducción del nivel de carga enzimática para conseguir el mismo porcentaje objetivo de conversión.

Material que contiene lignocelulosa

[0030] "Lignocelulosa" o "material que contiene lignocelulosa" se refiere principalmente a un material formado por la celulosa, hemicelulosa, y lignina.

5 Tal material es frecuentemente denominado "biomasa".

[0031] La biomasa es una estructura compleja de fibras celulósicas envueltas en una funda de lignina y hemicelulosa.

La estructura de biomasa es de tal manera que no es susceptible a hidrólisis enzimática.

10 Para mejorar la hidrólisis enzimática, la biomasa tiene que ser pretratada, por ejemplo, a través de hidrólisis ácida bajo condiciones adecuadas de presión y temperatura, para romper el sello de lignina, sacarificar y solubilizar la hemicelulosa, y disgregar la estructura cristalina de la celulosa.

15 La celulosa puede después ser hidrolizada enzimáticamente, por ejemplo, a través de tratamiento enzimático celulolítico, para convertir los polímeros de carbohidrato en azúcares fermentables que se pueden fermentar en un producto de fermentación deseado, tal como etanol.

Los tratamientos de enzima hemicelulolítica también se pueden emplear para hidrolizar cualquier hemicelulosa restante en la biomasa pretratada.

[0032] La biomasa puede ser cualquier material que contenga lignocelulosa.

20 En una forma de realización preferida, la biomasa contiene al menos aproximadamente 30 % en peso, preferiblemente al menos aproximadamente 50 % en peso, más preferiblemente al menos aproximadamente 70 % en peso, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 90 % en peso de lignocelulosa.

Debe entenderse que la biomasa también puede comprender otros constituyentes tales como material proteínico, almidón y azúcares tales como azúcares no fermentables o fermentables o mezclas derivadas.

25 [0033] La biomasa es generalmente encontrada, por ejemplo, en los tallos, hojas, cascotes, cáscaras, y mazorcas de plantas u hojas, ramas, y madera de árboles.

La biomasa incluye, pero no está limitada a ello, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos de silvicultura, residuos sólidos municipales, desechos de papel, y residuos de fábrica de papel y pulpa.

30 Debe entenderse que la biomasa puede ser en forma de material de pared celular vegetal que contiene lignina, celulosa, y hemicelulosa en una matriz mezclada.

[0034] Otros ejemplos de biomasa adecuados incluyen fibra de maíz, paja de arroz, madera de pino, astillas de madera, bagazo, residuos de tratamiento de papel y pulpa, rastrojo de maíz, mazorcas de maíz, madera dura como de álamo y abedul, madera blanda, paja de cereal como paja de trigo, paja de arroz, brote de hierba, Miscanthus, cáscara de arroz, residuos sólidos municipales (MSW, por sus siglas en inglés), residuos orgánicos industriales, papel de oficina, o mezclas derivadas.

40 [0035] En una forma de realización preferida, la biomasa es seleccionada de uno o varios de rastrojos de maíz, mazorcas de maíz, fibra de maíz, paja de arroz, brote de hierba, y bagazo.

Pretratamiento

45 [0036] Conforme a la presente invención, el pretratamiento con ácido puede incluir la introducción de DDG/S o un compuesto similar a la biomasa seca antes de hacerla acuosa o de que se considere un pretratamiento convencional.

[0037] El pretratamiento se realiza antes de la hidrólisis o fermentación.

50 El objetivo del pretratamiento es separar o liberar la celulosa, hemicelulosa y lignina, mejorando así el índice o la eficiencia de la hidrólisis.

El paso de pretratamiento ácido puede incluir un paso donde los DDG/S se agregan a la biomasa.

Como se ha indicado previamente, la biomasa está típicamente en una forma seca cuando los DDG/S son agregados.

55 La biomasa combinada con los DDG/S es luego sometida a una mezcla convencional y pretratamiento con ácido. Además comprende un tratamiento térmico.

Los DDG/S se agregan en una cantidad de aproximadamente 4-48 % en peso de biomasa seca.

60 La biomasa puede estar presente durante el pretratamiento en una cantidad entre aproximadamente 10-80 % en peso, preferiblemente entre aproximadamente 20-70 % en peso, especialmente entre aproximadamente 30-60 % en peso, tal como alrededor de aproximadamente 50 % en peso. De acuerdo con la invención, el pretratamiento es un tratamiento ácido, más preferiblemente, un diluido continuo o tratamiento de ácido suave como el tratamiento con ácido sulfúrico, u otro ácido orgánico tal como el ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, cloruro de hidrógeno o mezclas derivadas.

Otros ácidos también pueden ser usados.

65 El tratamiento de ácido moderado significa que el pH del tratamiento se extiende en la gama de alrededor de pH 1-5, preferiblemente aproximadamente de pH 1-3.

En una forma de realización específica la concentración ácida está en la gama de 0,1 a 2,0 % en peso de ácido y es

preferiblemente ácido sulfúrico.

El ácido puede estar en contacto con la biomasa y la mezcla se puede detener a una temperatura en la gama de aproximadamente 160-220 °C, como aproximadamente 165-195 °C, para periodos que varían de minutos a segundos, por ejemplo, 1-60 minutos, como 2-30 minutos o 3-12 minutos.

5 La adición de ácidos fuertes tales como el ácido sulfúrico se pueden aplicar para eliminar hemicelulosa. La adición de ácidos fuertes realiza la digestibilidad de celulosa.

[0038] El paso de pretratamiento con ácido puede implicar tratamiento con ácido diluido o moderado y tratamiento con alta temperatura y/o presión.

10 Los tratamientos previos se pueden realizar consecutivamente o simultáneamente, como se desee.

[0039] En una forma de realización preferida el pretratamiento se realiza como un paso de pretratamiento con ácido diluido o moderado.

15 Hidrólisis

[0040] Antes de que la biomasa pretratada con ácido, preferiblemente en forma de compuesto acuoso de biomasa, sea fermentada se puede hidrolizar para descomponer celulosa y hemicelulosa en azúcares fermentables.

20 En una forma de realización preferida, el material pretratado es hidrolizado, preferiblemente enzimáticamente, antes de la fermentación.

[0041] El contenido de sustancias secas durante la hidrólisis puede estar en la gama de aproximadamente 5-50 % en peso, preferiblemente aproximadamente 10-40 % en peso, preferiblemente aproximadamente 20-30 % en peso.

25 La hidrólisis en una forma de realización preferida puede efectuarse como un proceso de flujo continuo donde la biomasa pretratada (es decir, el sustrato) se alimenta gradualmente a, por ejemplo, una solución de hidrólisis que contiene enzima.

[0042] En una forma de realización preferida la hidrólisis se realiza enzimáticamente.

30 Según la invención, el compuesto acuoso de biomasa pretratada se puede hidrolizar a través de una o varias enzimas celulolíticas, tales como celulasas o hemicelulasas, o combinaciones de las mismas.

[0043] En una forma de realización preferida, la hidrólisis se realiza usando una preparación enzimática celulolítica que comprende uno o varios polipéptidos con actividad de aumento celulolítico.

35 En una forma de realización preferida, el(los) polipéptido(s) con actividad de aumento celulolítico es de origen de la familia GH61A.

Ejemplos de preparaciones enzimáticas celulolíticas preferidas y adecuadas y de polipéptidos con actividad de aumento celulolítico son descritos en la sección más abajo "Enzimas Celulolíticas".

[0044] Como la biomasa puede contener constituyentes además de la lignina, celulosa y hemicelulosa, la hidrólisis y/o fermentación se puede realizar en presencia de actividades enzimáticas adicionales tales como la actividad de la proteasa, la actividad de la amilasa, la actividad enzimática generadora de carbohidrato, y la actividad de esterasa tal como la actividad de lipasa.

45 [0045] La hidrólisis enzimática es preferiblemente realizada en un entorno acuoso adecuado bajo condiciones que pueden fácilmente ser determinadas por un experto en la materia. En una forma de realización preferida, la hidrólisis se realiza en condiciones adecuadas, preferiblemente óptimas, para la(s) enzima(s) en cuestión.

[0046] El tiempo de proceso adecuado, la temperatura y las condiciones de pH pueden ser determinadas rápidamente por un experto en la materia. Preferiblemente, la hidrólisis se realiza a una temperatura entre 25 y 70 °C, preferiblemente entre 40 y 60 °C, especialmente alrededor de 50 °C.

50 La hidrólisis es preferiblemente realizada con un pH en la gama de pH 3-8, preferiblemente pH 4-6, especialmente alrededor de pH 5.

Además, la hidrólisis es típicamente realizada entre 12 y 96 horas, preferiblemente entre 16 y 72 horas, más preferiblemente entre 24 y 48 horas.

55 Fermentación

[0047] Los azúcares fermentables de biomasa pretratada y/o hidrolizada pueden ser fermentados por uno o varios organismos de fermentación capaces de fermentar azúcares, tales como glucosa, xilosa, manosa y galactosa directa o indirectamente en un producto de fermentación deseado.

60 Las condiciones de fermentación dependen del producto de fermentación deseado y organismo fermentador y pueden ser determinadas fácilmente por uno de los técnicos en la materia.

[0048] Especialmente en el caso de fermentación de etanol, la fermentación puede estar en curso durante 1-48 horas, preferiblemente 1-24 horas.

65 En una forma de realización, la fermentación se realiza a una temperatura aproximadamente entre 20 y 40 °C,

preferiblemente aproximadamente 26 y 34 °C, en particular alrededor de 32 °C.

En una forma de realización, el pH es mayor que 5.

En otra forma de realización, el pH es de alrededor de pH 3-7, preferiblemente 4-6.

