(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 539 370**

(51) Int. CI.:

C12P 1/00 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
C12P 7/16 (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2011 E 11717903 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2563924**

(54) Título: **Proceso para separación líquido/sólido de un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica**

(30) Prioridad:

28.04.2010 US 328804 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.06.2015

(73) Titular/es:

E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY (100.0%)
1007 Market Street
Wilmington, Delaware 19898, US

(72) Inventor/es:

HENNESSEY, SUSAN, MARIE;
MITCHELL, ANNEMARIE y
STOLARSKI, MATHIAS, E.

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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 para separación líquido/sólido de un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica

Campo de la invención

La invención se refiere al campo de la tecnología de procesos de fermentación. Específicamente, se ha descubierto que la separación de caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica en fracciones líquida y sólida aumenta su eficiencia por aplicación de un tratamiento térmico.

Antecedentes de la invención

Las materias primas y desechos celulósicos y lignocelulósicos, tales como desechos agrícolas, madera, desechos forestales, papillas de fabricación de papel, y desechos sólidos municipales e industriales, proporcionan una materia prima renovable potencialmente abundante para la fabricación de productos valiosos que incluyen alcoholes para uso como combustibles, y otros productos químicos. Las materias primas y desechos celulósicos y lignocelulósicos, compuestos de polímeros de carbohidratos que comprenden celulosa, hemicelulosa, y lignina se tratan generalmente por una diversidad de medios químicos, mecánicos y enzimáticos a fin de liberar fundamentalmente azúcares hexosa y pentosa en un hidrolizado que puede fermentarse para fabricar productos útiles utilizando un biocatalizador.

Además de los azúcares metabolizables que están presentes en la biomasa hidrolizada, el hidrolizado incluye lignina no digerida y otros componentes de biomasa que son transportados conduciendo al aislamiento de productos y procesos aguas abajo. Estos componentes del hidrolizado, mezclados con el biocatalizador y otros componentes del caldo de fermentación, requieren ser procesados además del producto principal. Particularmente en la producción de alcoholes para uso como combustible, donde los volúmenes de producción son muy altos, es importante el uso de agua pura como lo es el uso de energía fósil para producir el alcohol combustible. A fin de minimizar el uso de agua pura, el caldo de fermentación con el producto retirado puede reciclarse a etapas previas en el proceso, o se pueden separar los sólidos de este caldo y reciclarse la corriente líquida a etapas previas en el proceso (a lo que se hace referencia como retorno). Asimismo, la corriente líquida puede purificarse por diversos métodos antes del reciclo. La corriente sólida, que contiene un gran porcentaje de lignina, tiene escaso valor nutritivo como alimentación animal, pero puede utilizarse como combustible que se quema para proporcionar energía en el proceso de producción global.

Existen procesos de tratamiento para caldo de fermentación estándar, que no incluye hidrolizado de biomasa, y para corrientes de desecho de materiales biológicos. La mezcla de componentes en estos sistemas difiere de los de un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa, requiriendo por tanto el desarrollo de procesos específicamente adecuados para manipulación eficiente de la mezcla de caldo de hidrolizado.

Para la separación de fracciones líquida y sólida en el proceso de molienda en seco para producción de etanol, se utiliza típicamente centrifugación. Las centrífugas de tipo decantador horizontales de alta velocidad utilizadas típicamente no son eficientes en lo que respecta a la separación de los sólidos suspendidos y no son eficientes en la deshidratación de los sólidos. WO 2008076716 da a conocer el uso de floculantes polímeros aniónicos para mejorar la aglomeración de los sólidos en el concentrado procedente de las centrífugas, a fin de favorecer la separación sólido/liquido subsiguiente.

Puede utilizarse calor en el procesamiento en sistemas conocidos, usualmente en presencia de un agente floculante como en GB 1.413.236, utilizándose opcionalmente el calentamiento del caldo de cultivo (no-hidrolizado), que incluye un agente tensioactivo, a una temperatura de 70ºC a 95ºC durante 10 a 30 minutos se utiliza opcionalmente en la recuperación de L-lisina producida microbialmente. US 4.374.981 da a conocer métodos de separación de inosina y guanosina de caldo de fermentación (no-hidrolizado) que incluye calentamiento del caldo de fermentación a temperatura comprendida entre 90ºC y 110ºC durante 5 a 10 minutos, y separación por ultrafiltración.

US 2007017825 da a conocer procesos para tratamiento de corrientes de desechos de material biológico tales como desechos de cerdo, lactosuero de queso, y desechos de material biológico animal de establos. Los procesos incluyen degradación de al menos una porción de la corriente de desechos de material biológico en otros componentes o materiales que pueden reintroducirse en un proceso de fermentación. El tratamiento puede incluir ajuste del pH y tratamiento térmico seguido por eliminación del precipitado/agregado basada en densidad, por ejemplo por centrifugación.

