

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 499 590**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/06** (2006.01)

**C12P 7/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2011 E 11743899 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014 EP 2591119**

54 Título: **Proceso de fermentación con polipéptidos GH61**

30 Prioridad:

**07.07.2010 US 362023 P**

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

**29.09.2014**

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:

**KANG, ZHENGFANG**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 499 590 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**

Proceso de fermentación con polipéptidos GH61

5

Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere a procesos de producción de productos de fermentación de materiales que contienen lignocelulosa. Específicamente, la invención se refiere a la mejora de la fermentación en los procesos de producción de etanol a partir de material lignocelulósico usando uno o varios polipéptidos GH61.

10

Estado de la técnica

[0002] Hay un gran número de productos comerciales difíciles de producir sintéticamente y actualmente se producen mediante la fermentación de organismos. Tales productos, incluyendo alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol, 1,3-propanodiol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico, gluconato, ácido láctico, ácido succínico, 2,5- ácido dicetona-D-glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>), y compuestos más complejos, incluyendo, por ejemplo, antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B12, beta-caroteno); y hormonas. La fermentación también se usa comúnmente en el alcohol para el consumo (por ejemplo, en la cerveza y el vino), en productos lácteos (por ejemplo, en la producción de yogur y queso), en el cuero, e industrias de tabaco.

15

20

[0003] En la técnica se conocen un gran número de procesos de producción de productos de fermentación, como el etanol, mediante la fermentación de azúcares proporcionados por la degradación del almidón y/o el material que contiene lignocelulosa.

25

[0004] No obstante, la producción de productos de fermentación, como el etanol, a partir de tales materiales vegetales sigue siendo demasiado costoso. Por lo tanto, existe la necesidad de suministrar procesos que puedan acortar el tiempo de fermentación, aumentar el índice de fermentación, o aumentar el rendimiento del producto de fermentación y así reducir los costes de producción.

30

Resumen de la invención

[0005] En el primer aspecto, la invención se refiere a procesos de producción de productos de fermentación de materiales que contienen lignocelulosa, que incluye las etapas de:

35

1. (a) tratar previamente el material que contiene lignocelulosa;
2. (b) hidrolizar el material de la etapa (a);
3. (c) fermentar con un organismo fermentador en el que se añaden uno o varios GH61 polipéptidos tras completar la hidrólisis.

40

[0006] La invención también se refiere al uso de polipéptidos GH61 en los procesos de fermentación para aumentar el índice de fermentación durante la fermentación.

45

Breve descripción de las figuras

[0007]

La Fig. 1 demuestra el efecto del polipéptido GH61a en el rendimiento de etanol durante la fermentación con el tiempo. Fig. 2 demuestra el efecto del polipéptido GH61a en la concentración de glucosa durante fermentación con el tiempo. La Fig. 3 demuestra el efecto del polipéptido GH61 en la concentración de xilosa durante fermentación con el tiempo.

50

Descripción detallada de la invención

55

Familia glicósido hidrolasa 61 (GH61)

[0008] Según la invención los polipéptidos GH61 son polipéptidos que se incluyen en la familia glicósido hidrolasa 61 según Henrissat B., 1991, A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities, Biochem. J. 280: 309-316, y Henrissat B., y Bairoch un., 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, Biochem. J. 316: 695-696.

60

5 [0009] WO 2005/074647, WO 2005/074656, y WO 2010/138754 revelan los polipéptidos GH61 de *Thielavia terrestris*, *Thermoascus aurantiacus*, y *Aspergillus fumigatus*, respectivamente. Tales polipéptidos se caracterizan por su capacidad para mejorar actividad celulolítica. El término "mejora de la actividad celulolítica" hace referencia a una actividad biológica catalizada por un polipéptido GH61 que mejora la hidrólisis de un material celulósico por enzima con actividad celulolítica.

10 [0010] La mejora de la actividad celulolítica se determina midiendo el aumento en azúcares reductores o el aumento total de celobiosa y glucosa de la hidrólisis de un material celulósico por enzima celulolítica bajo las siguientes condiciones: 1-50 mg de proteína total/g de celulosa en PCS (pretratamiento ácido), en el que la proteína está compuesta de 50-99,5% p/p de proteína enzimática celulolítica y 0,5-50% p/p proteína de un polipéptido GH61 con actividad de aumento celulolítico durante 1-7 días a 50°C en comparación a una hidrólisis de control con la misma carga total de proteína sin actividad de aumento celulolítico (1-50 mg de proteína celulolítica/g de celulosa en PCS).

15 [0011] Los polipéptidos GH61 con un aumento de la actividad celulolítica, mejoran la hidrólisis de un material celulósico catalizado por una enzima con actividad celulolítica, reduciendo la cantidad de enzima celulolítica requerida para alcanzar el mismo grado de hidrólisis.

20 [0012] En *Biochemistry* 49 se describe el progreso reciente en lo que se refiere el uso de GH61: 3305-3316, marzo 2010, y *Bioresource Technology* 102: 8339-8342, junio 2011.

25 [0013] Sorprendentemente, los inventores han encontrado que los polipéptidos GH61 son capaces de aumentar la fermentación en la producción de productos de fermentación de azúcares fermentables derivados de material vegetal utilizando un organismo fermentador. El material vegetal contiene lignocelulosa.

[0014] La invención se refiere a un proceso para producir un producto de fermentación a partir de un material que contiene lignocelulosa, que incluye las etapas de:

- 30
1. (a) pretratamiento del material que contiene lignocelulosa;
  2. (b) hidrolizar el material de la etapa (a);
  3. (c) fermentar con un organismo fermentador, en el cual se añaden uno o varios polipéptidos GH61 después de completar la hidrólisis.

35 [0015] En una forma de realización, el polipéptido GH61 se dosifica en una concentración de 0,01-10 mg-proteína/g-TS, preferiblemente de 0,1-5 mg de proteína / g TS.

Organismo fermentador

40 [0016] La construcción "organismo fermentador" hace referencia a cualquier organismo, incluyendo organismos fúngicos y bacterianos, adecuados para producir un deseado producto de fermentación. El organismo fermentador puede ser un organismo fermentador C6 y/o C5, o una combinación de los mismos. Ambos organismos fermentadores C6 y/o C5 son conocidos en la técnica.

45 [0017] Los organismos fermentadores adecuados son capaces de fermentar, es decir, convertir los azúcares fermentables, tales como glucosa, fructosa, maltosa, xilosa, manosa, galactosa y/o arabinosa, directo o indirectamente en el producto de fermentación deseado.

50 [0018] Los ejemplos de organismos de fermentación incluyen organismos fúngicos, tales como la levadura. 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 farabinofermentans*, *Candida diddensii*, *Candida sonorensis*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis*, o *Candida boidinii*. 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*.

55 [0019] Los organismos de fermentación bacteriano preferidos incluyen cepas de *Escherichia*, en particular *Escherichia coli*, cepas de *Zymomonas*, en particular *Zymomonas mobilis*, cepas de *Zimógeno*, en particular *Zimobacter palmae*, cepas de *Klebsiella* en particular de *Klebsiella oxytoca*, cepas de *Leuconostoc*, en particular de *Leuconostoc mesenteroides*, cepas de *Clostridium*, en particular de *Clostridium butyricum*, cepas de *Enterobacter*, en particular de *Enterobacter aerogenes* y cepas de *Thermoanaerobacter*, en particular de *Thermoanaerobacter BG1L1* (*Appl. Microbiol. Biotec.* 77: 61-86) y *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum*, o la

*Thermoanaerobacter mathranii*. Se conciben también las cepas de *Lactobacillus* como son las cepas de *Corynebacterium glutamicum* R, *Bacillus thermoglucosidaisus*, y *Geobacillus thermoglucosidaisus*.

5 [0020] El organismo fermentador puede ser un organismo fermentador C6 de azúcar, tal como una cepa de, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*.

10 [0021] En relación con la fermentación de lignocelulosa derivada de materiales, se contemplan organismos de fermentación C5 de azúcar. Muchos organismos de fermentación C5 de azúcar también fermentan azúcares C6. Los ejemplos de fermentación de azúcar C5 incluyen cepas de *Pichia*, tal como la especie de *Pichia stipitis*. También se conoce la bacteria de fermentación de azúcar C5. Algunas cepas de *cerevisiae* de *saccharomyces* también fermentan azúcares C5 (y C6). Los ejemplos son cepas genéticamente modificadas de *Saccharomyces* spp. que son capaces de fermentar azúcares C5 incluyendo aquellos afectados, por ejemplo, Ho et al., 1998, *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1852-1859 and Karhumaa et al., 2006, *Microbial Cell Factories* 5:18 , y Kuyper et al., 2005, *FEMS Yeast Research* 5: 925-934. El organismo de fermentación puede ser una célula fúngica transformada con un gen de xilosa isomerasa como se revela en WO 2003/062430 (Nedalco) o WO 2010/074577 (Nedalco).