5 No obstante, por ejemplo, algunos organismos de fermentación bacterianos tienen una temperatura óptima de fermentación más alta.

Por lo tanto, en una forma de realización, la fermentación se realiza a una temperatura aproximadamente entre 40-60 °C, tal como 50-60 °C.

El experto en la materia puede determinar fácilmente las condiciones de fermentación adecuada.

10 [0049] La fermentación puede llevarse a cabo en un lote, lote de alimentación, o reactor continuo.

La fermentación de lote de alimentación se puede fijar por un lote de alimentación con volumen o con volumen variable.

En una forma de realización, se emplea la fermentación de lote de alimentación.

15 El volumen y el índice de fermentación de lote de alimentación depende, por ejemplo, del organismo fermentador, de la identidad y de la concentración de azúcares fermentables, y del producto de fermentación deseado.

Tales índices de fermentación y volúmenes pueden ser determinados rápidamente por uno de los técnicos en la materia.

20 SSF, HHF y SHF

[0050] La hidrólisis y fermentación se pueden realizar como un paso simultáneo de hidrólisis y de fermentación (SSF).

En general, esto significa que la hidrólisis y fermentación combinada/simultánea se realizan en condiciones (p. ej., temperatura y/o pH) adecuadas, preferiblemente óptimas, para el(los) organismo(s) de fermentación en cuestión.

25 [0051] El paso de hidrólisis y el de fermentación se pueden realizar como hidrólisis híbrida y fermentación (HHF). La HHF típicamente empieza con un paso de hidrólisis parcial separado y termina con un paso de hidrólisis y de fermentación simultáneo.

El paso de hidrólisis parcial separado es un paso de sacarificación de celulosa enzimática típicamente realizado en

30 condiciones (p. ej., a temperaturas más altas) adecuadas, preferiblemente óptimas, para la(s) enzima(s) de hidrólisis en cuestión.

El paso simultáneo posterior de hidrólisis y de fermentación es típicamente realizado en condiciones adecuadas para el(los) organismo(s) de fermentación (frecuentemente a temperaturas inferiores al paso de hidrólisis separado).

35 [0052] El paso de hidrólisis y de fermentación también se puede realizar como hidrólisis y fermentación separadas, donde la hidrólisis se lleva hasta la finalización antes de la iniciación de la fermentación.

Frecuentemente se denomina "SHF".

40 Recuperación

[0053] Después de la fermentación, el producto de fermentación puede opcionalmente ser separado del medio de fermentación de cualquier manera adecuada.

Por ejemplo, el medio se puede destilar para extraer el producto de fermentación, o el producto de fermentación puede ser extraído del medio de fermentación por técnicas de micro filtración o de filtración de membrana.

45 Alternativamente, el producto de fermentación se puede recuperar por desorción.

En la técnica se conocen bien los métodos de recuperación.

Productos de fermentación

50 [0054] La presente invención se puede utilizar para producir cualquier producto de fermentación.

Los productos de fermentación preferidos incluyen alcoholes (p. ej., etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (p. ej., ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico); cetonas (p. ej., acetona); aminoácidos (p. ej., ácido glutámico); gases (p. ej., H₂ y CO₂); antibióticos (p. ej., penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (p. ej., riboflavina, B12, beta-caroteno); y hormonas.

55 [0055] Otros productos incluyen productos de la industria del alcohol consumible, por ejemplo, cerveza y vino; productos de la industria lechera, por ejemplo, productos lácteos fermentados; productos de la industria del cuero y productos de la industria del tabaco.

En una forma de realización preferida, el producto de fermentación es un alcohol, especialmente etanol.

60 El producto de fermentación, tal como etanol, obtenido según la invención, puede preferiblemente usarse como alcohol/etanol combustible.

No obstante, en el caso del etanol, también se puede usar como etanol potable.

Organismo fermentador

65 [0056] La frase "organismo fermentador" se refiere a cualquier organismo, incluyendo organismos fúngicos y

bacterianos, adecuados para producir un producto de fermentación deseado.

El organismo fermentador pueden ser organismos fermentadores C6 o C5, o una combinación de los mismos.

Ambos organismos de fermentación C6 y C5 se conocen bien en la técnica.

5 [0057] Organismos fermentadores adecuados son capaces de fermentar, es decir, convertir, azúcares fermentables, tales como glucosa, fructosa, maltosa, xilosa, manosa y/o arabinosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado.

[0058] Ejemplos de organismos fermentadores incluyen organismos fúngicos tales como la levadura.

10 La levadura preferida incluye cepas del género *Saccharomyces*, en particular cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces uvarum*; una cepa de *Pichia*, preferiblemente *Pichia stipitis* como *Pichia stipitis* CBS 5773 o *Pichia pastoris*; una cepa del género *Candida*, en particular una cepa de *Candida utilis*, *Candida arabinofermentans*, *Candida diddensii*, *Candida sonorensis*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis* o *Candida boidinii*.

15 Otros organismos de fermentación incluyen cepas de *Hansenula*, en particular de *Hansenula polymorpha* o *Hansenula anomala*; *Kluyveromyces*, en particular *Kluyveromyces fragilis* o *Kluyveromyces marxianus*; y *Schizosaccharomyces*, en particular *Schizosaccharomyces pombe*.

[0059] Los organismos de fermentación bacteriana preferidos incluyen cepas de *Escherichia*, en particular *Escherichia coli*, cepas de *Zymomonas*, en particular *Zymomonas mobilis*, cepas de *Zymobacter*, en particular *Zymobacter palmae*, cepas de *Klebsiella*, en particular *Klebsiella oxytoca*, cepas de *Leuconostoc*, en particular *Leuconostoc mesenteroides*, cepas de *Clostridium*, en particular *Clostridium butyricum*, cepas de *Enterobacter*, en particular *Enterobacter aerogenes* y cepas de *Thermoanaerobacter*, en particular *Thermoanaerobacter* BG1L1 (Appl. Microbiol. Biotech. 77: 61-86) y *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum*, o *Thermoanaerobacter mathranii*.

20 Las cepas de *Lactobacillus* son también previstas como lo son las cepas de *Corynebacterium glutamicum* R, *Bacillus thermoglucosidasius*, y *Geobacillus thermoglucosidasius*.

[0060] En una forma de realización el organismo fermentador es un organismo fermentador de azúcar C6, como una cepa, por ejemplo, de *Saccharomyces cerevisiae*.

30 [0061] En relación con los materiales derivados de la fermentación de lignocelulosa, se contemplan organismos de fermentación de azúcar C5.

La mayoría de organismos de fermentación de azúcar C5 también fermentan azúcares C6.

35 Los ejemplos de organismos de fermentación de azúcar C5 incluyen cepas de *Pichia*, tales como la especie *Pichia stipitis*.

Las bacterias fermentadoras de azúcar C5 son también conocidas.

También algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* fermentan azúcares C5 (y C6).

40 Los ejemplos son cepas genéticamente modificadas de *Saccharomyces spp.* que son capaces de fermentar azúcares C5 incluidos aquellos nombrados en, por ejemplo, Ho et al., 1998, Applied and Environmental Microbiology, págs. 1852-1859 y Karhumaa et al., 2006, Microbial Cell Factories 5:18, y Kuyper et al., 2005, FEMS Yeast Research 5, págs. 925-934.

[0062] El rendimiento fermentativo de ciertos organismos fermentadores se puede inhibir a través de la presencia de inhibidores en los medios de fermentación y reducir así la capacidad de producción de etanol.

45 Los compuestos en hidrosilatos de biomasa y concentraciones altas de etanol se conocen por inhibir la capacidad fermentativa de determinadas células de levadura.

La preadaptación o los métodos de adaptación pueden reducir este efecto inhibitorio.

50 Típicamente la preadaptación o la adaptación de células de levadura implican el crecimiento secuencial de células de levadura, antes de la fermentación, para aumentar el rendimiento fermentativo de la levadura y la producción de etanol.

Los métodos de preadaptación y adaptación de la levadura se conocen en la materia. Tales métodos pueden incluir, por ejemplo, el crecimiento de las células de levadura en presencia de hidrolizados de biomasa cruda; el crecimiento de células de levadura en presencia de inhibidores tales como compuestos fenólicos, furaldehídos y ácidos orgánicos; el crecimiento de células de levadura en presencia de cantidades no inhibitorias de etanol; y complementación de los cultivos de levadura con acetaldheído.

55 En una forma de realización, el organismo fermentador es una cepa de levadura sujeta a uno o varios métodos de preadaptación o de adaptación antes de la fermentación.

[0063] Determinados organismos fermentadores tales como la levadura requieren una fuente adecuada de nitrógeno para la propagación y fermentación.

Muchas fuentes de nitrógeno se pueden usar y tales fuentes de nitrógeno se conocen en la materia. En una forma de realización, se usa una fuente de coste bajo de nitrógeno.

60 Tales fuentes de bajo coste pueden ser orgánicas, tales como urea, DDGs, sedimento húmedo o trituración de maíz, o inorgánicas, tales como amoníaco o hidróxido amónico.

65 [0064] La levadura disponible comercialmente adecuada para la producción de etanol incluye, por ejemplo, levadura

ETHANOL RED™ (disponible en Fermentis/Lesaffre, EEUU), FALI™ (disponible en Fleischmann's Yeast, EEUU), levadura fresca SUPERSTART y THERMOSACC™ (disponible en Ethanol Technology, WI, EEUU), BIOFERM AFT y XR (disponible en NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, EEUU), GERT STRAND (disponible en Gert Strand AB, Suecia), y FERMIOL (disponible en DSM Specialties).

Enzimas

[0065] Aunque no está específicamente mencionado en el contexto de un método o proceso de la invención, debe entenderse que la(s) enzima(s), al igual que otros compuestos, se usan en una cantidad eficaz.