Persiste necesidad de procesos eficientes y de bajo coste para el tratamiento de corrientes de producción secundarias a partir de caldo de fermentación que incluyan hidrolizado de biomasa lignocelulósica, particularmente donde tengan que procesarse grandes volúmenes de caldo.

Sumario de la invención

La invención proporciona un proceso para separación eficiente líquido/sólido en el procesamiento de un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica.

De acuerdo con ello, la invención proporciona un proceso para separación de una fracción líquida a partir de un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica que comprende:

a) proporcionar un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica que comprende un producto diana seleccionado del grupo constituido por etanol, butanol y 1,3-propanodiol;

b) opcionalmente, retirar el producto diana del caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica de (a), produciendo un caldo empobrecido;

c) tratar térmicamente el caldo de (a) o el caldo empobrecido de (b) a una temperatura y durante un tiempo suficientes para producir un caldo o caldo empobrecido que tiene una resistencia de la torta de filtración reducida al menos aproximadamente un 20% en comparación con el caldo inicial respectivo de (a) o el caldo empobrecido de (b); y

d) hacer pasar el caldo tratado o caldo empobrecido de (c) a través de un filtro, separando con ello una fracción líquida de una fracción sólida.

En una realización particular, la invención proporciona un proceso para la producción de etanol que comprende:

a) proporcionar un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica que comprende un producto etanol;

b) tratar el caldo de fermentación de (b) a una temperatura y durante un tiempo suficientes para producir un caldo calentado que tiene una resistencia de la torta de filtración reducida al menos aproximadamente un 20% en comparación con el caldo inicial de (a);

c) hacer pasar el caldo calentado de (b) a través de un filtro, separando con ello una fracción líquida de una fracción sólida; y

d) destilar la fracción líquida de (c) para producir una corriente de producto etanol y un líquido remanente.

En otra realización, la invención proporciona un proceso para la producción de etanol que comprende:

a) proporcionar un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica que comprende un producto etanol;

b) destilar el caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica de (a) para producir una corriente de producto etanol y una hez total;

c) tratar térmicamente la hez total de (b) a una temperatura y durante un tiempo suficientes para producir una hez total que tiene una resistencia de la torta de filtración reducida al menos aproximadamente un 20% en comparación con la hez total inicial de (b); y

d) hacer pasar la hez total de (c) a través de un filtro, con lo cual se separa una fracción líquida de una fracción sólida.

En una realización adicional, la invención proporciona un proceso para la producción de butanol que comprende:

a) proporcionar un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica que comprende un producto butanol;

b) extraer el butanol del caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica de (a) para producir una corriente de producto butanol y un caldo empobrecido;

c) tratar térmicamente el caldo empobrecido de (b) a una temperatura y durante un tiempo suficientes para producir un caldo empobrecido que tiene una resistencia de la torta de filtración reducida al menos aproximadamente un 20% de en comparación con el caldo empobrecido inicial de (b); y

d) hacer pasar el caldo empobrecido de (c) a través de un filtro, separando con ello una fracción líquida de una fracción sólida.

Tabla 1. Números SEQ ID de regiones codificantes y proteínas de glicosil-hidrolasas utilizadas en sacarificación

Enzima	SEQ ID NO: Aminoácido	SEQ ID NO: Codificante
Xyn3 de *Trichoderma reesei*	1	5
Fv3A de *Fusarium verticillioides*	2	6
Fv43D de *Fusarium verticillioides*	3	7

Enzima	SEQ ID NO: Aminoácido	SEQ ID NO: Codificante
Fv51A de *Fusarium verticillioides*	4	8

Información sobre cepas depositadas

Los Solicitantes han hecho los depósitos biológicos siguientes bajo los términos del Tratado de Budapest acerca del Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para Propósitos de Procedimiento de Patente:

Referencia de identificación del Depositante	Designación Internacional del Depositante	Fecha de Depósito
Zymomonas ZW658	ATCC No PTA-7858	Sept. 12, 2006

Descripción detallada de la invención

Cuando se incluye un hidrolizado de biomasa lignocelulósica en un medio de fermentación, el caldo de fermentación que resulta de la fabricación de un producto por un biocatalizador en el medio es una papilla compleja que incluye una mezcla de producto, células, lignina, y otros componentes de la biomasa. La separación de fracciones líquida y sólida del caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica es un paso de proceso importante que constituye un reto debido a la composición compleja de la mezcla de papilla. Por aplicación de un tratamiento térmico, el caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica puede convertirse en una forma que se filtra eficientemente, produciendo fracciones líquida y sólida para uso directo o para procesamiento ulterior. El líquido contenido en la fracción líquida separada puede procesarse ulteriormente y reciclarse al proceso de fermentación. El reciclo del líquido es valioso en un proceso comercial, especialmente en un proceso comercial de fermentación que utiliza un volumen elevado de líquido tal como en la producción de alcohol celulósico, que incluye la producción de los biocombustibles etanol y butanol.