20 [0022] El determinado rendimiento fermentativo de los organismos de fermentación se puede inhibir por la presencia de inhibidores en los medios de fermentación y así reducir capacidad de producción de etanol. Los compuestos en biomasa hidrolizada y las altas concentraciones de etanol son conocidos por inhibir la capacidad fermentativa de determinadas células de levadura. Los métodos de preadaptación o adaptación pueden reducir este efecto inhibitorio. Típicamente la preadaptación o adaptación de células de levadura implica consecutivamente el crecimiento de las células de levadura, antes de la fermentación, para aumentar tanto el rendimiento fermentativo de la levadura como la producción de etanol. Los métodos de preadaptación y adaptación de levadura son conocidos en la técnica. Tales métodos pueden incluir, por ejemplo, el crecimiento de las células de levadura en presencia de hidrolizados de biomasa cruda; el crecimiento de las 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 el complemento de los cultivos de levadura con acetaldehído. El organismo de fermentación puede ser una cepa de levadura sometida a uno o más métodos de preadaptación o adaptación antes de la fermentación.

30 [0023] En una forma de realización, se añade al medio de fermentación el organismo de fermentación de modo que el organismo de fermentación viable, tal como la levadura, cuenta por mL de medio de fermentación está en la gama de 105 à a 1012 à, preferiblemente de 107 à a 1010 à, especialmente aproximadamente 5?107 à.

35 [0024] La levadura comercial disponible incluye, por ejemplo, levadura RED STAR™ y ETHANOL RED™ (disponible en Fermentis/Lesaffre, EEUU), FALI (disponible en Fleischmann's Yeast, EEUU), SUPERSTART™ y levadura fresca de THERMOSACC™ (disponible en Ethanol Technology, WI, EEUU), BIOFERM AFT y XR (disponible de NABC - sociedad de bioproductos norteamericanos, GA, EEUU), GERT STRAND (disponible en Gert Strand AB, Suecia), y FERMIOL™ (disponible en las especialidades DSM).

40 [0025] Según la invención, el organismo de fermentación capaz de producir el producto deseado de fermentación a partir de azúcares fermentables, como, por ejemplo, glucosa, maltosa de fructosa, xilosa, galactosa y/o arabinosa, se cultiva preferiblemente en condiciones precisas en un índice de crecimiento particular. Cuando el organismo de fermentación se introduce o añade al medio de fermentación, el organismo de fermentación inoculado pasa varios estadios. Inicialmente no se produce crecimiento. Este periodo se conoce como la "fase de estado latente" y se puede considerar un periodo de adaptación. Durante la fase siguiente referida como "exponencial fase", el índice de crecimiento aumenta gradualmente. Después de que un periodo de máximo crecimiento, el índice cesa y el organismo de fermentación entra en una "fase estacionaria". Tras otro periodo de tiempo, el organismo de fermentación entra en la "fase de muerte" en el que desciende el número de células viables.

50 [0026] En una forma de realización, el polipéptido GH61 se añade al medio de fermentación cuando el organismo de fermentación está en la fase de latencia.

55 [0027] En una forma de realización, el polipéptido GH61 se añade al medio de fermentación cuando el organismo de fermentación está en la fase exponencial.

[0028] En una forma de realización, el polipéptido GH61 se añade al medio de fermentación cuando el organismo de fermentación está en la fase estacionaria.

60 Productos de fermentación

[0029] El término "producto de fermentación" hace referencia a un producto producido por un proceso que incluye

fermentar utilizando un organismo de fermentación. Los productos de fermentación contemplados según la invención incluyen alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido succínico, ácido glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>); antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B12, beta-caroteno); y hormonas. El producto de fermentación puede ser de etanol, por ejemplo, etanol de combustible; etanol potable, es decir, licores neutros potables; o etanol industrial o productos usados en la industria de alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), industria lechera (por ejemplo, productos lácteos fermentados), industria de cuero e industria de tabaco. Los tipos de cerveza preferida comprenden la cerveza inglesa de malta, la cerveza negra, la cerveza rubia, la cerveza amarga, licores de malta, cerveza happoushu, cerveza con alto grado de alcohol, cerveza con bajo alcohol, cerveza baja en calorías o cerveza ligera. Los procesos de fermentación preferidos utilizados, incluyen procesos de fermentación alcohólicos. El producto de fermentación, como el etanol, obtenido según la invención, puede usarse preferiblemente como combustible. No obstante, en el caso del etanol éste también puede usarse como etanol potable.

#### 15 Medio de fermentación

[0030] La construcción "medios de fermentación" o "medio de fermentación" se refiere al entorno en el que la fermentación se lleva a cabo y comprende el sustrato de fermentación, es decir, la fuente de carbohidratos que se metaboliza en el organismo(s) de fermentación, y puede incluir organismo(s) de fermentación.

[0031] El medio de fermentación puede comprender nutrientes y estimulador(es) de crecimiento para el organismo(s) de fermentación. Los nutrientes y estimuladores de crecimiento son muy usados en la técnica de fermentación e incluyen fuentes de nitrógeno, tales como amoníaco; vitaminas y minerales, o combinaciones de los mismos.

[0032] Además, el producto de fermentación puede comprender tanto la fermentación como los medios de fermentación o los medios de fermentación.

#### Fermentación

[0033] El material de partida usado en los procesos de la invención es un material que contiene lignocelulosa. Las condiciones de fermentación se determinan basándose en, por ejemplo, el tipo de material, los azúcares fermentables disponibles, el organismo(s) de fermentación y/o el producto de fermentación deseado. Un experto en la técnica puede fácilmente determinar las condiciones de fermentación adecuadas. La fermentación puede, según la invención, llevarse a cabo en condiciones usadas de forma convencional. Los procesos de fermentación preferidos son los procesos anaeróbicos.

[0034] Los procesos de la invención se pueden realizar como un lote, lote alimentado o como un proceso continuo. Las fermentaciones pueden llevarse a cabo en un sistema de ultrafiltración donde el concentrado se mantiene en recirculación en presencia de sólidos, agua, y el organismo de fermentación, y donde el filtrado es el deseado producto de fermentación que contiene líquido. Igualmente se contemplan los procesos llevados a cabo en los reactores de la membrana continua con membranas de ultrafiltración y donde el concentrado se mantiene en recirculación en presencia de sólidos, agua, organismo(s) de fermentación y donde el filtrado es el producto de fermentación que contiene líquido.

[0035] Después de la fermentación, el organismo de fermentación se puede separar del lodo fermentado y reciclarse.

[0036] Las fermentaciones convencionalmente se realizan con levadura, como *saccharomyces cerevisiae*, como organismo de fermentación. No obstante, las bacterias y los hongos filamentosos también se pueden usar como organismos de fermentación. Algunas bacterias tienen una temperatura de fermentación más alta, óptimo que, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*. Por lo tanto, las fermentaciones pueden, en tales casos, efectuarse a temperaturas tan altas como 75°C, por ejemplo, entre 40-70°C, al igual que entre 50-60°C. No obstante, también se conocen las bacterias con una temperatura óptima significativamente inferior hasta llegar a la temperatura ambiente (alrededor de 20°C). Se pueden encontrar ejemplos de organismos de fermentación adecuados en la anterior sección "Organismos de fermentación".

[0037] Para la producción de etanol con levadura, la fermentación puede durar entre 24 y 96 horas, en particular entre 35 y 60 horas. La fermentación puede llevarse a cabo a una temperatura entre 20 y 40°C, preferiblemente de 26 a 34°C, en particular alrededor de 32°C. El pH puede ser de pH 3 a 8, preferiblemente entre el pH 5 y el 6.

[0038] Otros productos de fermentación pueden fermentarse a temperaturas conocidas por el experto en la materia y son adecuadas para el organismo de fermentación en cuestión.

#### Fermentación de azúcares derivados de la lignocelulosa

[0039] Como se ha mencionado anteriormente los diferentes tipos de organismos de fermentación pueden utilizarse para fermentar azúcares derivados de materiales con lignocelulosa. Las fermentaciones se llevan a cabo normalmente por levadura, bacterias u hongos filamentosos, incluyendo aquellos mencionados anteriormente en la sección "Organismos de fermentación". Si el objetivo son los azúcares fermentables C6 las condiciones son normalmente similares a las de las fermentaciones de almidón. No obstante, si el objetivo es fermentar azúcares C5 (por ejemplo; xilosa) o una combinación de azúcares fermentables C6 y C5, pueden diferir el organismo(s) de fermentación y/o condiciones de fermentación.

[0040] Las fermentaciones de bacterias se pueden realizar a temperaturas más altas, hasta los 75°C, por ejemplo, entre 40- 70°C, entre 50-60°C, de fermentaciones de levadura convencional, que se realizan típicamente a temperaturas de 20-40°C. No obstante, también se conocen fermentaciones de bacterias a temperatura tan bajas como 20°C. Las fermentaciones se realizan típicamente a un pH en la gama entre 3 y 7, preferiblemente de pH 3,55 a 6, al igual que alrededor de pH 5. Las fermentaciones se desarrollan típicamente durante 24-96 horas.

#### Recuperación

[0041] Después de la fermentación, el producto de fermentación puede separarse del medio de fermentación. El medio de fermentación se puede destilar para extraer el producto de fermentación deseado o el producto de fermentación deseado puede extraerse del medio de fermentación mediante técnicas de micro o filtración de membrana. Alternativamente, el producto de fermentación se puede recuperar por desorción. En la técnica se conocen bien los métodos para la recuperación.

La producción de productos de fermentación de material que contiene lignocelulosa

[0042] En este aspecto, la invención se refiere a los procesos de producción de productos de fermentación de materiales que contienen lignocelulosa. La conversión de material que contiene lignocelulosa en los productos de fermentación, tal como etanol, tiene las ventajas de la disponibilidad preparada de cantidades grandes de materia prima, incluyendo madera, residuos agrícolas, cultivos herbáceos, residuos sólidos municipales etc. los materiales con lignocelulosa normalmente consisten principalmente en celulosa, hemicelulosa, y lignina y son conocidos frecuentemente como "biomasa".