Una o varias enzimas pueden ser utilizadas.

[0066] La frase "actividad celulolítica" como se utiliza en este caso se entiende como enzimas con actividad de celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91), por ejemplo, celobiohidrolasa I y celobiohidrolasa II, al igual que actividad de endoglucanasa (EC 3.2.1.4) y actividad de beta-glucosidasa (EC 3.2.1.21).

[0067] La actividad celulolítica puede, en una forma de realización preferida, tener la forma de una preparación de enzimas de origen fúngico, como de una cepa del género *Trichoderma*, preferiblemente una cepa de *Trichoderma reesei*; una cepa del género *Humicola*, como una cepa de *Humicola insolens*; o una cepa de *Chrysosporium*, preferiblemente una cepa de *Chrysosporium lucknowense*.

[0068] La preparación enzimática celulolítica puede contener una o más de las siguientes actividades: enzima, semienzima, actividad de aumento de enzima celulolítica, actividad de beta-glucosidasa, endoglucanasa, celobiohidrolasa, o xilosa isomerasa.

[0069] La enzima puede ser una composición tal y como se define en PCT/US2008/065417.

Por ejemplo, la preparación enzimática celulolítica comprende un polipéptido con actividad de aumento celulolítico, preferiblemente un polipéptido de la familia GH61A, preferiblemente el descrito en WO 2005/074656 (Novozymes).

La preparación enzimática celulolítica puede comprender además una beta-glucosidasa, tal como una beta-glucosidasa derivada de una cepa del género *Trichoderma*, *Aspergillus* o *Penicillium*, incluyendo la proteína de fusión con actividad de beta-glucosidasa descrita en WO 2008/057637.

La preparación enzimática celulolítica también puede comprender una enzima CBH 11, preferiblemente *Thielavia terrestris* celobiohidrolasa II CEL6A.

La preparación enzimática celulolítica también puede comprender enzimas celulolíticas, preferiblemente una derivada de *Trichoderma reesei* o *Humicola insolens*.

[0070] La preparación enzimática celulolítica también puede comprender un polipéptido con actividad de aumento celulolítico (GH61A) descrito en WO 2005/074656; una beta-glucosidasa (proteína de fusión descrita en WO 2008/057637) y enzimas celulolíticas derivadas de *Trichoderma reesei*.

[0071] La enzima celulolítica puede ser el producto disponible comercialmente CELLUCLAST® 1,5 L o CELLUZYME™ disponible en Novozymes A/S, Dinamarca o ACCELERASE™ 1000 (de Genencor Inc., USA).

[0072] Una enzima celulolítica se puede adicionar para hidrolizar el compuesto acuoso de biomasa pretratado.

La enzima celulolítica se puede dosificar en la gama de 0,1-100 FPU por gramo de sólidos totales (TS), preferiblemente 0,5-50 FPU por gramo de TS, especialmente 1-20 FPU por gramo de TS.

En otra forma de realización, al menos 0,1 mg de enzima celulolítica por gramo de sólidos totales (TS), preferiblemente al menos 3 mg de enzima celulolítica por gramo de TS, como entre 5 y 10 mg de enzima(s) celulolítica(s) por gramo de TS es(son) usada(s) para la hidrólisis.

Endoglucanasa (EG)

[0073] Una o varias endoglucanasas pueden estar presentes durante la hidrólisis.

El término "endoglucanasa" se refiere a una endo-1,4-(1,3,1,4)-beta-D-glucan 4-glucanohidrolasa (E.C. nº 3.2.1.4), que cataliza endo-hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glicosídicos en la celulosa, derivados químicos de la celulosa (tales como carboximetilcelulosa e hidroxietilcelulosa), liquenina, enlaces beta-1,4 en glucanos mezclados beta-1,3, tales como glucanos beta-D de cereal o xiloglucanos, y otro material vegetal que contiene componentes celulósicos. La actividad de endoglucanasa se puede determinar usando hidrólisis de carboximetilcelulosa (CMC) según el procedimiento de Ghose, 1987, Pure and Appl. Chem. 59: 257-268.

[0074] Las endoglucanasas pueden derivar de una cepa del género *Trichoderma*, preferiblemente una cepa de *Trichoderma reesei*; una cepa del género *Humicola*, como una cepa de *Humicola insolens*; o una cepa de *Chrysosporium*, preferiblemente una cepa de *Chrysosporium lucknowense*.

Celobiohidrolasa (CBH)

[0075] Una o varias celobiohidrolasas pueden estar presentes durante la hidrólisis.

El término "celobiohidrolasa" se refiere a una celobiohidrolasa 1,4-beta-D-glucano (E.C. 3.2.1.91), que cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en la celulosa, celooligosacáridos, o cualquier polímero que contiene glucosa enlazada en beta-1,4, que libera celobiosa de las extremidades reducidas o no reducidas de la cadena.

5 [0076] Los ejemplos de celobiohidrolasas se mencionan arriba incluyendo CBH I y CBH II de *Trichoderma reesei*; *Humicola insolens* y CBH II de celobiohidrolasa *Thielavia terrestris* (CELL6A).

[0077] La actividad de celobiohidrolasa se puede determinar según los procedimientos descritos por Lever et al., 1972, Anal. Biochem. 47: 273-279 y por van Tilbeurgh et al., 1982, FEBS Letters 149: 152-156; van Tilbeurgh and Claeysens, 1985, FEBS Letters 187: 283-288.

10 El método de Lever et al. es adecuado para evaluar la hidrólisis de celulosa en rastrojos de maíz y el método de van Tilbeurgh et al. es adecuado para determinar la actividad de celobiohidrolasa en un derivado disacárido fluorescente.

Beta-glucosidasa

15 [0078] Una o varias beta-glucosidasas pueden estar presentes durante la hidrólisis.

El término "beta-glucosidasa" se refiere a una beta-D-glucósido glucohidrolasa (E.C. 3.2.1.21), que cataliza la hidrólisis de residuos terminales no reductores de beta-D-glucosa con la liberación de beta-D-glucosa.

20 Para fines de la presente invención, la actividad de beta-glucosidasa se determina según el procedimiento básico descrito por Venturi et al., 2002, J. Basic Microbiol. 42: 55-66, excepto condiciones diferentes que fueron empleadas como se describe en este caso.

Una unidad de actividad de beta-glucosidasa es definida como 1,0 μ mol de p-nitrofenol producido por minuto a 50 °C, pH 5 de 4 mM p-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido como sustrato en 100 mM de citrato sódico, 0,01 % TWEEN® 20.

25 [0079] La beta-glucosidasa puede ser de origen fúngico, como una cepa del género *Trichoderma*, *Aspergillus* o *Penicillium*.

La beta-glucosidasa puede derivar de *Trichoderma reesei*, como la beta-glucosidasa codificada por el gen *bg/1* (ver Fig. 1 de EP 562003).

30 La beta-glucosidasa puede derivar de *Aspergillus oryzae* (recombinantemente producido en *Aspergillus oryzae* según WO 2002/095014), *Aspergillus fumigatus* (recombinantemente producido en *Aspergillus oryzae* según el Ejemplo 22 de WO 2002/095014) o *Aspergillus niger* (1981, J. Appl. Vol 3, págs 157-163).

Hemicelulasa

35 [0080] La hemicelulosa puede ser descompuesta por semienzimas y/o hidrólisis ácida para liberar sus componentes de azúcar de cinco y seis carbonos.

El material derivado de lignocelulosa se puede tratar con una o varias hemicelulasas.

40 Puede ser utilizada cualquier hemicelulasa adecuada para usar en la hidrolización de hemicelulosa, preferiblemente en xilosa.

[0081] Las hemicelulasas preferidas incluyen xilanasas, arabinofuranosidasas, esterasa de acetil xilano, feruloil esterasa, glucuronidasas, endo-galactanasa, manasas, endo-arabinasas o exo arabinasas, exo-galactanasas, y mezclas de dos o más de las mismas.

45 Preferiblemente, la hemicelulasa para usar en la presente invención es una hemicelulasa con exo acción, y más preferiblemente, la hemicelulasa es una hemicelulasa con exo acción que tiene la capacidad de hidrolizar hemicelulosa bajo condiciones ácidas por debajo de pH 7, preferiblemente pH 3-7.

Un ejemplo de hemicelulasa adecuada para usar en la presente invención incluye VISCOZYME™ (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

50 [0082] La hemicelulasa puede ser una xilanasa.

La xilanasa puede preferiblemente ser de origen microbiano, así como de origen fúngico (p. ej., *Trichoderma*, *Meripilus*, *Humicola*, *Aspergillus*, *Fusarium*) o de una bacteria (p. ej., *Bacillus*).

55 La xilanasa puede derivar de un hongo filamentoso, preferiblemente derivado de una cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus aculeatus*; o una cepa de *Humicola*, preferiblemente *Humicola lanuginosa*.

La xilanasa puede preferiblemente ser una endo-1,4-beta xilanasa, más preferiblemente una endo-1,4-beta xilanasa de GH10 o GH11.

Ejemplos de xilanasas comerciales incluyen SHEARZYME™ y BIOFEED WHEAT™ de Novozymes A/S, Dinamarca.

60 [0083] La hemicelulasa se puede adicionar en una cantidad eficaz para hidrolizar hemicelulosa, como, en cantidades de aproximadamente 0,001 a 0,5 % en peso de sólidos totales (TS), más preferiblemente de aproximadamente 0,05 a 0,5 % en peso de TS.

65 [0084] Las xilanasas se pueden adicionar en cantidades de 0,001-1,0 g/kg de sustrato de DM (sustancia seca), preferiblemente en las cantidades de 0,005-0,5 g/kg de sustrato de DM, y de la forma más preferible de 0,05-0,10 g/kg de sustrato de DM.