Las definiciones y abreviaturas que siguen deben utilizarse para interpretación de las reivindicaciones y la memoria descriptiva.

Como se utilizan en esta memoria, los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "tiene", "que tiene", "contiene" o "que contiene", o cualquier otra variante de los mismos, tienen por objeto abarcar una inclusión no excluyente. Por ejemplo, una composición, una mezcla, proceso, método, artículo, o aparato que comprende una lista de elementos no está limitada necesariamente a sólo dichos elementos sino que puede incluir otros elementos no enumerados o inherentes expresamente a dicha composición, mezcla, proceso, método, artículo o aparato. Además, a no ser que se indique expresamente lo contrario, "o" se refiere a un o inclusivo y no a un o excluyente. Por ejemplo, una condición A o B es satisfecha por una cualquiera de las siguientes: A es verdadero (o está presente) y B es falso (o no está presente), A es falso (o no está presente) y B es verdadero (o está presente), y tanto A como B son verdaderos (o están presentes).

Asimismo, los artículos indefinidos "un" y "uno(a)" que preceden a un elemento o componente de la invención tienen por objeto no ser restrictivos en lo que respecta al número de casos (es decir apariciones) del elemento o componente. Por consiguiente "un" o "uno(a)" debe interpretarse como inclusivo de uno o al menos uno, y la forma de palabra singular del elemento o componente incluye también el plural a no ser que se entienda obviamente que el significado del número es singular.

El término "invención" o "presente invención", como se utiliza en esta memoria, es un término no limitante y no debe entenderse que se refiere a una sola realización de la invención particular, sino que abarca todas las realizaciones posibles como se describen en la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

Como se utiliza en esta memoria, el término "aproximadamente" modificativo de la cantidad de ingrediente o sustancia reaccionante de la invención empleada se refiere a variación en la cantidad numérica que puede existir, por ejemplo, por procedimientos típicos de medida y manipulación de líquidos utilizados para la fabricación de concentrados o utilización de soluciones en el mundo real; por error inadvertido en estos procedimientos; por diferencias en la fabricación, fuente, o pureza de los ingredientes empleados para fabricación de las composiciones o realización de los métodos; y análogos. El término "aproximadamente" abarca también cantidades que difieren debido a condiciones de equilibrio diferentes para una composición resultante de una mezcla inicial particular. Tanto si están modificadas por el término "aproximadamente" como si no lo están, las reivindicaciones incluyen equivalentes a las cantidades. En una realización, el término "aproximadamente" significa dentro de 10% del valor numérico consignado, preferiblemente dentro de 5% del valor numérico consignado.

El término "azúcar fermentable" se refiere a oligosacáridos y monosacáridos que pueden ser utilizados como una fuente de carbono por un microorganismo en un proceso de fermentación.

El término "lignocelulósico(a)" se refiere a una composición que comprende a la vez lignina y celulosa. El material lignocelulósico puede comprender también hemicelulosa.

El término "celulósico" se refiere a una composición que comprende celulosa y componentes adicionales, con inclusión de hemicelulosa.

El término "sacarificación" se refiere a la producción de azucares fermentables a partir de polisacáridos.

El término "biomasa pretratada" significa biomasa que se ha sometido a pretratamiento antes de la sacarificación. El pretratamiento puede tomar la forma de tratamiento físico, térmico o químicos y combinaciones de los mismos.

El término "butanol" se refiere a isobutanol, 1-butanol, 2-butanol, o combinaciones de los mismos.

El término "biomasa lignocelulósica" se refiere a cualquier material lignocelulósico e incluye materiales que comprenden celulosa, hemicelulosa, lignina, almidón, oligosacáridos y/o monosacáridos. La biomasa puede comprender también componentes adicionales, tales como proteína y/o lípido. La biomasa puede derivarse de una sola fuente, o la biomasa puede comprender una mezcla derivada de más de una fuente; por ejemplo, la biomasa podría comprender una mezcla de carozos de maíz y forraje de maíz, o una mezcla de hierba y hojas. La biomasa lignocelulósica incluye, pero sin carácter limitante, cosechas bioenergéticas, desechos agrícolas, desechos sólidos municipales, desechos sólidos industriales, papillas de la fabricación de papel, desechos de jardín, desechos de madera y forestales. Ejemplos de biomasa incluyen, pero sin carácter limitante, carozos de maíz, desechos de cosechas tales como cascarillas de maíz, forraje de maíz, hierbas, paja de trigo, paja de cebada, heno, paja de arroz, césped de pradera, papel residual, bagazo de caña de azúcar, material de plantas de sorgo, material de plantas de soja, componentes obtenidos a partir de la molienda de granos, árboles, ramas, raíces, hojas, virutas de madera, serrín, arbustos y matorrales, hortalizas, frutos, y flores.