[0043] La estructura de lignocelulosa no es directamente accesible a la hidrólisis enzimática. Por lo tanto, el material que contiene lignocelulosa tiene que ser pretratado, por ejemplo, por hidrólisis ácida en unas condiciones adecuadas de presión y temperatura, para romper el sello de lignina y disgregar la estructura cristalina de celulosa. Esto causa la solubilización de la hemicelulosa y la fracción de celulosa. La celulosa y hemicelulosa pueden después ser hidrolizadas enzimáticamente, por ejemplo, mediante enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas, para convertir los polímeros de carbohidrato en azúcares fermentables que se pueden fermentar en los productos de fermentación deseados, como etanol. Opcionalmente se puede recuperar el producto de fermentación, por ejemplo, por destilación como se ha descrito también anteriormente.

#### SSF, HHF y SHF

[0044] La hidrólisis y la fermentación se pueden llevar a cabo como una hidrólisis simultánea y etapa de fermentación (SSF). En general, esto significa que la hidrólisis combinada/simultánea y la fermentación se realizan en condiciones (por ejemplo, temperatura y/o pH) adecuado, preferiblemente óptimas, para el organismo(s) de fermentación en cuestión. La etapa de hidrólisis y la etapa de fermentación se puede realizar como hidrólisis híbrida y fermentación (HHF). La HHF comienza normalmente con una etapa de hidrólisis parcial separada y termina con una hidrólisis simultánea y una etapa de fermentación. La etapa de hidrólisis parcial separada es un paso de sacarificación de celulosa enzimática típicamente realizada en unas condiciones adecuadas (por ejemplo, a temperaturas más altas), preferiblemente óptimas, para la enzima(s) hidrolizante en cuestión. Las posteriores etapas de hidrólisis simultánea y fermentación se llevan a cabo normalmente en condiciones adecuadas para el organismo(s) de fermentación (frecuentemente a temperaturas inferiores a las de la etapa de hidrólisis separada).

[0045] Según la invención, las etapas de hidrólisis y fermentación se realizan de manera separada como hidrólisis y fermentación, donde la hidrólisis finaliza antes de la iniciación de la fermentación. Esto es frecuentemente conocido como "SHF". Según la invención, para mejorar la fermentación de los polipéptidos GH61 se añaden tras completar la hidrólisis. En otra forma de realización, las fases sólidas y líquidas del hidrolizado se separan antes de añadir el polipéptido GH61 a la fase líquida (es decir, el medio de fermentación). En esta forma de realización, se puede añadir el polipéptido GH61 antes, durante o después de que se añada al medio de fermentación el organismo de fermentación.

## Pretratamiento

5 [0046] Según la invención, el material que contiene lignocelulosa puede ser pretratado antes de ser hidrolizado y fermentado. El material pretratado puede ser hidrolizado, preferiblemente enzimáticamente, antes de la fermentación. El objetivo del pretratamiento es el de separar y/o liberar celulosa, hemicelulosa y/o lignina y de esta manera mejorar el índice de hidrólisis enzimática.

10 [0047] Según la invención, la etapa de pretratamiento (a) puede ser una etapa de pretratamiento convencional conocida en la técnica. El pretratamiento puede ocurrir en la suspensión acuosa. El material que contiene lignocelulosa puede estar presente durante el pretratamiento en una cantidad entre 10-80% en peso, preferiblemente entre 20-50% en peso.

## Pretratamiento químico, mecánico y/o biológico

15 [0048] Según la invención, el material que contiene lignocelulosa puede ser químicamente, mecánicamente y/o biológicamente pretratado antes de la hidrólisis y/o fermentación. El tratamiento mecánico (frecuentemente referido como pretratamiento físico) se puede utilizar solo o en combinación con la hidrólisis posterior o simultánea, especialmente hidrólisis enzimática, para promover la separación y/o liberar celulosa, hemicelulosa y/o lignina.

20 [0049] Preferiblemente, la sustancia química, mecánico y/o el pretratamiento biológico se realizan antes de la hidrólisis y/o fermentación. Alternativamente, la sustancia química, mecánica y/o el pretratamiento biológico se realizan simultáneamente con hidrólisis, como simultáneamente con adición de una o varias enzimas celulolíticas, u otras actividades enzimáticas mencionadas abajo, para liberar azúcares fermentables, tal como glucosa y/o maltosa.

25 [0050] El material pretratado que contiene lignocelulosa se puede lavar y/o desintoxicar antes o después de la etapa de hidrólisis (b). Esto puede mejorar la fermentabilidad de, por ejemplo, el material que contiene lignocelulosa hidrolizado en ácido diluido, tales como rastrojos de maíz. La desintoxicación se puede realizar de cualquier manera, por ejemplo, por extracción de vapor, evaporación, intercambio iónico, resina o tratamiento de carbón de la fracción líquida o lavando el material pretratado. Se describen otros métodos de desintoxicación en WO 2008/076738 o WO 2008/134254 de  
30 Novozymes.

## Pretratamiento químico

35 [0051] El pretratamiento puede ser un pretratamiento químico. El "pretratamiento químico" hace referencia a cualquier tratamiento químico que promueve la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina. Algunos ejemplos de etapas adecuadas de pretratamiento químico incluyen tratamiento con; por ejemplo, ácido diluido, cal, solvente alcalino orgánico, amoníaco, dióxido de azufre, dióxido de carbono. Además, también se contempla la oxidación húmeda e hidrotermólisis controlada por pH como tratamientos previos químicos. El pretratamiento puede ser un pretratamiento ácido. Preferiblemente, el pretratamiento químico es un tratamiento ácido, de forma más preferible, un tratamiento de  
40 ácido diluido continuo y/o un tratamiento de ácido moderado, como, tratamiento con ácido sulfúrico, u otro ácido orgánico, tal como el ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, o mezclas derivadas. También se pueden usar otros ácidos. Los medios de tratamiento de ácido moderado, en el contexto de la presente invención que el tratamiento de pH se extiende en la gama de 1-5, preferiblemente de pH 1-3. La concentración ácida puede estar en la gama de 0,1 a 2,0 peso % ácido, preferiblemente de ácido sulfúrico. El ácido se puede mezclar o entrar en contacto con  
45 el material a ser fermentado y la mezcla puede soportar una temperatura de la gama de 160-220°C, así como 165-195°C, para periodos que varía de minutos a segundos, por ejemplo, 1-60 minutos, así como 2-30 minutos o 3-12 minutos. Para la eliminación de hemicelulosa se puede aplicar la adición de ácidos fuertes, tales como el ácido sulfúrico. Este realiza el digestibilidad de celulosa. En el pretratamiento de ácido diluido, el material que contiene lignocelulosase puede mezclarse con ácido diluido, normalmente H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, y agua para formar un lodo, calentado por vapor a la  
50 temperatura deseada, y después de un periodo de permanencia se proyecta a presión atmosférica. El pretratamiento de ácido diluido se puede realizar con más diseños de reactor, por ejemplo, reactores de flujo de tapón, reactores de contracorriente, o reactores de lecho decreciente continuo de contracorriente (amañar y Murrai, 1996, supra; Schell et al., 2004, Bioresource Technol. 91: 179-188; protección et al., 1999, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 65: 93-115).

55 [0052] También se contempla en la invención el tratamiento con disolvente de celulosa que ha demostrado poder convertir aproximadamente el 90% de la celulosa en glucosa. Se ha demostrado también que la hidrólisis enzimática podría ser mucho mejor cuando se interrumpe la estructura lignocelulósica. Alcalina H<sub>2</sub> O<sub>2</sub>, ozono, organosolv (usa ácidos de Lewis, FeCl<sub>3</sub>, (Al)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> en alcoholes acuosos), glicerol, dioxano, fenol, o etilenglicol son disolventes conocidos por disgregar la estructura de la celulosa y promover la hidrólisis (Mosier et al., 2005, Bioresource Tehnology  
60 96: 673-686).

5 [0053] El pretratamiento con el químico alcalino de base, por ejemplo, NaOH, Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> y/o amoníaco o similar, está también dentro del campo del proceso inventivo. Por lo tanto, el pretratamiento puede ser un pretratamiento alcalino. El pretratamiento de cal se realiza con carbonato cálcico, hidróxido sódico, o amoníaco a bajas temperaturas de 85-150°C y tiempos de estancia desde 1 hora hasta algunos días (Wiman et al., 2005, Bioresource Technol. 96: 1959-1966; Mosier et al., 2005, Bioresource Technol. 96: 673-686). El uso de amoníaco en métodos de pretratamiento se describen en, por ejemplo, WO 2006/110891, WO 2006/110899, WO 2006/110900, WO 2006/110901. El pretratamiento puede ser un pretratamiento de amoníaco.

10 [0054] Las técnicas de oxidación en húmedo implican el uso de agentes oxidantes, tales como: agentes oxidantes a base de sulfito o similar. La oxidación en húmedo es un pretratamiento térmico realizado normalmente a 180-200°C durante 5-15 minutos en adición a un agente oxidante tal como peróxido de hidrógeno o presión excesiva de oxígeno (Schmidt y Thomsen, 1998, Bioresource Tecno. 64: 139-151; Palonen et al., 2004, Appl. Biochem. Biotecnol. 117: 1-17; Varga et al., 2004, biotechnol. Bioeng. 88: 567-574; Martin et al., 2006, J. Chem. Technol. Biotecnol. 81: 1669-1677). El pretratamiento se realiza preferiblemente en 1-40% de sustancia seca, de forma más preferible en 2-30% de sustancia  
15 seca, y de la forma más preferible 5-20% sustancia seca, y frecuentemente la inicial pH aumenta por la adición de un álcali tal como el carbonato de sodio.