Xilosa Isomerasa

[0085] Las xilasas isomerasas (D-xilosa cetoisomerasa) (E.C. 5.3.1.5.) son enzimas que catalizan la reacción de isomerización reversible de D-xilosa a D-xilulosa.

5 Las isomerasas de glucosa convierten la isomerización reversible de D-glucosa a D-fructosa. No obstante, la glucosa isomerasa es a veces denominada xilosa isomerasa.

[0086] Una xilosa isomerasa se puede utilizar en el método o proceso y puede ser cualquier enzima con actividad de xilosa isomerasa y puede derivar de cualquier fuente, preferiblemente de origen fúngico o bacteriano, tales como hongos filamentosos o levadura.

10 Los ejemplos de xilosa isomerasas bacterianas incluyen aquellos de los géneros *Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Bacillus* y *Flavobacterium*, y *Thermotoga*, incluyendo *T. neapolitana* (Vieille et al., 1995, Appl. Environ. Microbiol. 61 (5), 1867-1875) y *T. maritime*.

15 Ejemplos de xilosa isomerasas fúngicas son derivados de especies de *Basidiomycetes*.

[0087] Una xilosa isomerasa preferida es derivada de una cepa de levadura del género *Candida*, preferiblemente una cepa de *Candida boidinii*, especialmente la xilosa isomerasa *Candida boidinii* descrita por, por ejemplo, Vongsuvanlert et al., 1988, Agric. Biol. Chem., 52(7): 1817-1824.

20 La xilosa isomerasa puede preferiblemente derivar de una cepa de *Candida boidinii* (Kloeckera 2201), depositada como DSM 70034 y ATCC 48180, descrito en Ogata et al., Agric. Biol. Chem, Vol. 33, p. 1519-1520 o Vongsuvanlert et al., 1988, Agric. Biol. Chem, 52(2), p. 1519-1520.

[0088] En una forma de realización, la xilosa isomerasa deriva de una cepa de *Streptomyces*, por ejemplo, de una cepa de *Streptomyces murinus* (Patente Estadounidense nº 4,687,742); *S. flavovirens*, *S. albus*, *S. achromogenus*, *S. echinatus*, *S. wedmorensis* todos descritos en la Patente Estadounidense nº 3,616,221.

25 Otras xilosa isomerasas se describen en la Patente Estadounidense nº 3,622,463, Patente Estadounidense nº 4,351,903, Patente Estadounidense nº 4,137,126, Patente Estadounidense nº 3,625,828, Patente Húngara nº 12,415, Patente Alemana 2,417,642, Patente Japonesa nº 69,28,473, y WO 2004/044129.

La xilosa isomerasa puede estar bien en forma líquida o inmovilizada.

30 La forma líquida es preferida.

Ejemplos de xilosa isomerasas disponibles comercialmente incluyen SWEETZYME™ T de Novozymes A/S, Dinamarca.

La xilosa isomerasa se adiciona en una cantidad para proporcionar un nivel de actividad en la gama de 0,01-100 IGIU por gramo de sólidos totales.

35

Alfa-amilasa

[0089] Una o varias alfa-amilasas pueden ser utilizadas.

Las alfa-amilasas preferidas son microbianas, así como de origen fúngico o bacteriano.

40 La alfa-amilasa más adecuada es determinada basándose en condiciones del proceso pero puede fácilmente ser hecha por un experto en la técnica.

[0090] La alfa-amilasa preferida puede ser una alfa-amilasa ácida, por ejemplo, alfa-amilasa ácida fúngica o alfa-amilasa ácida bacteriana.

45 Los frase "alfa-amilasa ácida" se refiere a una alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) que adicionada en una cantidad eficaz tiene actividad óptima con un pH en la gama de 3 a 7, preferiblemente de 3,5 a 6, o más preferiblemente de 4-5.

Alfa-amilasa bacteriana

50 [0091] Como se ha indicado anteriormente, la alfa-amilasa puede ser de origen *Bacillus*.

La alfa-amilasa *Bacillus* puede preferiblemente derivar de una cepa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* o *B. stearothermophilus*, pero también puede derivar de otra *Bacillus* sp.

55 Los ejemplos específicos de alfa-amilasas contempladas incluyen la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en SEC ID nº: 4 en WO 1999/19467, la alfa-amilasa *Bacillus amyloliquefaciens* SEC ID nº: 5 en WO 1999/19467 y la alfa-amilasa *Bacillus stearothermophilus* mostrada en SEC ID nº: 3 en WO 1999/19467.

En una forma de realización, la alfa-amilasa puede ser una enzima con un grado de identidad de al menos 60 %, preferiblemente al menos 70 %, más preferido al menos 80 %, más preferido incluso al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % respecto a cualquiera de las secuencias mostradas en SEC ID nº: 1,2 o 3, respectivamente, en WO 1999/19467.

60

[0092] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o un híbrido, especialmente uno descrito en cualquiera de WO 1996/23873, WO 1996/23874, WO 1997/41213, WO 1999/19467, WO 2000/60059, y WO 2002/10355.

65 Variantes de alfa-amilasa contempladas específicamente se describen en la Patente Estadounidense nº 6,093,562, 6,297,038 o 6,187,576 e incluyen las variantes alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (alfa-amilasa BSG) con una delección de uno o dos aminoácidos en posiciones R179 a G182, preferiblemente una delección doble descrita en

WO 1996/023873 - ver por ejemplo, página 20, líneas 1-10, preferiblemente correspondiente a delta(181-182) en comparación con la secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa BSG de tipo salvaje expuesta en SEC ID n°: 3 descrita en WO 1999/19467 o delección de los aminoácidos R179 y G180 usando la SEC ID n°: 3 en WO 1999/19467 para numerar.

5 Más preferidas incluso son las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, que tiene una delección doble correspondiente a delta (181-182) y además comprende una sustitución N193F (también denominada 1181* + G182* + N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa BSG de tipo salvaje expuesta en la SEC ID NO:3 descrita en WO 1999/19467.

10 Alfa-amilasa híbrida bacteriana

[0093] Una o varias alfa-amilasas híbridas bacterianas pueden ser utilizadas.

Una alfa-amilasa híbrida específicamente contemplada comprende 445 residuos de aminoácidos C terminales de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada en SEC ID n°: 4 de WO 1999/19467) y 37 residuos de aminoácidos N terminales de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrada en SEC ID n°: 5 de WO 1999/19467), con uno o varios, especialmente todos, de la siguiente sustitución:

[0094] 48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S (utilizando la numeración de *Bacillus licheniformis* en SEC ID n°: 4 de WO 1999/19467).

20 También son preferidas las variantes con una o varias de las siguientes mutaciones (o mutaciones correspondientes en otros esqueletos de alfa-amilasa de *Bacillus*): H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S y/o delección de dos residuos entre las posiciones 176 y 179, preferiblemente delección de E178 y G179 (utilizando la SEC ID n°: 5 numeración de WO 1999/19467).

25 Alfa-amilasa fúngica

[0095] Una o varias alfa-amilasas fúngicas pueden ser utilizadas.

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

30 [0096] Una alfa-amilasa fúngica ácida preferida es una alfa-amilasa del tipo Fungamyl, que deriva de una cepa de *Aspergillus oryzae*.

La frase "alfa-amilasa del tipo Fungamyl" indica una alfa-amilasa que muestra una identidad alta, es decir, más del 70 %, más del 75 %, más del 80 %, más del 85 %, más del 90 %, más del 95 %, más del 96 %, más del 97 %, más del 98 %, más del 99 % o incluso del 100 % de identidad respecto a la parte madura de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n°: 10 en WO 1996/23874.

[0097] Otra alfa-amilasa ácida preferida deriva de una cepa de *Aspergillus niger*.

40 La alfa-amilasa fúngica ácida puede ser la de *A. niger* descrita como "AMYA_ASPNG" en la base de datos Swiss-prot/TrEMBL bajo el número de acceso primario P56271 y descrita en WO 1989/01969 (Ejemplo 3). Una alfa-amilasa fúngica ácida derivada de *Aspergillus niger* disponible comercialmente es la SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

[0098] La alfa-amilasa fúngica también puede ser una enzima de tipo salvaje que comprenda un dominio de unión de almidón (SBD) y un dominio catalítico de alfa-amilasa (es decir, no híbrido), o una variante del mismo.

45 En una forma de realización, la alfa-amilasa de tipo salvaje puede derivar de una cepa de *Aspergillus kawachii*.

[0099] Otras alfa-amilasas de tipo salvaje contempladas incluyen aquellas derivadas de una cepa del género *Rhizomucor* y *Meripilus*, preferiblemente una variante de *Rhizomucor pusillus* (WO 2004/055178 o *Meripilus giganteus*).

50 [0100] La alfa-amilasa puede derivar de *Aspergillus kawachii* como se describe por Kaneko et al., 1996, J. Ferment. Bioeng. 81:292-298, "Molecular-cloning and determination of the nucleotide-sequence of a gene encoding an acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus kawachii*"; y además como EMBL:#AB008370.

55 Alfa-amilasa híbrida fúngica

[0101] Una o varias alfa-amilasas híbridas fúngicas pueden ser utilizadas.

La alfa-amilasa ácida fúngica puede ser una alfa-amilasa híbrida.

60 Los ejemplos de alfa-amilasas híbridas fúngicas incluyen aquellas descritas en WO 2005/003311 o en la Solicitud Estadounidense con número de publicación 2005/0054071 (Novozymes) o en la solicitud de patente estadounidense n° 60/638,614, ver US 2008/0090271 (Novozymes).