El término "hidrolizado de biomasa lignocelulósica" se refiere al producto resultante de la sacarificación de una biomasa lignocelulósica. La biomasa puede también pretratarse o pre-procesarse antes de la sacarificación.

El término "caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica" es un caldo que contiene producto resultante del crecimiento y la producción del biocatalizador en un medio que comprende hidrolizado de biomasa lignocelulósica. Este caldo incluye componentes de hidrolizado de biomasa lignocelulósica que no son consumidos por el biocatalizador, así como el biocatalizador propiamente dicho y el producto fabricado por el biocatalizador.

El término "papilla" se refiere a una mezcla de material insoluble y un líquido. Una papilla puede contener también un nivel elevado de sólidos disueltos. Ejemplos de papillas incluyen un caldo de sacarificación, un caldo de fermentación, y una hez completa.

El término "hez completa" se refiere a las colas de una destilación. La hez completa contiene los productos que tienen un punto de ebullición elevado y cualesquiera sólidos de una corriente de alimentación a la destilación. La hez completa contiene los productos que hierven a temperatura elevada y cualesquiera sólidos de una corriente de alimentación a la destilación. La hez completa es un tipo de caldo empobrecido.

El término "hez fluida" se refiere a una fracción líquida resultante de la separación sólido/líquido de una hez completa, caldo de fermentación o caldo de fermentación empobrecido en producto.

El término "producto diana" se refiere a cualquier producto que es fabricado por una célula hospedadora de producción microbiana en una fermentación. Los productos diana pueden ser el resultado de caminos enzimáticos modificados por ingeniería genética o pueden producirse por caminos endógenos. Productos diana típicos incluyen, pero sin carácter limitante, ácidos, alcoholes, alcanos, alquenos, aromáticos, aldehídos, cetonas, biopolímeros, proteínas, péptidos, aminoácidos, vitaminas, antibióticos, y productos farmacéuticos.

El término "caldo empobrecido en producto" o "caldo empobrecido" se refiere en esta memoria a un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica después de la separación de una corriente de producto.

El término "resistencia de la torta de filtración" o "resistencia específica de la torta" se refiere a un valor específico de magnitud que cuantifica la filtrabilidad de una papilla. El valor en independiente de la concentración, viscosidad, y presión de la papilla, y del área de filtración. El valor se calcula utilizando la ecuación de Ruth, y puede utilizarse para escalar el equipo de filtración:

Ecuación de Ruth: $dt/dV = (\mu\alpha_{av}C/\Delta p)V + \mu R_m/\Delta p$

donde t es el tiempo de filtración (s), V es el volumen de filtrado por unidad de área de filtración (m^3/m^2), Δp es la presión aplicada para filtración (Pa), μ es la viscosidad del líquido (kg/ms), $\mu\alpha_{av}$ es la resistencia específica media de la torta (m/kg), R_m es la resistencia del medio de filtración (m^{-1}), y C es la masa de torta formada por unidad de volumen de filtrado (kg/m^3). Véase Yim et al. (Korean M. Chem. Eng., 18(5), 741, (2001)).

"Xyn3" es una xilanasa de la familia GH10 de *Trichoderma reesei*. Se demostró que Xyn3 (SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 5 codificante) tiene actividad de endoxilanasa indirectamente por su capacidad para aumentar la producción de monómero xilosa en presencia de xilobiosidasa cuando el conjunto de las enzimas actúa sobre biomasa pretratada o sobre hemicelulosa aislada.

"Fv3A" es una enzima de la familia GH3 de *Fusarium verticillioides*. Se demostró que Fv3A (SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 6 codificante) tiene actividad de β-xilosidasa por ensayo con p-nitrofenil-β-xilopiranosido, xilobiosa, xilo-oligómeros lineales mezclados y oligómeros ramificados de arabinoxilano a partir de hemicelulosa como sustratos.

"Fv43D" es una enzima de la familia GH43 de *Fusarium verticillioides*. Se demostró que Fv43D (SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 7 codificante) tiene actividad de β-xilosidasa por ensayo con p-nitrofenil-β-xilopiranosido, xilobiosa, o xilo-oligómeros lineales mixtos como sustratos.