20 [0055] Una modificación del método de pretratamiento de oxidación en húmedo, conocido como explosión húmeda (combinación de oxidación en húmedo y explosión de vapor), puede manejar sustancia seca hasta el 30%. En la explosión húmeda, el agente oxidante se introduce durante pretratamiento tras un determinado tiempo de estancia. El pretratamiento termina cuando hay un parpadeo de presión atmosférica (WO 2006/032282).

25 [0056] Como otro ejemplo de tratamientos previos con disolvente se incluye el tratamiento con DMSO (dimetilsulfóxido) o similares. Otros ejemplos de métodos de pretratamiento adecuados se describen por Schell et al., 2003, Appl. Biochem. y biotecnol. 105-108: 69-85, y Mosier et al., 2005, Bioresource Technology 96: 673-686, y solicitud publicada en EEUU 2002/0164730.

30 [0057] Generalmente, el pretratamiento químico se realiza durante 1-60 minutos, como de 5 a 30 minutos, pero puede llevarse a cabo durante periodos de tiempo más cortos o más largos en función del material a ser pretratado.

[0058] Otros ejemplos de métodos de pretratamiento adecuado se describen por Schell et al., 2003, Appl. Biochem y Biotecn. 105-108: 69-85, y Mosier et al., 2005, Bioresource Technology 96: 673-686, y publicación en USA nº 2002/0164730.

35 Pretratamiento mecánico

[0059] El pretratamiento puede ser un pretratamiento mecánico o físico. Como se usa en el contexto de la presente invención, el término "pretratamiento mecánico" se refiere a cualquier pretratamiento físico o mecánico que promueve la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina del material que contiene lignocelulosa. Por ejemplo, el  
40 pretratamiento mecánico incluye varios tipos de fresado, irradiación, explosión de vaporización/vapor, e hidrotermólisis.

[0060] El pretratamiento mecánico incluye trituración (reducción mecánica del tamaño de partícula). La trituración incluye la molienda en seco, la molienda húmeda y el fresado de bola vibratoria. El pretratamiento mecánico puede implicar una alta presión y/o alta temperatura (explosión de vapor). La alta presión hace referencia a la presión en la gama de 300 a 600 psi, preferiblemente de 400 a 500 psi, como alrededor de 450 psi. Una alta temperatura se refiere a temperaturas en la gama de aproximadamente 100 a 300°C, preferiblemente entre aproximadamente 140 y 235°C. El pretratamiento mecánico puede ser un proceso discontinuo, un sistema de hidrólisis de pistola de vapor que usa alta presión y alta temperatura tal como se ha definido anteriormente. Un hidrolizador Sunds (disponible en Sunds Defibrator AB (Suecia) puede utilizarse para esto.  
50

Sustancia química combinada y pretratamiento mecánico

[0061] Ambos pretratamientos, el químico y el mecánico, se pueden llevar a cabo implicando, por ejemplo, el tratamiento tanto diluido como el de ácido moderado y el tratamiento con una alta temperatura y presión. El pretratamiento químico y mecánico se pueden llevar a cabo como se desee, consecutivamente o simultáneamente.  
55

[0062] Por consiguiente, el material que contiene lignocelulosa puede someterse tanto al tratamiento químico como al mecánico para promover la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina.

60 [0063] El pretratamiento se puede realizar como diluido y/o etapa de explosión de vapor de ácido moderado. El pretratamiento se puede realizar como una etapa de explosión de fibra de amoníaco (o AFEX etapa de pretratamiento), o

filtración de amoníaco (APR).

[0064] El pretratamiento se puede realizar como una etapa de explosión de fibra de amoníaco (AFEX etapa de pretratamiento). La explosión de fibra de amoníaco (AFEX) implica tratar con material celulósico con amoníaco líquido o gaseoso a temperaturas moderadas tales como 90-100°C y alta presión tal como 17-20 bar durante 5-10 minutos, donde el contenido de sustancia en seco puede llegar a ser tan alta al 60% (Gollapalli et al., 2002, Appl. Biochem. Biotecnol. 98: 23-35; Chundawat et al., 2007, biotecnol. Bioeng. 96: 219- 231; Alizadeh et al., 2005, Appl. Biochem. Biotecnol. 121: 1133-1141; Teimouri et al., 2005, Bioresource Technol. 96: 2014-2018). El pretratamiento AFEX produce la despolimerización de celulosa y la hidrólisis parcial de hemicelulosa. Se dividen los complejos de lignina en carbohidratos.

Pretratamiento biológico

[0065] El pretratamiento puede ser un pretratamiento biológico.

[0066] Como se usa en la presente invención, el término "pretratamiento biológico" se refiere a cualquier pretratamiento biológico que promueve la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa, y/o lignina del material que contiene lignocelulosa. Las técnicas del pretratamiento biológico pueden implicar la aplicación microorganismos de solubilización de lignina (ver, por ejemplo, Hsu, T.-A., 1996, Pretreatment of biomass, en Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wiman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212; Ghosh, P., y Singh, A., 1993, Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass, Adv. Appl. Microbiol. 39: 295-333; McMillan, J. D., 1994, Pretreating lignocellulosic biomass: a review, in Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, Himmel, M. E., Baker, J. O., y Overend, R. P., eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, DC, chapter 15 ; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., and Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207-241 ; Olsson, L., and Hahn-Hagerdal, B., 1996, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production, Enz. Microb. Tech. 18: 312-331; y Vallander, L., y Eriksson, K.-E. L., 1990, Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art, Adv. Biochem. Ing./biotecnol. 42: 63-95).

Hidrólisis

[0067] Antes de la fermentación, el material pretratado que contiene lignocelulosa se puede hidrolizar para romper el sello de lignina y disgregar la estructura cristalina de celulosa. La hidrólisis se puede realizar enzimáticamente. Según la invención, el material pretratado que contiene lignocelulosa para ser fermentado se puede hidrolizar por una o varias hidrolasas (clase E.C. 3 según la nomenclatura enzimática), preferiblemente una o varias carbohidrasas incluyendo enzimas celulolíticas y enzimas hemicelulolíticas, o combinaciones de las mismas. Además, la proteasa, alfa-amilasa, glucoamilasa y/o similares también pueden estar presentes durante la hidrólisis y/o fermentación, al igual que el material que contiene lignocelulosa puede incluir algún, por ejemplo, amiláceo y/o material proteínáceo.

[0068] La enzima(s) usada para la hidrólisis puede ser capaz de convertir directa o indirectamente polímeros de carbohidrato en azúcares fermentables, tales como glucosa y/o maltosa, que pueden fermentarse en un producto de fermentación deseado, como el etanol.

[0069] La carbohidrasa(s) tiene (n) actividad enzimática celulolítica y/o actividad enzimática hemicelulítica.

[0070] La hidrólisis se lleva a cabo usando una preparación enzimática celulolítica que comprende además uno o varios polipéptidos con mayor actividad celulítica. En una forma de realización, los polipéptidos con una mayor actividad celulolítica son de la familia GH61. En una forma de realización preferida, el polipéptido(s) con una mayor actividad celulolítica es(son) de origen de la familia GH61A. Se describen a continuación ejemplos de preparaciones de enzimas celulolíticas adecuadas y preferidas y polipéptidos con actividad celulolítica de aumento en la sección "Enzimas celulolíticas" y en las secciones "Celulolíticas mejorando polipéptidos".

[0071] En una forma de realización del proceso de la invención, el polipéptido GH61 es un polipéptido GH61A. El polipéptido GH61A puede derivar de *Thermoascus aurantiacus*, preferiblemente el polipéptido GH61A descrito en WO 2005/074656 como en SEC ID n°: 1 o SEC ID n°: 2.

[0072] El polipéptido GH61 puede ser un polipéptido GH61E. El polipéptido GH61E puede derivar de *Thielavia terrestris*, preferiblemente del polipéptido GH61 E descrito en WO 2005/074647 como en SEC ID n°: 7 o SEC ID n°: 8.

[0073] El polipéptido GH61 puede ser un polipéptido GH61 B. El polipéptido GH61 B puede derivar de *Aspergillus fumigatus*, preferiblemente el GH61 B descrito en WO 2010/138754 como en SEC ID n°: 1 o SEC ID n°: 2.

[0074] Las enzimas adecuadas se describen a continuación en la sección "enzimas".

5 [0075] Los polímeros de hemicelulosa pueden descomponerse por enzimas hemicelulóticas y/o hidrólisis ácida para liberar sus cinco y seis componentes de azúcar de carbono. Los seis azúcares de carbono (hexosas), tales como glucosa, galactosa, arabinosa, y manosa, pueden ser fermentados inmediatamente a productos de fermentación tales como etanol, acetona, butanol, glicerol, ácido cítrico, ácido fumárico etc. por organismos de fermentación adecuados incluyendo la levadura.

10 [0076] La levadura es el organismo de fermentación preferido para fermentación de etanol. Se prefieren las cepas de *Saccharomyces*, especialmente las cepas de las especies *Saccharomyces cerevisiae*, preferiblemente cepas que son resistentes a niveles altos de etanol, es decir, hasta, por ejemplo, aproximadamente 10, 12,15 o 20 vol. % o más de etanol.