Una alfa-amilasa híbrida puede comprender un dominio catalítico de alfa-amilasa (CD) y un dominio/módulo de enlace de carbohidratos (CBM), tal como un dominio de unión al almidón, y opcionalmente un enlazador.

65 [0102] Los ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellas descritas en la Tabla 1 a

5 de los ejemplos en la solicitud de patente estadounidense nº 60/638,614, incluyendo la variante Fungamyl con dominio catalítico JA118 y SBD de *Athelia rolfsii* (SEC ID NO:100 en US 60/638,614), alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con el enlazador AMG de *Athelia rolfsii* y SBD (SEC ID nº: 101 en la solicitud estadounidense nº 60/638,614), alfa-amilasa *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD (que se describe en la Tabla 5 como una combinación de secuencias de aminoácidos de SEC ID nº: 20, SEC ID NO:72 y SEC ID NO:96 en la solicitud estadounidense nº 11/316,535, ver US 2006/0148054 o como V039 en la Tabla 5 en WO 2006/069290, y alfa-amilasa de *Meripilus giganteus* con el enlazador de glucoamilasa de *Athelia rolfsii* y SBD (SEC ID nº: 102 en la solicitud estadounidense nº 60/638,614).

Otras alfa-amilasas híbridas contempladas específicamente son cualquiera de aquellas catalogadas en las Tablas 3, 4, 5, y 6 en el Ejemplo 4 en la solicitud estadounidense nº 11/316,535 y WO 2006/069290.

[0103] Otros ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellos descritos en la publicación de aplicación estadounidense nº 2005/0054071, incluyendo aquellos descritos en la tabla 3 en la página 15, tales como alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con enlazador de *Aspergillus kawachii* y dominio de unión al almidón.

[0104] También son contempladas las alfa-amilasas que muestran una identidad alta respecto a cualquiera de las alfa-amilasas mencionadas arriba, es decir, más del 70 %, más del 75 %, más del 80 %, más del 85 %, más del 90 %, más del 95 %, más del 96 %, más del 97 %, más del 98 %, más del 99 % o incluso del 100 % de identidad respecto a las secuencias de enzima madura.

[0105] Unas alfa-amilasas ácidas según la invención pueden ser adicionadas en una cantidad de 0,1 a 10 AFAU/g DS, preferiblemente de 0,10 a 5 AFAU/g DS, especialmente de 0,3 a 2 AFAU/g DS.

Productos comerciales de alfa-amilasa

[0106] Composiciones comerciales preferidas que comprenden alfa-amilasa incluyen MYCOLASE de DSM, BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYME™ X y SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L (Novozymes A/S) y CLARASE™ L-40,000, DEX-LO™, SPEZYME™ FRED, SPEZYME™ AA, y SPEZYME™ DELTA AA (Genencor Int.), y la alfa-amilasa fúngica ácida vendida con el nombre comercial SP288 (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

Enzima generadora de fuente de carbohidratos

[0107] La frase "enzima generadora de fuente de carbohidratos" incluye glucoamilasa (que es generadora de glucosa), beta-amilasa y amilasa maltogénica (que son generadoras de maltosa).

Una enzima generadora de fuente de carbohidratos es capaz de producir un carbohidrato que se puede usar como fuente de energía por el(los) organismo(s) de fermentación en cuestión, por ejemplo, cuando se usa en un proceso para producir un producto de fermentación como etanol.

El carbohidrato generado se puede convertir directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado, preferiblemente etanol.

Una mezcla de enzimas generadoras de fuente de carbohidratos pueden estar presentes.

Mezclas especialmente contempladas son las mezclas de al menos una glucoamilasa y una alfa-amilasa, especialmente una amilasa ácida, más preferido incluso una alfa-amilasa fúngica ácida.

Glucoamilasa

[0108] Una o varias glucoamilasas pueden ser utilizadas.

Una glucoamilasa puede derivar de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, de un microorganismo o una planta.

Las glucoamilasas preferidas son de origen bacteriano o fúngico seleccionadas del grupo formado por las glucoamilasas *Aspergillus*, en particular las glucoamilasas G1 o G2 de *A. niger* (Boel et al., 1984, EMBO J. 3 (5), p. 1097-1102), y variantes de las mismas, tales como aquellas descritas en WO 1992/00381, WO 2000/04136 y WO 2001/04273 (de Novozymes, Dinamarca); la glucoamilasa de *A. awamori* descrita en WO 1984/02921, glucoamilasa de *A. oryzae* (Agric. Biol. Chem., 1991,55 (4), p. 941-949), y variantes o fragmentos de la misma.

Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes con termoestabilidad mejorada: G137A y G139A (Chen et al., 1996, Prot. Eng. 9,499-505); D257E y D293E/Q (Chen et al., 1995, Prot. Eng. 8,575-582); N182 (Chen et al., 1994, Biochem. J. 301,275-281); enlaces de disulfuro, A246C (Fierobe et al., 1996, Biochemistry, 35,8698-8704; e introducción de residuos de Pro en la posición A435 y S436 (Li et al., 1997, Protein Eng. 10,1199-1204).

[0109] Otras glucoamilasas incluyen *Athelia rolfsii* (previamente denominada *Corticium rolfsii*), glucoamilasa (ver patente estadounidense nº 4,727,026 y Nagasaka et al., 1998, "Purification and properties of the raw-starch-degrading glucoamilasas from *Corticium rolfsii*, Appl Microbiol Biotechnol 50:323-330), y glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular derivadas de *Talaromyces emersonii* (WO 1999/28448), *Talaromyces leycettanus* (nº de patente estadounidense Re. 32,153), *Talaromyces duponti*, y *Talaromyces thermophilus* (patente estadounidense nº 4,587,215).

[0110] Las glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (EP 135,138) y *C. thermohydrosulfuricum* (WO 1986/01831), y *Trametes cingulata* descrita en WO 2006/069289.

5 [0111] Las glucoamilasas híbridas son también contempladas.
Se describen ejemplos de las glucoamilasas híbridas en WO 2005/045018.
Los ejemplos específicos incluyen la glucoamilasa híbrida descrita en la Tabla 1 y 4 del Ejemplo 1 de WO 2005/045018.

10 [0112] También se contemplan glucoamilasas que muestran una identidad alta respecto a cualquiera de las glucoamilasas anteriormente mencionadas, es decir, más del 70 %, más del 75 %, más del 80 %, más del 85 %, más del 90 %, más del 95 %, más del 96 %, más del 97 %, más del 98 %, más del 99 % o incluso del 100 % de identidad respecto a las secuencias de enzimas maduras.

15 [0113] Las composiciones disponibles comercialmente que comprenden glucoamilasa incluyen AMG 200L; AMG 300 L; SAN™ SUPER, SAN™EXTRA L, SPIRIZYME™ PLUS, SPIRIZYME™ FUEL, SPIRIZYME™ B4U y AMG™ E (de Novozymes A/S); OPTIDEX™ 300 (de Genencor Int.); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUS (de DSM); G-ZYME™ G900, G-ZYME™ y G990 ZR (de Genencor Int.).

20 [0114] Las glucoamilasas se pueden adicionar en una cantidad de 0,02-20 AGU/g DS, preferiblemente 0,1-10 AGU/g DS, especialmente entre 1-5 AGU/g DS, tal como 0,5 AGU/g DS.

Beta-amilasa

25 [0115] Una o varias beta-amilasas pueden ser utilizadas.
El término "beta-amilasa" (E.C 3.2.1.2) es el nombre generalmente dado a amilasas maltogénicas de acción exo, que catalizan la hidrólisis de enlaces 1,4-alfa-glucosídicos en amilosa, amilopectina y polímeros relacionados con glucosa.

30 Las unidades de maltosa son sucesivamente retiradas de las extremidades de cadena no reducidas en una manera gradual hasta que la molécula es degradada o, en el caso de la amilopectina, hasta que un punto de derivación es alcanzado.
La maltosa liberada tiene la configuración beta anomérica, de ahí el nombre beta-amilasa.

35 [0116] Las beta-amilasas han sido aisladas de varias plantas y microorganismos (W.M. Fogarty y C.T. Kelly, Progress in Industrial Microbiology, vol. 15, págs. 112-115,1979).

Estas beta-amilasas se caracterizan por el hecho de tener temperaturas óptimas en la gama de 40°C a 65°C y un pH óptimo en la gama de 4,5 a 7.

Una beta-amilasa disponible comercialmente de cebada es NOVOZYM™ WBA de Novozymes A/S, Dinamarca y SPEZYME™ BBA 1500 de Genencor Int., EEUU.

40

Amilasa maltogénica

[0117] Una o varias amilasas maltogénicas pueden ser utilizadas.

La amilasa también puede ser una alfa-amilasa maltogénica.

45 Una alfa-amilasa maltogénica (glucano 1,4-alfa-maltohidrolasa, E.C. 3.2.1.133) es capaz de hidrolizar amilosa y amilopectina a maltosa en la configuración alfa.

Una amilasa maltogénica de la variante *Bacillus stearothermophilus* de NCIB 11837 está comercialmente disponible en Novozymes A/S.

50 Las alfa-amilasas maltogénicas son descritas en las patentes estadounidenses nº 4,598,048, 4,604,355 y 6,162,628.
La amilasa maltogénica se puede adicionar en una cantidad de 0,05- 5 mg de proteína/gramo total DS o 0,05-5 MANU/g DS.

Proteasas

55 [0118] Una proteasa se puede adicionar durante hidrólisis, fermentación o hidrólisis simultánea y fermentación.

La proteasa se puede adicionar para deflocular el organismo fermentador, especialmente levadura, durante la fermentación.

La proteasa puede ser cualquier proteasa.

60 En una forma de realización preferida, la proteasa es una proteasa ácida de origen microbiano, preferiblemente de origen bacteriano o fúngico.