"Fv51A" es una enzima de la familia GH51 de *Fusarium verticillioides*. Se demostró que Fv51A (SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 8 codificante) tiene actividad de L-alfa-arabinofuranosidasa por ensayo con p-nitrofenil-alfa-L-arabinofuranosido y por la liberación de arabinosa por el conjunto de oligómeros liberados de hemicelulosa por la acción de endoxilanasa.

Filtración Líquido/Sólido Eficiente

La presente invención se refiere al procesamiento de un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica, particularmente en la separación de una corriente líquida para reciclo. El uso de hidrolizado de biomasa lignocelulósica para producir azúcares fermentables en un medio de fermentación implica riesgos en el procesamiento de una corriente líquida en el proceso de producción global. El caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica contiene lignina y otros componentes de la biomasa que no son metabolizados por un biocatalizador de producción durante la fermentación, dando como resultado un caldo con propiedades diferentes que las encontradas típicamente en un caldo de fermentación que no contiene hidrolizado de biomasa. Típicamente, el caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica tiene una resistencia de la torta de filtración muy alta (r_c), teniendo un valor r_c mayor que aproximadamente E^{17}, lo que hace que la filtración del caldo para la separación líquido/sólido sea muy ineficiente. La filtración se interrumpe pronto debido a la alta resistencia al flujo de la torta de filtración formada, que permite que pase poco líquido a través del filtro. En este caso, la torta de filtración tiene que retirarse por ejemplo por medios mecánicos o lavados en retorno causando la ineficiencia del proceso de separación líquido/sólido.

Por utilización del presente proceso de tratamiento, la resistencia de la torta de filtración de un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica se reduce al menos aproximadamente 20%, aumentando por tanto la eficiencia de filtración. La resistencia de la torta de filtración puede reducirse al menos aproximadamente en 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, o 75% o más, dependiendo de las condiciones específicas de tratamiento utilizadas como se describe más adelante. Con 50% de reducción en la resistencia de la torta de filtración, la velocidad de filtración aumenta al menos aproximadamente al doble. Con 75% de reducción en la resistencia de la torta de filtración, la velocidad de filtración aumenta al menos aproximadamente cuatro veces. De este modo pueden conseguirse aumentos sustanciales en la velocidad de filtración siguiendo el presente tratamiento térmico, lo que contribuye sustancialmente a una eficiencia incrementada en el procesamiento de la corriente líquida procedente de un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica.

Caldo de Fermentación de Hidrolizado de Biomasa lignocelulósica

Hidrolizado de Biomasa

La biomasa lignocelulósica puede tratarse por cualquier método conocido por un experto en la técnica para producir azúcares fermentables en un hidrolizado. Típicamente, la biomasa se somete a pretratamiento utilizando tratamientos físicos y/o químicos, y se sacarifica enzimáticamente. Tratamientos físicos y químicos incluyen, pero sin carácter limitante, trituración, molienda, corte, tratamiento básico por ejemplo con amoníaco o NaOH, y tratamiento ácido. Es particularmente útil un pretratamiento con amoníaco diluido en el que la biomasa se pone en contacto con una solución acuosa que comprende amoníaco para formar una mezcla biomasa-amoníaco acuoso en la que la concentración de amoníaco es suficiente para mantener un pH alcalino de la mezcla biomasa-amoníaco acuoso pero es menor que aproximadamente 12% en peso con relación al peso seco de biomasa, y donde el peso seco de biomasa es al menos aproximadamente 15% en peso de sólidos con relación al peso de la mezcla biomasa-amoníaco acuoso, como se expone en la Publicación de Solicitud de Patente US también en tramitación y del mismo propietario US 20070031918 A1. La biomasa se reduce también típicamente en tamaño de partícula antes del pretratamiento.

La sacarificación enzimática hace uso típicamente de una asociación de enzimas para descomposición de la celulosa y la hemicelulosa a fin de producir un hidrolizado que contiene azúcares que incluyen glucosa, xilosa, y arabinosa. Las enzimas de sacarificación se revisan en Lynd, L.R. et al. (Microbiol. Mol. Biol. Rev., 66:506-577, 2002).