15 [0077] La hidrólisis enzimática se realiza preferiblemente en un entorno acuoso adecuado bajo condiciones que pueden fácilmente ser determinadas por un experto en la técnica. La hidrólisis se puede realizar en unas condiciones adecuadas, preferiblemente óptimas para la enzima(s) en cuestión.

20 [0078] El tiempo adecuado de proceso, la temperatura y las condiciones del pH pueden ser determinadas inmediatamente por un experto en la técnica. Preferiblemente, la hidrólisis se realiza a una temperatura entre 25 y 70°C, preferiblemente entre 40 y 60°C, especialmente alrededor de 50°C. La etapa se lleva a cabo preferiblemente en una gama del pH entre 3-8, preferiblemente entre el pH 4-6. La hidrólisis se realiza normalmente entre 12 y 96 horas, preferible entre 16 y 72 horas, de forma más preferible entre 24 y 48 horas.

25 [0079] La fermentación del material derivado de lignocelulosa se realiza como se ha descrito anteriormente.

Material que contiene lignocelulosa (biomasa)

30 [0080] Cualquier material adecuado que contiene lignocelulosa se contempla en el contexto de la presente invención. El material que contiene lignocelulosa puede ser cualquier material que contiene lignocelulosa. El material que contiene lignocelulosa contiene al menos el 50% en peso de lignocelulosa, preferiblemente al menos el 70% en peso, de forma más preferible al menos el 90 % en peso. Debe entenderse que el material que contiene lignocelulosa también puede comprender otros constituyentes como material celulósico, celulosa, hemicelulosa y también puede comprender constituyentes tales como azúcares, azúcares fermentables y/o azúcares no fermentables.

35 [0081] Generalmente, el material que contiene lignocelulosa se encuentra, por ejemplo, en los tallos, hojas, cascotes, cáscaras, y mazorcas de plantas u hojas, derivaciones, y en la madera de los árboles. El material lignocelulósico puede también ser, aunque no está limitado a, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos de silvicultura, residuos sólidos municipales, papel usado, pulpa y residuos de fábrica de papel. Se entiende en este documento que el material que contiene lignocelulosa puede tener forma de material de pared celular vegetal que contiene lignina, celulosa, y hemicelulosa en una matriz mezclada.

40 [0082] El material que contiene lignocelulosa se puede seleccionar de una o varias fibras de maíz, paja de arroz, madera de pino, astillas de madera, álamo, bagazo, y papel y residuos de tratamiento de pulpa.

45 [0083] Otros ejemplos de material con lignocelulosa adecuados incluyen rastrojos de maíz, mazorcas de maíz, madera dura como el álamo y el abedul, madera blanda, paja de cereal como la paja de trigo, pasto varilla, *miscanthus*, cáscaras de arroz, residuos de sólidos municipales (MSW), residuos orgánicos industriales, papel de oficina, o mezclas derivadas.

50 [0084] El material que contiene lignocelulosa puede ser de forraje de maíz o mazorcas de maíz. El material que contiene lignocelulosa puede ser de fibra de maíz. El material que contiene lignocelulosa puede ser de pasto varilla. El material que contiene lignocelulosa puede ser de bagazo.

Enzimas

55 [0085] Incluso si no se menciona específicamente en el contexto del proceso de la invención, debe tenerse en cuenta que una o varias de las enzimas usadas en cualquier proceso de la invención se usan en una "cantidad efectiva"

Actividad celololítica

60 [0086] La construcción "actividad celolítica" como se utiliza en este caso, se entiende como que comprende 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).

5 [0087] Al menos tres categorías de enzimas son importantes para la conversión de celulosa en azúcares fermentables: endoglucanasas (EC 3,2,1,4) que corta al azar cadenas de celulosa; celobiohidrolasas (EC 3,2,1,91) que disocia unidades celobiosilo de las extremidades de cadena de celulosa y beta-glucosidasas (EC 3,2,1,21) que convierten la celobiosa y las celodextrinas solubles en glucosa. Entre estas tres categorías de enzimas implicadas en la biodegradación de celulosa, las celobiohidrolasas parecen ser las enzimas clave para degradar la celulosa cristalina nativa.

10 [0088] La actividad celulolítica puede estar en forma de una preparación de enzimas de origen fúngico, tal como de una cepa del género *Trichoderma*, preferiblemente una cepa *Trichoderma reesei*; una cepa del género *Humicola*, tal como una cepa de *Humicola insolens*; o una cepa de *Chrysosporium*, preferiblemente una cepa de *Chrysosporium lucknowense*.

15 [0089] La preparación celulolítica de enzima puede contener una o varias de las siguientes actividades: celulasa, hemicelulasa, actividad de aumento de enzima celulolítica, actividad de beta-glucosidasa, endoglucanasa, celobiohidrolasa, o xilosa isomerasa.

20 [0090] La celulasa puede ser una composición tal y como se define en PCT/US2008/065417 publicado como WO 2008/151079. Específicamente, la composición de celulasa puede ser la usada en ejemplo 1 (preparación con celulasa 2) descrita a continuación. La preparación de enzima celulolítica que comprende un polipéptido que tiene actividad de mejora celulolítica, es preferiblemente un polipéptido de familia GH61A, preferiblemente el descrito en el documento WO 2005/074656 (Novozymes). La preparación de enzima celulolítica puede comprender además una beta-glucosidasa, como una beta-glucosidasa derivada de una cepa del género *Trichoderma*, tal como *Trichoderma reesei*, *Aspergillus*, como *Aspergillus fumigatus* (WO 2005/047499) o *Aspergillus oryzae* (WO 2002/095014), o *Penicillium*, como *Penicillium brasilianum*, con la proteína de fusión de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* con actividad de beta-glucosidasa descrita en WO 2008/057637.

30 [0091] La preparación de enzima celulolítica también puede comprender una enzima CBH II, preferiblemente celobiohidrolasa CEL6A de *Thielavia terrestris* II. La preparación de enzima celulolítica también puede comprender enzimas celulolíticas, preferiblemente los derivados de *Trichoderma reesei*, *Humicola insolens* o *Chrysosporium lucknowense*.

35 [0092] La preparación de enzima celulolítica también puede comprender un polipéptido con actividad de mejora celulolítico (GH61A) descrita en WO 2005/074656; una beta-glucosidasa (proteína de fusión descrita en WO 2008/057637) y enzimas celulolíticas derivadas de *Trichoderma reesei*.

40 [0093] La preparación celulolítica puede comprender celulasas de *Trichoderma reesei*, polipéptido GH61A de *Thermoascus aurantiacus* con actividad de aumento celulolítico (WO 2005/074656), proteína de fusión de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (WO 2008/057637), y xilanasas de *Aspergillus aculeatus* (Xyl II en WO 94/21785).

45 [0094] La preparación celulolítica puede comprender celulasas de *Trichoderma reesei*, polipéptido GH61A de *Thermoascus aurantiacus* con actividad de aumento celulolítico (WO 2005/074656), beta-glucosidasa 3A de la familia *Aspergillus fumigatus* (WO 2005/047499), y xilanasas de *Aspergillus aculeatus* (Xyl II en WO 94/21785).

50 [0095] La enzima celulolítica puede estar disponible comercialmente a través del producto CELLUCLAST® 1,5L, CELLUZIME™, Cellic™ CTec, o Cellic™ CTec2 disponible de Novozymes A/S, Dinamarca, o ACCELERASE™ 1000, ACCELERASE™ 1500 o ACCELERASE™ DUET (de Danisco EEUU Inc., EEUU) y FIBERZYME™ de Dyadic Inc, EEUU.

55 [0096] Se puede añadir una enzima celulolítica para la hidrolización del material que contiene lignocelulosa pretratada. La enzima celulolítica se puede dosificar en la gama 0.1-100 FPU por gramo de sólidos totales (TS), preferiblemente 0.5-50 FPU por gramo TS, especialmente 1-20 FPU por gramo TS. Al menos 0.1 mg de enzima celulolítica por gramo de sólidos totales (TS), preferiblemente al menos 3 mg de enzima celulolítica por gramo TS, entre 5 y 10 mg de enzima(s) celulolítica por gramo TS se puede utilizar para la hidrólisis.

Endoglucanasa (EG)

60 [0097] El término "endoglucanasa" hace referencia a un endo-1,4-(1,3, 1,4)-beta-D-glucano 4-glucanohidrolasa (E.C. nº 3,2,1,4), que cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glicosídicos en la celulosa, derivados químicos de la

celulosa (como celulosa de carboximetil y celulosa de hidroxietilo), liquenina, 1,4 de beta enlaces en mezclas 1,3 de beta glucanos tales como beta-D-glucanos de cereal o xiloglucanos, y otro material vegetal que contiene componentes celulósicos. La actividad de la endoglucanasa se puede determinar usando la carboximetilcelulosa (CMC) hidrólisis según el procedimiento de Ghose, 1987, Pure and Appl. Chem. 59: 257-268.

5

[0098] Las endoglucanasas pueden derivar de una cepa del género *Trichoderma*, preferiblemente una cepa de *Trichoderma reesei*; una cepa del género *Humicola*, como una cepa *Humicola insolens*; o una cepa de *Chrysosporium*, preferiblemente una cepa de *Chrysosporium lucknowense*.