Una proteasa fúngica ácida es preferida, pero también otras proteasas pueden ser usadas.

[0119] Proteasas adecuadas incluyen proteasas microbianas, tales como proteasas bacterianas y fúngicas.

65 Las proteasas preferidas son proteasas ácidas, es decir, proteasas caracterizadas por la capacidad para hidrolizar proteínas bajo condiciones ácidas por debajo de pH 7.

[0120] Las proteasas fúngicas de ácido contempladas incluyen proteasas fúngicas derivadas de *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Candida*, *Coriolus*, *Endothia*, *Enthomophtra*, *Irpex*, *Penicillium*, *Sclerotium* y *Torulopsis*.

Especialmente contempladas son las proteasas derivadas de *Aspergillus niger* (ver, por ejemplo, Koaze et al., 1964, Agr. Biol. Chem. Japón, 28,216), *Aspergillus saitoi* (ver, por ejemplo, Yoshida, 1954, J. Agr. Chem. Soc. Japón, 28,66), *Aspergillus awamori* (Hayashida et al., 1977, Agric. Biol. Chem., 42(5), 927-933, *Aspergillus aculeatus* (WO 1995/02044), o *Aspergillus oryzae*, tal como la proteasa pepA; y proteasas ácidas de *Mucor pusillus* o *Mucor miehei*.

[0121] También se contemplan las proteasas neutras o alcalinas, tales como una proteasa derivada de una variante de *Bacillus*.

Por ejemplo, la proteasa contemplada para la invención deriva de *Bacillus amyloliquefaciens* y tiene la secuencia obtenible en Swissprot como Acceso nº P06832.

También se contemplan las proteasas con al menos un 90 % de identidad para la secuencia de aminoácidos obtenible en Swissprot como Acceso nº P06832 con al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o particularmente al menos 99 % de identidad.

[0122] Además se contemplan las proteasas con al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos descrita como SEC ID NO:1 en WO 2003/048353 con 92 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o particularmente al menos 99 % de identidad.

[0123] También se contemplan proteasas de tipo papaína tales como proteasas dentro de E.C. 3.4.22.* (proteasa de cisteína), como las de EC 3.4.22.2 (papaína), EC 3.4.22.6 (quimopapaína), EC 3.4.22.7 (asclepaína), EC 3.4.22.14 (actinidaina), EC 3.4.22.15 (catepsina L), EC 3.4.22.25 (glicil endopeptidasa) y EC 3.4.22.30 (caricaína).

[0124] En una forma de realización, la proteasa puede ser una preparación de proteasa derivada de una cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus oryzae*.

En otra forma de realización, la proteasa puede derivar de una variante de *Rhizomucor*, preferiblemente *Rhizomucor meihei*.

En otra forma de realización contemplada, la proteasa puede ser una preparación de proteasa, preferiblemente una mezcla de una preparación proteolítica derivada de una cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus oryzae*, y una proteasa derivada de una cepa de *Rhizomucor*, preferiblemente *Rhizomucor meihei*.

[0125] Las proteasas de ácido aspártico son descritas, por ejemplo, en el Hand-book of Proteolytic Enzymes, editado por A.J. Barrett, N.D. Rawlings y J.F. Woessner, Aca-demic Press, San Diego, 1998, capítulo 270).

Los ejemplos adecuados de proteasa de ácido aspártico incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en R.M. Berka et al., Gene, 96,313 (1990)); (R.M. Berka et al., Gene, 125,195-198 (1993)); y Gomi et al., Biosci. Biotech. Biochem. 57,1095-1100 (1993).

[0126] Productos disponibles comercialmente incluyen ALCALASE®, ESPERASE™, FLAVOURZYME™, PROMIX™, NEUTRASE®, RENNILASE®, NOVOZYM™ FM 2,0 L, y NOVOZYM™ 50006 (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca) y GC106™ y SPEZYME™ FAN de Genencor Int., Inc., EEUU.

[0127] La proteasa puede estar presente en una cantidad de 0,0001-1 mg de proteína enzimática por g de DS, preferiblemente de 0,001 a 0,1 mg de proteína enzimática por g de DS.

Alternativamente, la proteasa puede estar presente en una cantidad de 0,0001 a 1 LAPU/g de DS, preferiblemente 0,001 a 0,1 LAPU/g de DS y/o de 0,0001 a 1 mAU-RH/g de DS, preferiblemente de 0,001 a 0,1 mAU-RH/g de DS.

[0128] La presente invención es posteriormente descrita por los siguientes ejemplos que no deberían ser interpretados como limitación del objetivo de la invención.

50 Materiales y Métodos

Identidad

[0129] La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias polinucleótidas es descrita por el parámetro "identidad".

Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina por el método Clustal (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) utilizando el Software LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineación múltiple: penalización de gap 10 y penalización de longitud de gap 10.

Los parámetros de alineación por pares son Ktuple=1, penalización de gap=3, ventanas=5, y diagonales=5.

[0130] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias polinucleótidas se determina por el método Wilbur-Lipman (Wilbur and Lipman, 1983, Proceedings of the National Academy of Science USA 80: 726-730) utilizando el Software LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineación múltiple: penalización de gap 10 y penalización de longitud de gap 10.

Los parámetros de alineación por pares son Ktuple=3, penalización de gap=3, y ventanas=20.

Ensayos de proteasa

5 Ensayo de caseína AZCL

[0131] Una solución del 0,2 % de caseína AZCL de sustrato azul se suspende en Borax/NaH₂PO₄ tampón pH9 durante la agitación.

10 La solución se distribuye durante la agitación de la placa de microtitulación (100 microL en cada depósito), 30 microL de muestra de enzima se añade y las placas se incuban en un Termomezclador Eppendorf durante 30 minutos a 45°C y 600 rpm.

La muestra de enzima desnaturalizada (ebullición a 100°C durante 20 min) se usa como una forma preliminar.

15 Tras la incubación la reacción se detiene transfiriendo la placa de microtitulación a hielo y la solución coloreada es separada del sólido por centrifugado de 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C. 60 microL de sobrenadante se transfieren a una placa de microtitulación y la absorbancia a 595 nm se mide utilizando un Lector de Microplacas BioRad.

Ensayo pNA

20 [0132] 50 microL de muestra con proteasa se añaden a una placa de microtitulación y el ensayo comienza añadiendo 100 microL 1 mM de sustrato pNA (5 mg disueltos en 100 microL DMSO y además diluidos en 10 mL con Borax/NaH₂PO₄ tampón pH9,0). El aumento en OD₄₀₅ a temperatura ambiente se monitorea como una medida de la actividad de proteasa.

25 Actividad de glucoamilasa (AGU)

[0133] La actividad de glucoamilasa se puede medir en Unidades de Glucoamilasa (AGU).

30 El Unidad Novo Glucoamilasa (AGU) es definida como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto bajo las condiciones estándar a 37°C, pH 4,3, sustrato: maltosa 23,2 mM, tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción 5 minutos.

Un sistema autoanalizador puede ser utilizado.

La mutarotasa se añade al reactivo de glucosa deshidrogenasa de modo que cualquier alfa-D-glucosa presente se transforma en beta-D-glucosa.

35 La glucosa deshidrogenasa reacciona específicamente con beta-D-glucosa en la reacción mencionada anteriormente, formando NADH que es determinado usando un fotómetro a 340 nm como una medida de concentración de glucosa original.

<u>Incubación AMG:</u>	
Sustrato:	maltosa 23,2 mM
Tampón:	acetato 0,1 M
pH:	4,30 ± 0,05
Temperatura de incubación:	37°C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Alcance de trabajo de la enzima:	0,5-4,0 AGU/mL

<u>Reacción de color:</u>	
GlucDH:	430 U/L
Mutarotasa:	9 U/L
NAD:	0,21 MM
Tampón:	fosfato 0,12 M; 0,15 M NaCl
pH:	7,60 ± 0,05
Temperatura de incubación:	37°C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Longitud de onda:	340 nm

40 [0134] Una carpeta (EB-SM-0131,02/01) que describe este método analítico con más detalle está disponible en la solicitud de Novozymes A/S, Dinamarca.

45 Actividad de alfa-amilasa (KNU)

[0135] La actividad de alfa-amilasa se puede determinar usando almidón de patata como sustrato.

Este método se basa en la descomposición de almidón de patata modificado por la enzima, y la reacción es seguida

de muestras de mezcla de almidón/solución enzimática con una solución de yodo.

Inicialmente, se forma un color azul negrozco, pero durante la descomposición del almidón el color azul se vuelve más débil y gradualmente se transforma en un marrón rojizo, que se compara con un estándar de vidrio coloreado.

5 Una unidad Kilo Novo (KNU) de alfa amilasa se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándar (es decir, a 37°C +/- 0,05; 0,0003 M Ca²⁺; y pH 5,6) dextriniza 5260 mg de sustancia seca de almidón Merck Amylum soluble.

Una carpeta [EB-SM-0009.02/01](#) que describe este método analítico con más detalle está disponible previa petición de Novozymes A/S, Dinamarca.

10 Actividad de alfa-amilasa ácida (AFAU)

[0136] Cuando se usa según la presente invención la actividad de una alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (Unidades de Alfa-amilasa Fúngica Ácida).

Alternativamente, la actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AAU (Unidades de Alfa-Amilasa Ácida).

15 Unidades de Alfa-Amilasa Ácida (AAU)

[0137] La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AAU (Unidades de Alfa-Amilasa Ácida), que es un método absoluto.

20 Una Unidad de Amilasa Ácida (AAU) es la cantidad de conversión de enzima de 1 g de almidón (100 % de sustancia seca) por hora bajo condiciones estandarizadas en un producto con una transmisión a 620 nm después de la reacción con una solución de yodo de fuerza conocida igual al de una referencia de color.