Se utiliza al menos una enzima, y típicamente se utiliza una asociación de enzimas de sacarificación que incluye una o más glicosidasas. Las glicosidasas hidrolizan los enlaces éter de los di-, oligo-, y polisacáridos y se encuentran en la clasificación de enzimas EC 3.2.1.x (Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego, CA con Suplemento 1 (1993), Suplemento 2 (1994), Suplemento 3 (1995, Suplemento 4 (1997) y Suplemento 5 [en Eur. J. Biochem., 223:1-5, 1994; Eur. J. Biochem., 232:1-6, 1995; Eur. J. Biochem., 237:1-5, 1996; Eur. J. Biochem., 250:1-6, 1997; y Eur. J. Biochem., 264:610-650 1999, respectivamente) del grupo general "hidrolasas" (EC 3.). Las

glicosidasas útiles en el método presente pueden clasificarse por el componente de la biomasa que hidrolizan las mismas. Las glicosidasas útiles para el presente método incluyen glicosidasas hidrolizantes de la celulosa (por ejemplo, celulasas, endoglucanasas, exoglucanasas, celobiohidrolasas, β-glucosidasas), glicosidasas hidrolizantes de hemicelulosa (por ejemplo, xilanasas, endoxilanasas, exoxilanasas, β-xilosidasas, arabinoxilanasas, manasas, galactasas, pectinasas, glucuronidasas), y glicosidasas hidrolizantes del almidón (por ejemplo, amilasas, α-amilasas, β-amilasas, glucoamilasas, α-glucosidasas, isoamilasas). Adicionalmente, puede ser útil añadir otras actividades a la asociación de enzimas de sacarificación tales como peptidasas (EC 3.4.x.y), lipasas (EC 3.1.1.x y 3.1.4.x), ligninasas (EC 1.11.1.x), y feruloil-esterasas (EC 3.1.1.73) para coadyuvar a la liberación de polisacáridos de otros componentes de la biomasa. Es bien conocido en la técnica que los microorganismos que producen enzimas hidrolizantes de polisacáridos exhiben a menudo una actividad, tal como degradación de la celulosa, que es catalizada por varias enzimas o por un grupo de enzimas que tienen especificidades de sustrato diferentes. Así, una "celulasa" de un microorganismo puede comprender un grupo de enzimas, todas las cuales pueden contribuir a la actividad de degradación de la celulosa. Preparaciones comerciales o no comerciales de enzimas, tales como celulasa, pueden comprender numerosas enzimas que dependen del esquema de purificación utilizado para obtener la enzima.

Pueden obtenerse comercialmente enzimas de sacarificación, tales como Spezyme® CP celulasa, Multifect® xilanasa, Accelerase® 1500, y Accellerase® DUET (Danisco U.S. Inc., Genencor International, Rochester, NY). Adicionalmente, las enzimas de sacarificación pueden no ser puras y proporcionarse como un tipo de extracto de células o preparación de células enteras. Las enzimas pueden producirse utilizando microorganismos recombinantes que se han modificado por ingeniería genética para expresar enzimas de sacarificación múltiples.

De particular valor en la presente invención son clases de glicosido-hidrolasas, tales como las familias GH3, GH39, GH43, GH51, GH10, y GH11. Las GHs son un grupo de enzimas que hidrolizan el enlace glicosídico entre dos o más carbohidratos, o entre un carbohidrato y un resto distinto de carbohidrato. Las familias de GHs se han clasificado sobre la base de semejanza de secuencia y están disponibles en la base de datos de enzimas con actividad de carbohidrato CAZy) (Cantarel et al. (2009) Nucleic Acids Res. 37 (edición de la Base de Datos): D233-238). Estas enzimas son capaces de actuar sobre cierto número de sustratos y son eficaces en el proceso de sacarificación. La familia de glicosido-hidrolasas 3 ("GH3") tienen varias actividades conocidas: β-glucosidasa (EC: 3.2.1.21); β-xilosidasa (EC: 3.2.1.37); N-acetil-β-glucosaminidasa (EC: 3.2.1.52); glucan-β-1,3-glucosidasa (EC: 3.2.1.58); celodextrinasa (EC: 3.2.1.74); exo-1,3-1,4-glucanasa (EC: 3.2.1); y β-galactosidasa (EC 3.2.1.23). Las enzimas de la familia 39 de Glicosido-hidrolasas ("GH39") tienen actividad de α-L-iduronidasa (EC: 3.2.1.76) o β-xilosidasa (EC: 3.2.1.37). Las enzimas de la familia 43 de glicosido-hidrolasas ("GH43") tienen las actividades siguientes: L-α-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55); β-xilosidasa (EC 3.2.1.37); endoarabinanasa (EC 3.2.1.99); y galactan-1,3-β-galactosidasa (EC 3.2.1.145). Las enzimas de la familia 51 de glicosido-hidrolasas ("GH51") tienen actividad de L-α-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) o endoglucanasa (EC 3.2.1.4). La familia 10 de glicosido-hidrolasas ("GH10") se describen más detalladamente en Schmidt et al., 1999, Biochemistry 38:2403-2412 y Lo Leggio et al., 2001, FEBS Lett 509: 303-308), y la familia 11 de glicosido-hidrolasas ("GH11") se describen más detalladamente en Hakouvainen et al., 1996, Biochemistry 35:9617-24.