#### 10 Celobiohidrolasa (CBH)

[0099] El término medios "celobiohidrolasa" 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, celo-oligosacáridos, o cualquier glucosa beta-1,4-semejante que contiene polímero, liberación de celobiosa tras la reducción o no de las extremidades de la cadena.

15

[0100] Los ejemplos de celobiohidrolasas se mencionan arriba incluyendo CBH I y CBH II de *Trichoderma reesei*; *Humicola insolens* y CBH II de celobiohidrolasa de *Thielavia terrestris* (CEL6A).

[0101] La actividad de celobiohidrolasa puede determinarse según los procedimientos descritos por Lever et al., 1972, Anal. Biochem. 47: 273-279; van Tilbeurgh et al., 1982, FEBS letters 149: 152-156; y van Tilbeurgh y Claeysens, 1985, FEBS van 187: 283-288. El método de Lever et al. es adecuado para la evaluación de la hidrólisis de la celulosa en rastrojos de maíz y el método de van Tilbeurgh et al. es adecuado para determinar la actividad de celobiohidrolasa en un derivado de disacárido fluorescente.

#### 25 Beta-glucosidasa

[0102] Una o varias beta-glucosidasas pueden estar presentes durante la hidrólisis.

[0103] El término "beta-glucosidasa" hace referencia a una glucosidasa de beta-D-glucósido (E.C. 3,2,1,21), que cataliza la hidrólisis de residuos terminales no reducidos de beta-D-glucosa con la liberación de beta-D-glucosa. 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, se emplean como se describe a continuación. Una unidad de actividad de beta-glucosidasa se define como 1.0  $\mu$ 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 citrato sódico, 0.01 % TWEEN® 20.

35

[0104] La beta-glucosidasa puede ser de origen fúngico, tal como una cepa del género *Trichoderma*, *Aspergillus* o *Penicillium*. La beta-glucosidasa se puede derivar de *Trichoderma reesei*, como la beta-glucosidasa codificada por el gen *bg11* (ver Fig. 1 de EP 562003). La beta-glucosidasa puede derivar de *Aspergillus oryzae* (producida por recombinación en *Aspergillus oryzae* según WO 2002/095014). La beta-glucosidasa puede derivar de *Aspergillus fumigatus* (producida por recombinación en *Aspergillus oryzae* según WO 2005/047499) o *Aspergillus niger* (1981, J. Appl. 3: 157-163). La beta-glucosidasa puede derivar de *Penicillium brassilianum* descrita en WO 2009/111706.

40

#### 45 Hemicelulasa

[0105] La hemicelulosa puede ser descompuesta por hemicelulasas y/o hidrólisis ácida para liberar sus cinco o seis componentes de azúcar de carbono.

45

[0106] El material derivado de lignocelulosa se puede tratar con una o varias hemicelulasas.

50

[0107] Cualquier hemicelulasa adecuada para usarse en la hidrolización de hemicelulosa, preferiblemente puede utilizarse en xilosa. Las hemicelulasas preferidas incluyen xilanasas, arabinofuranosidasas, esterasa de xilano de acetilo, esterasa de feruloil, glucuronidasas, endo-galactanasa, manasas, endo o exo arabinasas, exo-galactanses, y mezclas de dos o más de los mismos. Preferiblemente, la hemicelulasa para usar en la presente invención es una hemicelulasa que actúa de manera exógena, y de forma más preferible, la hemicelulasa es una hemicelulasa que actúa de manera exógena que tiene la capacidad de hidrolizar hemicelulosa en condiciones ácidas por debajo del pH 7, preferiblemente pH 3-7. Un ejemplo de hemicelulasa adecuado para usar en la presente invención incluye VISCOZYME™ (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

55

[0108] La hemicelulasa puede ser una xilanasas. La xilanasas puede preferiblemente tener un origen microbiano, así como origen fúngico (por ejemplo, *Trichoderma*, *Meripilus*, *Humicola*, *Aspergillus*, *Fusarium*) o una bacteria (por ejemplo,

60

Bacillus). La xilanasa puede derivar de un hongo filamentoso, preferiblemente derivado de una cepa de *Aspergillus*, como *Aspergillus aculeatus*; o de una cepa de *Humicola*, preferiblemente *Humicola lanuginosa*. La xilanasa puede preferiblemente ser una xilanasa endo-1,4-beta-, de forma más preferible una endo-1,4-beta-xilanasa de GH10 o GH11. Los ejemplos de xilanasas comerciales incluyen SHEARZYME™, Cellic™HTec, Cellic™HTec2 y BIOFEED WHEAT™ de Novozymes A/S, Dinamarca.

[0109] La hemicelulasa se puede añadir en una cantidad eficaz para hidrolizar la hemicelulosa, como en cantidades de aproximadamente 0,001 a 0,5 % en peso de sólidos totales (TS), de forma más preferible de aproximadamente 0,05 a 0,5 % en peso de TS.

[0110] Las xilanasas se pueden añadir en cantidades de sustrato de 0,001-1,0 g/kg DM (sustancia seca), preferiblemente en las cantidades de sustrato de 0,005-0,5 g/kg DM, y de la forma más preferible de sustrato de 0,05-0,10 g/kg DM.

#### Isomerasa de xilosa

[0111] Las isomerasas de xilosa (D-xilosa ketol-isomerasa) (E.C. 5,3,1,5.) son enzimas que catalizan la reacción de isomerización reversible de D-xilosa para la D-xilulosa. Algunas isomerasas de xilosa también convierten la isomerización reversible de D- glucosa a D- fructosa. Por lo tanto, se hace referencia a veces a la isomerasa de xilosa como "isomerasa de glucosa".

[0112] Una isomerasa de xilosa usada en un proceso de la invención puede ser cualquier enzima con actividad de isomerasa de xilosa y puede derivar de cualquier fuente, preferiblemente de origen fúngico o bacteriano, tales como hongos filamentosos o levadura. Ejemplos de isomerasas de xilosa bacterianas se incluyen aquellas del género *Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Bacillus* y *Flavobacterium*, y *Thermotoga*, incluyendo *T. neapolitana* (Vieille et al., 1995, Appl. Environ. Microbiol. 61(5): 1867- 1875) y *T. maritime*.

[0113] Los ejemplos de isomerasas de xilosa fúngicas derivan de especies de basidiomicetos.

[0114] Una isomerasa de xilosa preferida deriva de una cepa del género de levadura *Candida*, preferiblemente una cepa de *Candida boidinii*, especialmente la isomerasa de xilosa *Candida boidinii* descrita, por ejemplo, por Vongsuvanlert et al., 1988, Agric. Biol. Chem. 52(7): 1817-1824. La isomerasa de xilosa 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. 33: 1519-1520 o Vongsuvanlert et al., 1988, Agric. Biol. Chem. 52(2): 1519-1520.

[0115] La isomerasa de xilosa puede derivar de una cepa de *Streptomyces*, por ejemplo, derivada de una cepa de *Streptomyces murinus* (patente EEUU nº 4.687.742); *S. flavovirens*, *S. albus*, *S. achromogenus*, *S. echinatus*, *S. wedmorensis* todos se encuentran descritos en la patente EEUU nº 3.616.221. Otras isomerasas de xilosa se describen en la patente EEUU nº 3.622.463, patente EEUU nº 4.351.903, patente EEUU nº 4.137.126, patente EEUU nº 3.625.828, HU patente nº 12.415, DE patente 2.417.642, JP patente nº 69.28.473, y WO 2004/044129.

[0116] La isomerasa de xilosa puede tener una forma inmobilizada o líquida. Se prefiere la forma líquida.

[0117] Los ejemplos de isomerasas de xilosa disponibles comercialmente incluyen SWEETZYME™ T de Novozymes A/S, Dinamarca.

[0118] La isomerasa de xilosa se añade para proporcionar un nivel de actividad en la gama de 0,01-100 IGIU por gramo total de sólido.

#### Actividad de aumento celulolítico

[0119] Como se ha mencionado anteriormente, los polipéptidos con actividad de aumento celulolítico mejoran la hidrólisis de un material derivado de lignocelulosa catalizado por proteínas con actividad celulolítica reduciendo la cantidad de enzima celulolítica requerida para alcanzar el mismo grado de hidrólisis. Tal mejora es preferiblemente al menos 0.1 veces, de forma más preferible al menos 0.2 veces, de forma más preferible al menos 0.3 veces, de forma más preferible al menos 0.4 veces, de forma más preferible al menos 0.5 veces, de forma más preferible al menos 1 vez, de forma más preferible al menos 3 veces, de forma más preferible al menos 4 veces, de forma más preferible al menos 5 veces, de forma más preferible al menos 10 veces, de forma más preferible al menos 20 veces, incluso de forma más preferible al menos 30 veces, de la forma más preferible al menos 50 veces, e incluso de forma más preferible al menos 100 veces.

[0120] La hidrólisis y/o fermentación se puede realizar en presencia de una enzima celulolítica en combinación con un polipéptido con actividad en aumento.

[0121] El polipéptido con actividad de aumento celulolítico es un polipéptido GH61.

5 [0122] El polipéptido con actividad de aumento puede ser un polipéptido de la familia GH61A. WO 2005/074656 divulga un polipéptido aislado con una actividad de aumento celulolítico y un polinucleótido de lo mismo a partir de *Thermoascus aurantiacus*. El polipéptido GH61A puede ser descrito en WO 2005/074656 como SEC ID NO:1 o SEC ID n°: 2.