Condiciones estándar/condiciones de reacción:

Sustrato:	Almidón soluble. Concentración aprox. 20 g DS/L.
Tampón:	Citrato, aprox. 0,13 M, pH=4,2
Solución de yodo:	40,176 g de yoduro potásico + 0,088 g de yodo/L
Agua de la ciudad	15°-20°dH (dureza de grado alemán)
pH:	4,2
Temperatura de incubación:	30°C
Tiempo de reacción:	11 Minutos
Longitud de onda:	620 nm
Concentración de enzima:	0,13-0,19 AAU/ml
Rango de trabajo de enzima:	0,13-0,19 AAU/ml

25 [0138] El almidón debería ser almidón Lintner, que es un almidón de ebullición fina usado en el laboratorio como indicador colorimétrico.

El almidón Lintner se obtiene diluyendo el tratamiento de ácido clorhídrico de almidón natural de modo que este conserve la capacidad para colorear de azul con yodo.

30 Otro detalle se puede encontrar en EP 0140,410 B2.

Determinación de FAU-F

[0139] Las Unidades de Alfa-Amilasa Fúngica FAU-F (Fungamyl) se miden con respecto a un estándar de enzima de una fuerza declarada.

35

Condiciones de reacción	
Temperatura	37°C
pH	7,15
Longitud de onda	405 nm
Tiempo de reacción	5 min
Tiempo de medición	2 min

[0140] Una carpeta (EB-SM-0216,02) que describe este método estándar con más detalle está disponible en la solicitud de Novozymes A/S, Dinamarca.

40 Actividad de alfa-amilasa ácida (AFAU)

[0141] La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (Unidades de Alfa-Amilasa Fúngica Ácida), que están determinadas respecto a un estándar de enzima. 1 AFAU se define como la cantidad de enzima que degrada 5,260 mg de sustancia seca almidonada por hora bajo las condiciones estándar mencionadas más abajo.

45 [0142] La alfa-amilasa ácida, una endo-alfa-amilasa (1,4-alfa-D-glucano-glucanohidrolasa, E.C. 3.2.1.1) hidroliza enlaces alfa-1,4-glucosídicos en las regiones internas de la molécula de almidón para formar dextrinas y

oligosacáridos con longitudes de cadena diferentes.

La intensidad de color formada con yodo es directamente proporcional a la concentración de almidón.

La actividad amilasa se determina utilizando colorimetría inversa como una reducción en la concentración de almidón bajo las condiciones analíticas específicas.

5



Condiciones estándar/condiciones de reacción:

Sustrato:	Almidón soluble, aprox. 0,17 g/L
Tampón:	Citrato, aprox. 0,03 M
Yodo (I ₂):	0,03 g/L
CaCl ₂ :	1,85 mM
pH:	2,50 ± 0,05
Temperatura de incubación:	40°C
Tiempo de reacción:	23 segundos
Longitud de onda:	590 nm
Concentración de enzima:	0,025 AFAU/mL
Rango de trabajo de enzima:	0,01-0,04 AFAU/mL

10

[0143] Una carpeta EB-SM-0259,02/01 que describe este método analítico con más detalle está disponible previa solicitud en Novozymes A/S, Dinamarca.

15 Medición de la actividad de celulasa usando el ensayo de papel de filtro (ensayo FPU)

Fuente del Método

20 [0144] El método se describe en un documento titulado "Measurement of Cellulase Activities" de Adney, B. y Baker, J., 1996, Laboratory Analytical Procedure, LAP-006, National Renewable Energy Laboratory (NREL).

Se basa en el método IUPAC para medir la actividad de celulasa (Ghose, T.K., 1987, Measurement of Cellulase Activities, Pure & Appl. Chem. 59: 257-268).

Procedimiento

25

[0145] El método se realiza como se describe por Adney y Baker, 1996, *supra*, salvo por el uso de placas de 96 pocillos para leer los valores de absorbancia después del desarrollo de color, como se describe abajo.

Tubos de Ensayo Enzimático:

30

[0146] Una banda de papel de filtro laminado (#1 Whatman; 1 X 6 cm; 50 mg) se adiciona al fondo de una probeta (13 X 100 mm).

Al tubo se le añaden 1,0 mL de 0,05 M tampón de citrato de sodio (pH 4,80).

35

Los tubos que contienen papel de filtro y tampón son incubados 5 min. a 50 °C (± 0,1 °C) en un baño maría circulante.

Después de la incubación, 0,5 mL de dilución de enzima en el tampón de citrato se añade al tubo.

Diluciones de enzima se diseñan para producir valores ligeramente por encima y por debajo del valor asignado de 2,0 mg de glucosa.

Los contenidos del tubo se agitan en vórtex suavemente durante 3 segundos.

40

Después de la agitación en vórtex, los tubos se incuban durante 60 min. a 50 °C (± 0,1 °C) en un baño maría circulante.

Inmediatamente después de los 60 min. de incubación, los tubos son retirados del baño maría, y 3,0 mL de DNS reactivo se añade a cada tubo para parar la reacción.

Los tubos se agitan en vórtex 3 segundos para mezclar.

45

2.3 Ensayo en blanco y controles

[0147] Un ensayo en blanco reactivo es preparado añadiendo 1,5 mL de tampón de citrato a una probeta.

Un control de sustrato se prepara colocando una banda de papel de filtro laminado en el fondo de una probeta, y añadiendo 1,5 mL de tampón de citrato.

Los controles de enzima se preparan para cada dilución de enzima mezclando 1,0 mL de tampón de citrato con 0,5 mL de la dilución de enzima apropiada.

- 5 El ensayo en blanco reactivo, el control de sustrato, y los controles de enzima son evaluados de la misma manera que los tubos de ensayo enzimático, y hechos junto con estos.

Estándares de glucosa

- 10 [0148] Una solución madre de glucosa de 100 mL (10,0 mg/mL) es preparada, y 5 mL de partes alícuotas son congeladas.

Antes del uso, las partes alícuotas son descongeladas y agitadas en vórtex para mezclarlas.

Las diluciones de la solución madre han sido hechas en el tampón de citrato de la siguiente manera:

$$G1 = 1,0 \text{ mL solución madre} + 0,5 \text{ mL tampón} = 6,7 \text{ mg/mL} = 3,3 \text{ mg/0,5 mL}$$

$$G2 = 0,75 \text{ mL solución madre} + 0,75 \text{ mL tampón} = 5,0 \text{ mg/mL} = 2,5 \text{ mg/0,5 mL}$$

$$G3 = 0,5 \text{ mL solución madre} + 1,0 \text{ mL tampón} = 3,3 \text{ mg/mL} = 1,7 \text{ mg/0,5 mL}$$

$$G4 = 0,2 \text{ mL solución madre} + 0,8 \text{ mL tampón} = 2,0 \text{ mg/mL} = 1,0 \text{ mg/0,5 mL}$$

- 15 [0149] Los tubos estándar de glucosa son preparados añadiendo 0,5 mL de cada dilución a 1,0 mL de tampón de citrato.

[0150] Los tubos estándar de glucosa son evaluados de la misma manera que los tubos de ensayo enzimático, y hechos junto con estos.

- 20 *Desarrollo de Color*

[0151] Después de la incubación de 60 min. y adición de DNS, los tubos son todos hervidos juntos durante 5 min. al baño maría.

- 25 [0152] Después de la ebullición, son inmediatamente enfriados en un baño de hielo/agua.

[0153] Cuando se enfrían, los tubos son brevemente agitados en vórtex, y se deja que la pulpa se asiente. Luego cada tubo es diluido añadiendo 50 microL del tubo a 200 microL de ddH₂O en una placa de 96 pocillos. Cada pocillo es mezclado, y la absorbancia se lee a 540 nm.

- 30 *Cálculos (los ejemplos se dan en el documento NREL)*

[0154] Una curva estándar de glucosa se prepara poniendo en un gráfico la concentración de glucosa (mg/0,5 mL) para los cuatro estándares (G1-G4) vs. A₅₄₀.

- 35 Este es equipado utilizando una regresión lineal (Prism Software), y la ecuación para la línea se utiliza para determinar la glucosa producida para cada uno de los tubos de ensayo enzimático.

[0155] Se prepara un gráfico de la glucosa producida (mg/0,5 mL) vs. la dilución de enzima total, con el eje Y (dilución de enzima) estando en una escala log.

- 40 [0156] Una línea es extraída entre la dilución de enzima que produjo justo por encima de 2,0 mg de glucosa y la dilución que produjo justo por debajo de eso. Por esta línea, se determina la dilución de enzima que habrían producido exactamente 2,0 mg de glucosa.

- 45 [0157] Las Unidades de Papel de Filtro/mL (FPU/mL) son calculadas de la siguiente manera:

$$\text{FPU/mL} = 0,37 / \text{dilución de enzima que produce 2,0 mg de glucosa}$$

Ejemplo

[0158] Fue evaluado el efecto de adición de los DDGs en el rendimiento de azúcar.

Los DDGs fueron adicionados a rastrojos de maíz secos molidos antes del pretratamiento.

5 El contenido de azúcar fue medido a las 24, 48, y 72 horas después del inicio de la hidrólisis.

Preparación A de celulasa: La Preparación A de celulasa es una composición celulolítica que comprende un polipéptido con actividad de aumento celulolítico (GH61A) descrita en WO 2005/074656; una beta-glucosidasa (una proteína de fusión descrita en WO 2008/057637); y preparación de enzimas celulolíticas derivada de *Trichoderma reesei*.

10 La Preparación A de celulasa es descrita en el número de solicitud internacional divisional PCT/US2008/065417, ver WO 2008/151079.