Particularmente útiles en una asociación de enzimas son las glicosil-hidrolasas (GH) Xyn3, Fv3A, Fv51A and Fv43D. Xyn3 (SEQ ID NO:1) es una xilanasa de la familia GH10 de *Trichoderma reesei,* Fv3A (SEQ ID NO:2) es una enzima de la familia GH3 de *Fusarium verticillioides,* Fv43D (SEQ ID NO:3) es una enzima de la familia GH43 de *Fusarium verticillioides,* y Fv51A (SEQ ID NO:4) es una enzima de la familia GH51 de *Fusarium verticillioides.*

Estas enzimas pueden aislarse de su organismo hospedador natural, o expresarse en un organismo hospedador modificado por ingeniería genética para producción. Por ejemplo, un gen quimérico que contiene un promotor activo en una célula hospedadora de expresión de diana, una secuencia que codifica una GH dada anteriormente, y una señal de terminación se expresa a partir de un vector plasmídico o se integra en el genoma de una célula hospedadora de expresión de diana utilizando métodos estándar conocidos por un experto en la técnica. Una secuencia codificante utilizada puede optimizarse en codones para el hospedador específico utilizado para expresión. Células hospedadoras de expresión utilizadas típicamente incluyen bacterias, tales como *Escherichia, Bacillus, Lactobacillus, Pseudomonas* y *Streptomyces,* levaduras tales como *Saccharomyces, Schizosaccharomyces, Candida, Hansenula, Pichia, Kluyveromyces,* y *Phaffia*, y hongos filamentosos tales como *Acremonium, Aspergillus, Aureobasidium, Bjerkandera, Ceriporiopsis, Chrysoporium, Coprinus, Coriolus, Corynascus, Chaertomium, Cryptococcus, Filobasidium, Fusarium, Gibberella, Humicola, Magnaporthe, Mucor, Myceliophthora, Mucor, Neocallimastix, Neurospora, Paecilomyces, Penicillium, Phanerochaete, Phlebia, Piromyces, Pleurotus, Scytaldium, Schizophyllum, Sporotrichum, Talaromyces, Thermoascus, Thielavia, Tolypocladium, Trametes,* y *Trichoderma.*

Un experto en la técnica conocería el modo de determinar la cantidad eficaz de enzimas a utilizar en una asociación y ajustar las condiciones para actividad enzimática óptima. Un experto en la técnica podría conocer también el modo de optimizar las clases de actividades enzimáticas requeridas en una asociación para obtener la sacarificación óptima de un producto de pretratamiento dado en las condiciones seleccionadas. Un ejemplo de sacarificación se describe en US20070031918 A1.

Antes de la fermentación, la mezcla de sacarificación puede concentrarse por evaporación, por ejemplo, para aumentar la concentración de azúcares fermentables.

Opcionalmente, el líquido en el producto de sacarificación puede separarse de los sólidos en un método por lotes o continuo. Opcionalmente, el líquido o el producto de sacarificación completo pueden esterilizarse antes de la fermentación. Dependiendo del o de los biocatalizadores utilizados durante la fermentación y del pH utilizado durante la sacarificación, el pH puede ajustarse al adecuado para la fermentación.

Un hidrolizado de biomasa lignocelulósica que contiene azucares fermentables se incluye en el medio de fermentación típicamente como un porcentaje del medio, proporcionando la totalidad o una porción de la fuente de carbono para crecimiento del biocatalizador y obtención del producto. El hidrolizado en un medio de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica es al menos aproximadamente 25% del volumen total, y puede ser al menos aproximadamente 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más. Ejemplos del hidrolizado utilizado como 40% u 80% del medio de fermentación se dan en el Ejemplo 9 de US 20070031918 A1. Dependiendo de la concentración de azúcares fermentables en el hidrolizado, pueden añadirse azúcares adicionales al medio. Por ejemplo, cuando un hidrolizado que contiene aproximadamente 80 g/L de glucosa y aproximadamente 50 g/L de xilosa se incluye al 40% del medio de fermentación, pueden añadirse glucosa y xilosa adicionales a las concentraciones finales deseadas de azúcares. Además de hidrolizado, el medio de fermentación puede contener otros nutrientes, sales y factores requeridos para crecimiento y producción por el biocatalizador específico a utilizar para la obtención del producto, como es bien conocido por un experto en la técnica. Los suplementos pueden incluir, por ejemplo, extracto de levadura, aminoácidos específicos, fosfato, fuentes de nitrógeno, sales, y elementos traza. Pueden incluirse también componentes requeridos para la obtención de un producto específico producido por un biocatalizador específico, tales como un antibiótico para mantener un plásmido o un cofactor requerido en una reacción catalizada por enzimas. En los medios de fermentación utilizados en esta memoria, el hidrolizado es el 90% del volumen total.