10 [0123] El polipéptido GH61 puede ser un polipéptido GH61E. WO 2005/074647 divulga polipéptidos aislados con actividad de aumento celulolítico y polinucleótidos de los mismos a partir de *Thielavia terrestris*. El polipéptido GH61 E puede estar descrito en WO 2005/074647 como SEC ID n°: 7 o SEC ID n°: 8.

[0124] El polipéptido GH61 puede ser un polipéptido GH61 B. El polipéptido GH61 B puede derivar de *Aspergillus fumigates*, preferiblemente el GH61 B descrito en WO 2010/138754 como SEC ID n°: 1 o SEC ID n°: 2.

15 [0125] La solicitud publicada EEUU n° 2007/0077630 divulga un polipéptido aislado con actividad de aumento celulolítico y un polinucleótido de lo mismo a partir de *Trichoderma reesei*.

20 [0126] Los ejemplos adecuados de polipéptidos con actividad de aumento celulolítico incluyen aquellos descritos en cualquiera de las siguientes publicaciones: WO 2005/074647, WO 2008/148131, WO 2009/085935, WO 2009/085859, WO 2009/085864, WO 2009/085868, WO 2010/065830, WO 2010/138754, WO 2011/005867, WO 2011/039319, WO 2011/041397, WO 2011/035027, y WO 2011/041504.

#### Proteasas

25 [0127] Se puede añadir una proteasa durante la hidrólisis en el paso b), fermentación en el paso c). Se puede añadir la proteasa para reducir el organismo de fermentación, especialmente la levadura, durante la fermentación. La proteasa puede ser cualquier proteasa. La proteasa puede ser una proteasa ácida de origen microbiano, preferiblemente de origen bacteriano o fúngico. Se prefiere una proteasa fúngica ácida, pero también se pueden usar otras proteasas.

30 [0128] Las proteasas adecuadas incluyen proteasas microbianas, tales como proteasas bacterianas y fúngicas. Las proteasas preferidas son proteasas ácidas, es decir, proteasas caracterizadas por la capacidad de hidrolizar proteínas en condiciones ácidas inferiores a pH 7.

35 [0129] Las proteasas fúngicas de ácido contempladas incluyen proteasas fúngicas derivadas de *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Candida*, *Coriolus*, *Endothia*, *Entomophtra*, *Irpex*, *Penicillium*, *Sclerotium* y *Torulopsis*. Se contemplan especialmente 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* (Haiashida et al., 1977, Agric. Biol. Chem. 42(5), 927-933, *Aspergillus aculeatus* (WO 95/02044), o *Aspergillus oryzae*, tal como el pepA proteasa; y proteasas ácidas de *Mucor pusillus* o *Mucor miehei*.

40 [0130] Se contemplan las proteasas neutras o alcalinas, como una proteasa derivada de una cepa de *Bacillus*. Se contempla una proteasa en particular en la invención que deriva de *Bacillus amyloliquefaciens* y tiene la secuencia obtenible en Swissprot como accesión n° P06832. También se contemplan las proteasas con al menos el 90% de identidad de la secuencia de aminoácidos obtenibles en Swissprot como Número de Acceso. P06832 como al menos  
45 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o particularmente al menos 99% de identidad.

[0131] Además se contemplan las proteasas con al menos el 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos descrita como SEC ID n°: 1 en WO 2003/048353 como al 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o particularmente al menos 99% de identidad.  
50

[0132] También se contemplan proteasas parecidas a la papaína tales como proteasas dentro de E.C. 3,4,22.\* (proteasa de cisteína), EC 3,4,22,2 (papaína), EC 3,4,22,6 (quimopapaína), EC 3,4,22,7 (asclepaina), EC 3,4,22,14 (actinidaina), EC 3,4,22,15 (catepsina L), EC 3,4,22,25 (endopeptidasa de glicil) y EC 3,4,22,30 (caricaina).

55 [0133] La proteasa puede ser una preparación de proteasa derivada de una cepa de *Aspergillus*, tal como el *Aspergillus oryzae*. En otra forma de realización, la proteasa deriva de una cepa de *Rhizomucor*, preferiblemente *Rhizomucor meihei*. La proteasa puede ser una preparación de proteasa, preferiblemente una mezcla de una preparación proteolítica derivada de una cepa de *Aspergillus*, como *Aspergillus oryzae*, y una proteasa derivada de una cepa de *Rhizomucor*, preferiblemente *Rhizomucor meihei*.  
60

[0134] Las proteasas de ácido aspártico se describen en, por ejemplo, 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 Berka et al., 1990, gen 96:313; Berka et al., 1993, gen 125: 195-198; y Gomi et al., 1993, Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1095-1100.

5 [0135] Los productos comercialmente disponibles incluyen ALCALASE®, ESPERASE™, FLAVOURZYME™, PROMIX™, NEUTRASE®, RENNILASE®, NOVOZYM™ FM 2.0L, y NOVOZYM™ 50006 (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca) y GC106™ y SPEZYME™ FAN de Genencor Int., Inc., EEUU.

10 [0136] La proteasa puede estar presente en una cantidad de 0,0001-1 mg de proteína enzimática por g DS, preferiblemente de 0,001 a 0,1 mg de proteína enzimática por g DS. Alternativamente, la proteasa puede estar presente en una cantidad de 0,0001 a 1 LAPU/g DS, preferiblemente de 0,001 a 0,1 LAPU/g DS y/o de 0,0001 a 1 mAU-RH/g DS, preferiblemente de 0,001 a 0,1 mAU-RH/g DS.

#### Uso

15 [0137] En este aspecto la invención se hace referencia al uso de los polipéptidos GH61 en un proceso de fermentación donde dichos polipéptidos son agregados una vez que la hidrólisis se completa. En una forma de realización, los polipéptidos GH61 se usan para mejorar el rendimiento del producto de fermentación. En una forma de realización, los polipéptidos GH61 se usan para aumentar el índice de fermentación durante la fermentación.

20

#### Materiales & métodos

##### Materiales:

25

[0138] GH61A de *Thermoascus aurantiacus* como se describe en WO 2005/074656 como SEC ID NO:1 y SEC ID n°: 2.

[0139] GH61E de *Thielavia terrestris* como se describe en WO 2005/074647 como SEC ID n°: 7 y SEC ID n°: 8.

30 [0140] GH61B de *Aspergillus fumigatus* como se describe en PCT/US10/036461 (publicado como WO 2010/138754) como SEC ID n°: 1 y SEC ID n°: 2.

##### Preparación con celulasa 2:

35 [0141] Celulasas de *Trichoderma reesei*, polipéptido GH61A de *Thermoascus aurantiacus* con actividad de aumento celolítico (SEC ID NO:1 y SEC ID n°: 2 en WO 2005/074656), beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (SEC ID n°: 2 de WO 2005/047499) y xilanasa de *Aspergillus aculeatus* (Xyl II descrito en WO 94/21785).

40 [0142] La levadura RWB218 fue recibida de Royal Nedalco/ Países Bajos y se describe en Kuyper et al., 2005, FEMS Yeast Research 5: 925-934.

[0143] Los rastrojos de maíz pretratados sin lavar (PCS): ácido catalizado, explosión de vapor obtenida del Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL), Golden, CO.

##### Métodos:

##### Identidad

50 [0144] La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de polinucleótidos se describe por el parámetro "identidad".

55 [0145] El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina por el método Clustal (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) utilizando el Software MEGALIGN™ de LASERGENE™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiple: penalización de intervalo de 10 y penalización de longitud de intervalo de 10. Los parámetros de alineamiento por parejas son Ktuple=1, intervalo de penalización=3, ventanas=5, y diagonales=5.

60 [0146] El grado de identidad entre dos secuencias polinucleótidas se determina por el método Wilbur-Lipman (Wilbur y Lipman, 1983, Proceedings of the National Academy of Science USA 80: 726-730) utilizando el Software MEGALIGN™ de LASERGENE™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiple: penalización de intervalo de 10 y penalización de longitud de intervalo de 10.

Parámetros de alineamiento de pareja son Ktuple=3, intervalos de penalti=3, y ventanas=20.

Ensayo sobre la medición de la actividad de celulasa usando el papel de filtro (FPU ensayo)

5 1. Fuente de método

[0147]

10 1.1 El método se describe en un documento titulado "Measurement of Cellulase Activities" de Adnei y Baker, 1996, Laboratory Analytical Procedure, LAP-006, National Renewable Energy Laboratory (NREL ). Se basa en el método de IUPAC para medir la actividad de celulasa (Ghose, 1987, Measurement of Cellulase Activities, Pure & Appl. Chem. 59: 257-268).

15 2. Procedimiento

[0148]

20 2.1 El método se realiza como se describe por Adnei y Baker, 1996, supra, salvo el uso de 96 placas de pocillos para leer los valores de absorbancia después del desarrollo del color, como se describe a continuación.

2.2 Tubos de ensayo enzimáticos:

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

25 2.2.2 Al tubo se le añade 1.0 mL de 0.05 M tampón de na-citrato (pH 4.80).

2.2.3 Los tubos que contienen papel de filtro y tampón son incubados 5 min. a 50°C (± 0.1°C) en un baño de maría.

2.2.4 La incubación siguiente, se añade al tubo 0.5 mL de dilución de enzima en el tampón de citrato. Las diluciones enzimáticas se diseñan por producir valores ligeramente por encima y por debajo del valor asignado de 2.0 mg glucosa.