[0159] Los DDGs fueron obtenidos de ADKINS ENERGY LLC (Lena, IL).

15 La Preparación A de celulasa fue usada para hidrólisis en una cantidad de 6 mg de proteína enzimática/g de TS a 5 % de carga de TS.

Los rastrojos de maíz molidos fueron mezclados con los DDGs y remojados en la dilución H₂SO₄ (1 % en la base sólida seca, sólido a líquido: 1:10).

La mezcla remojada fue tratada térmicamente en un baño de arena a 170 °C durante 8 minutos.

20 Los DDGs fueron añadidos en cantidades de 4 % en peso de DDGs (basadas en rastrojos de maíz) y 16 % en peso de DDGs (basadas en rastrojos de maíz).

Los rastrojos de maíz pretratados con DDGs fueron lavados antes de la adición de la Preparación A de celulasa.

La mezcla lavada fue hidrolizada por la Preparación A de celulasa a 50 °C.

El contenido de azúcar liberado fue determinado por el método YSI 2700 SELECT (YSI Life Sciences, Yellow Springs, OH).

25 Como se muestra en las Figuras 1 y 2, la adición de los DDGs durante el pretratamiento aumentó el rendimiento final de azúcar y el índice de conversión.

Cuando el 16 % en peso de los DDGs fue añadido a rastrojos de maíz antes del pretratamiento, el rendimiento de azúcar aumentó de 18,6 g/L a 20,8 g/L y el índice de conversión de carbohidrato mejoró de 59,7 % a 66,8 %.

REIVINDICACIONES

1. Método para producir un producto de fermentación de un material que contiene lignocelulosa, que comprende:
- 5 (a) combinar material que contiene lignocelulosa y granos secos de destilería con solubles (DDG/S);
(b) tratar previamente con ácido el material combinado que contiene lignocelulosa y los DDG/S y tratar térmicamente a una temperatura en la gama de 160-220 °C durante un periodo de 1-60 minutos;
(c) exponer el material que contiene lignocelulosa pretratado con ácido y tratado térmicamente y los DDG/S a una o
10 varias enzimas hidrolizantes; y
(d) fermentar con un organismo fermentador para producir un producto de fermentación, donde los DDG/S se introducen al material que contiene lignocelulosa en una cantidad de 4-48 % p/p DDG/S/material que contiene lignocelulosa.
2. Método según la reivindicación 1, donde los DDG/S se introducen al material que contiene lignocelulosa en una
15 cantidad de aproximadamente 16 % p/p DDG/S/material seco que contiene lignocelulosa.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, donde el material que contiene lignocelulosa es seleccionado de rastrojos de maíz, mazorcas de maíz, fibra de maíz, brote de hierba, paja de trigo, paja de arroz, y bagazo.
- 20 4. Método para aumentar la hidrólisis enzimática de un material que contiene lignocelulosa, que comprende:
- (a) introducir una cantidad de DDG/S de bloqueo de lignina eficaz al material que contiene lignocelulosa antes del pretratamiento con ácido y del tratamiento térmico a una temperatura en la gama de 160-220°C durante un periodo de 1-60 minutos, y
25 (b) exponer el material que contiene lignocelulosa pretratado con ácido y tratado térmicamente y los DDG/S a una o varias enzimas de hidrolización donde los DDG/S se introducen al material que contiene lignocelulosa en una cantidad de 4-48 % p/p DDG/S/material que contiene lignocelulosa.
5. Método según la reivindicación 4, donde los DDG/S se introducen al material que contiene lignocelulosa en una
30 cantidad de aproximadamente 16 % p/p DDG/S/material que contiene lignocelulosa.
6. Método según la reivindicación 4 o 5, donde el material que contiene lignocelulosa es seleccionado de rastrojos de maíz, mazorcas de maíz, fibra de maíz, brote de hierba, paja de trigo, paja de arroz, y bagazo.

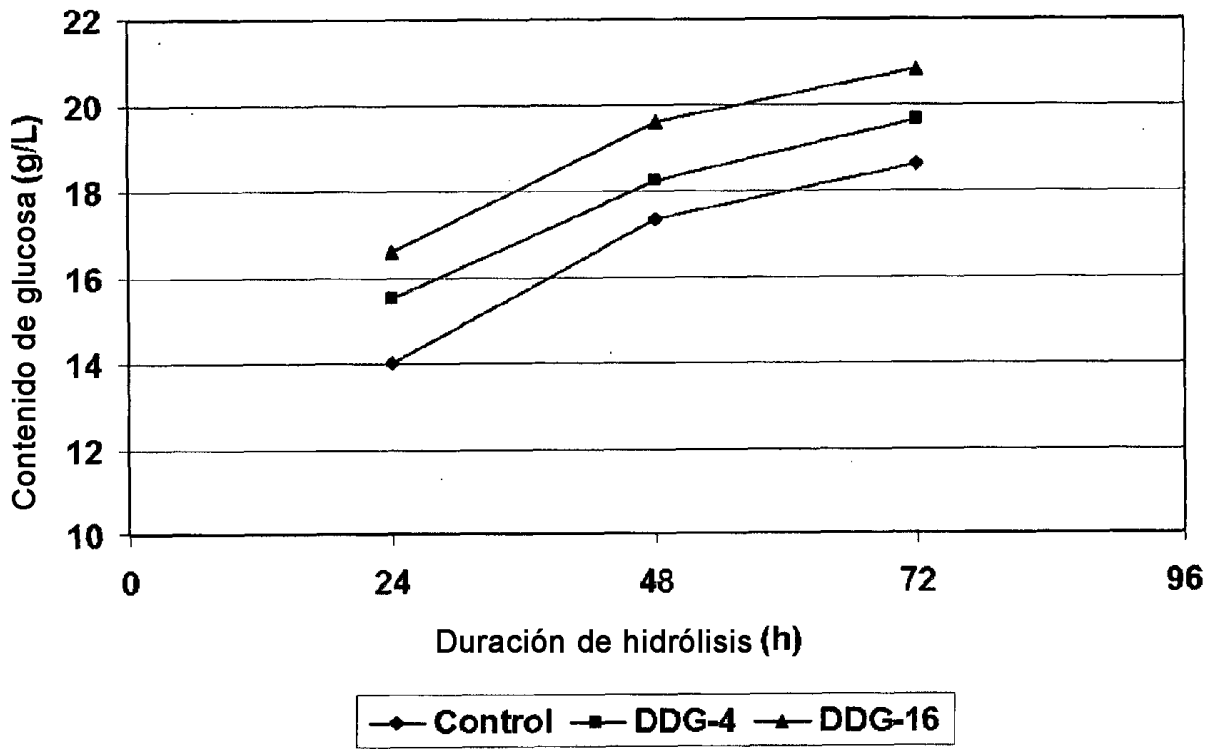


Figura 1

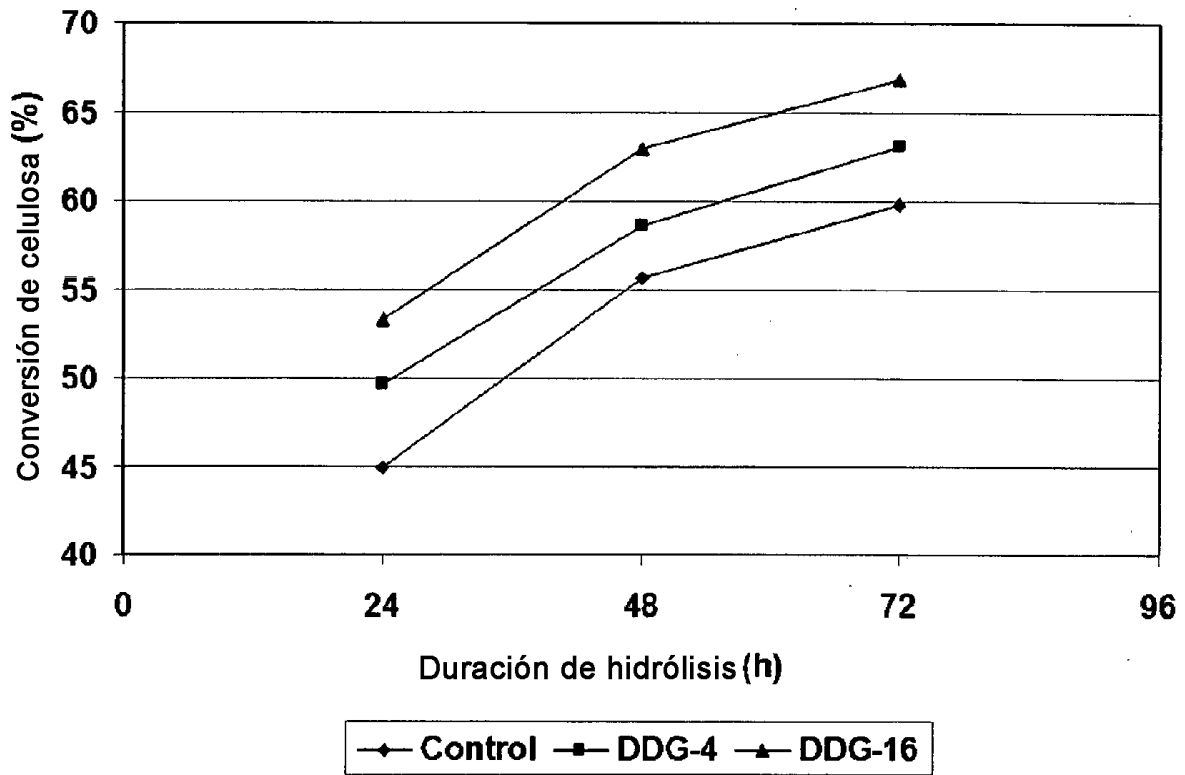


Figura 2