30 2.2.5 El contenido del tubo se mezcla agitándolo suavemente durante 3 segundos.

2.2.6 Después de agitarlo, los tubos se incuban durante 60 min. a 50°C (± 0.1°C) en un baño de maría.

2.2.7 Inmediatamente después del 60 min. incubación, los tubos son quitados del baño de María, y se añade en cada tubo 3,0 mL de DNS reactivo para parar la reacción. Los tubos se agitan 3 segundos para realizar la mezcla.

35 2.3 Blanco y controles

2.3.1 El blanco de reactivo se prepara añadiendo 1.5 mL de tampón de citrato a una probeta.

2.3.2 Un control de sustrato se prepara con la colocación de una banda de papel de filtro laminado en el fondo de una probeta, y la adición de 1.5 mL de tampón de citrato.

40 2.3.3 Los controles enzimáticos se preparan para cada dilución enzimática mediante la mezcla de 1.0 mL de tampón de citrato con 0.5 mL de la dilución apropiada de enzima.

2.3.4 Se evalúan de la misma manera tanto el blanco de reactivo, el control de sustrato, y los controles enzimáticos como los tubos de ensayo enzimático, y hechos junto con éstos.

2.4 Estándares de glucosa

45 2.4.1 Se prepara una solución madre de 100 mL de glucosa (10.0 mg/mL), y se congelan 5 mL de alícuotas. Antes de su uso, se descongelan las alícuotas y se agitan para su mezcla.

2.4.2 Las diluciones de la solución madre se han hecho en el tampón de citrato de la siguiente manera:

50 G1 = 1.0 mL materia prima + 0.5 mL tampón = 6.7 mg/mL = 3.3 mg/0.5 mL

G2 = 0.75 mL materia prima + 0.75 mL tampón = 5.0 mg/mL = 2.5 mg/0.5 mL

G3 = 0.5 mL materia prima + 1.0 mL tampón = 3.3 mg/mL = 1.7 mg/0.5 mL

G4 = 0.2 mL materia prima + 0.8 mL tampón = 2.0 mg/mL = 1.0 mg/0.5 mL

55 2.4.3 Los tubos de estándar de glucosa se preparan añadiendo 0.5 mL de cada dilución a 1.0 mL de tampón de citrato.

2.4.4 Los tubos de estándar de glucosa se evalúan de la misma manera que los tubos de ensayo enzimático, y han sido hechos junto a estos.

60 2.5 Desarrollo de color

2.5.1 Después de los 60 min. de incubación y la adición de DNS, todos los tubos se hierven juntos durante 5 min. al baño de maría.

2.5.2 Después de hervir, se enfrían inmediatamente en un baño de hielo/agua.

5 2.5.3 Cuando se enfrían, los tubos se agitan brevemente, y la pulpa puede depositarse. Después cada tubo se diluye añadiendo 50 microL del tubo a 200 microL de ddH<sub>2</sub>O en una placa de 96 pocillos. Se mezcla cada pocillo y se lee en la absorbancia 540 nm.

2.6 Cálculos (los ejemplos se dan en el documento NREL)

10 2.6.1 Una curva estándar de glucosa se prepara mediante un gráfico de concentración de glucosa (mg/0.5 mL) para los cuatro estándares (G1-G4) vs. A540. Este está equipado con 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 enzimáticos.

2.6.2 Se prepara el gráfico de glucosa producido (mg/0.5 mL) vs. dilución de enzima total, con el eje Y (dilución enzimática) que está en una escala logarítmica.

15 2.6.3 Se traza una línea entre la dilución enzimática que ha producido glucosa justo por encima de 2,0 mg y la dilución producida justo por debajo. De esta línea, se determina la dilución enzimática que tendría que haber producido exactamente 2,0 mg de glucosa.

2.6.4 Las Unidades del papel de filtro/ml (FPU/mL) se calculan de la siguiente manera:

20  $FPU/ml = 0,37/ \text{dilución enzimática que produce } 2,0 \text{ mg glucosa}$

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

25 [0149] El PCS sin lavar NREL se hidrolizó al 20% de los sólidos totales (TS) cargado con la preparación de celulasa entre 2 y 8 días. Tras la hidrólisis, se centrifugó toda la suspensión y se separaron el sólido y el líquido (sobrenadante), el sobrenadante se fermentó con 5 g/L de levadura RWB218 con la adición de GH61A (0,1 mg/ml). La Figura 1 demuestra el efecto de la adición de GH61A en el rendimiento del etanol como medida de HPLC. La Figura 2 y la figura 30 3 demuestran el efecto de GH61A en los índices de consumo tanto de glucosa como de xilosa.

#### Ejemplo 2

35 [0150] El PCS sin lavar NREL se hidrolizó como en el ejemplo 1. Tras el centrifugado, el sobrenadante recogido se divide y se trata con varios polipéptidos GH61 como se indica en la tabla 1. La tabla 1 demuestra el efecto de diferentes polipéptidos GH61 en el rendimiento del etanol como se mide mediante el HPLC. Los valores se expresan en porcentaje el rendimiento del etanol con respecto a la cantidad teórica de etanol que se puede producir a partir del sustrato asumiendo que un 100% de los azúcares fermentables del sustrato se convierten en etanol.

40 Tabla 1

GH61	TS%	Dosificación de polipéptido GH61 (mg-Proteína/g- TS)			
		0	0,5	1	2
T. aurantiacus (GH61A)	20	76,7%	81,5%	75,7%	83,2% <sup>45</sup>
A. fumigatus (GH61B)	16	79,4%	81,4%	81,5%	81,2%
T. terrestris (GH61E)	16	79,4%	80,5%	81,4%	82,2%

50

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Proceso para la producción de un producto de fermentación a partir de un material que contiene lignocelulosa, que incluye las etapas de:
- (a) pretratamiento del material que contiene lignocelulosa;  
(b) hidrolizar el material de la etapa (a);  
10 (c) fermentar con un organismo de fermentación en el que se añaden uno o varios polipéptidos GH61 tras completar la hidrólisis.
- 15 2. Proceso según la reivindicación 1, en el que el material que contiene lignocelulosa se origina a partir de materiales seleccionados del grupo consistente en rastrojos de maíz, mazorcas de maíz, fibra de maíz, madera dura, madera de coníferas, paja de cereal, paja de trigo, pasto varilla, cáscaras de arroz, Miscanthus, residuos sólidos municipales, residuos orgánicos industriales, bagazo, y papel de oficina, o mezclas derivadas.
- 20 3. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el material que contiene lignocelulosa es químicamente, mecánicamente o biológicamente pretratado en la etapa (a).
4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el organismo de fermentación es un organismo de fermentación C6 o C5.
5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el producto de fermentación es etanol.
- 25 6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el producto de fermentación se recupera por destilación.
7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el polipéptido GH61 se dosifica en una concentración de 0,01-10 mg de proteína/g de sólidos totales (TS).
- 30 8. Uso de polipéptidos GH61 en un proceso de fermentación para aumentar el índice de fermentación durante la fermentación, donde se añaden uno o varios polipéptidos GH61 una vez que se completa la hidrólisis.
9. Uso según la reivindicación 8, donde el proceso de fermentación es un proceso para producir etanol.

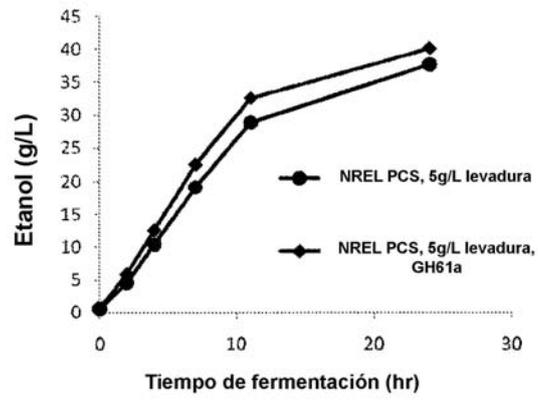


Fig. 1

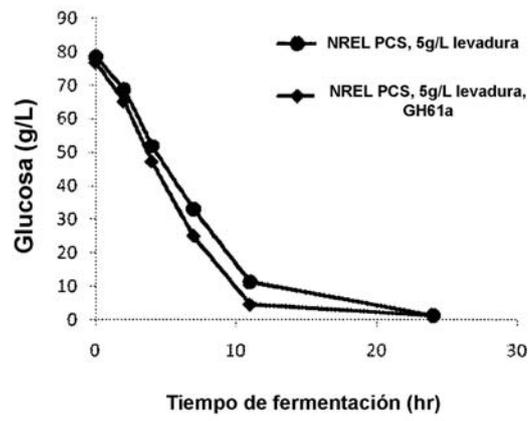


Fig. 2

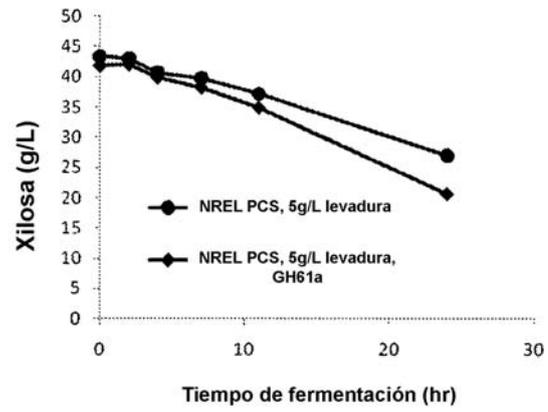


Fig. 3