Alternativamente a la preparación de hidrolizado, la adición del mismo al medio de fermentación, seguido por la realización de la fermentación, puede utilizarse un proceso simultáneo de sacarificación y fermentación (SSF) para producir un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica. En este proceso, se producen azúcares a partir de la biomasa a medida que los mismos son metabolizados por el biocatalizador de producción.

Fermentación del Biocatalizador y Productos Diana

Los azúcares fermentables en el medio de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica son metabolizados por biocatalizadores adecuados a fin de obtener los productos diana. Los azúcares se ponen en contacto con un biocatalizador en un proceso de fermentación en el que el biocatalizador se deja crecer en condiciones en las que se obtiene un producto diana producido por el biocatalizador. La temperatura y/o el gas del espacio de cabeza pueden ajustarse para la fermentación, dependiendo de las condiciones útiles para el o los biocatalizadores particulares en uso. La fermentación puede ser aerobia o anaerobia. Estas y otras condiciones que incluyen temperatura y pH se ajustan para el biocatalizador particular utilizado.

Típicamente, el biocatalizador se modifica por ingeniería genética a fin de obtener un producto diana, pero el mismo puede obtener naturalmente un producto diana. Productos diana que pueden obtenerse por fermentación utilizando un biocatalizador incluyen, por ejemplo, ácidos, alcoholes, alcanos, alquenos, aromáticos, aldehídos, cetonas, biopolímeros, proteínas, péptidos, aminoácidos, vitaminas, antibióticos, y productos farmacéuticos. Los alcoholes incluyen, pero sin carácter limitante, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, etilenglicol, propanodiol, butanodiol, glicerol, eritritol, xilitol, sorbitol, y 1,3-propanodiol. Los ácidos incluyen, pero sin carácter limitante, ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido butírico, ácido glucónico, ácido itacónico, ácido cítrico, ácido succínico y ácido levulínico. Los aminoácidos incluyen ácido glutámico, ácido aspártico, metionina, lisina, glicina, arginina, treonina, fenilalanina y tirosina. Productos diana adicionales incluyen metano, etileno, acetona y enzimas industriales. Productos particularmente adecuados son etanol y butanol, con inclusión de isobutanol, 2-butanol, y 1-butanol.

La fermentación de azúcares en productos diana puede llevarse a cabo por uno o más biocatalizadores apropiados en fermentaciones de una sola etapa o multietápicas. Los biocatalizadores pueden ser microorganismos seleccionados de bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Los biocatalizadores pueden ser microorganismos de tipo salvaje o microorganismos recombinantes, e incluyen, por ejemplo, *Escherichia, Zymomonas, Saccharomyces, Candida, Pichia, Streptomyces, Bacillus, Lactobacillus,* y *Clostridium.* En otra realización, los biocatalizadores pueden seleccionarse del grupo constituido por *Escherichia coli, Zymomonas mobilis, Bacillus stearo-thermophilus, Saccharomyces cerevisiae, Clostridia thermocellum, Thermoanaerobacterium saccharolyticum,* y *Pichia stipitis* recombinantes.

Muchos biocatalizadores utilizados en fermentación para la obtención de productos diana han sido descritos, y otros pueden descubrirse, producirse por mutación, o modificarse genéticamente por medios recombinantes. Cualquier biocatalizador que utiliza azúcares fermentables en un medio de hidrolizado de biomasa lignocelulósica puede utilizarse para obtener uno o más productos diana que se sabe produce(n) el mismo, y producir por tanto un caldo de hidrolizado de biomasa lignocelulósica para procesamiento utilizando el presente proceso. Particularmente útiles

para producción en medio de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica son productos alcohol que pueden utilizarse como combustibles tales como butanol y etanol.

La fermentación de carbohidratos a acetona, butanol y etanol (fermentación ABE) por *Clostridia* solventotogénica es bien conocida (Jones y Woods (1986) Microbiol. Rev. 50:484-524). Un proceso de fermentación para producción de niveles altos de butanol, produciendo también acetona y etanol, utilizando una cepa mutante de *Clostridium acetobutylicum* se describe en US 5.192.663. El uso de una cepa mutante de *Clostridium beijerinckii* para producir niveles elevados de butanol, produciendo también acetona y etanol, se describe en US 6.358.717. La producción de metanol por levadura modificada genéticamente se da a conocer por ejemplo en US 20070092957 A1. Cepas modificadas genéticamente de *E. coli* han sido utilizadas también como biocatalizadores para producción de etanol (Underwood et al., (2002) Appl. Environ. Microbiol. 68:6263-6272). Se ha producido etanol por *Zymomonas* modificadas genéticamente en medios de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica (US 20070031918 A1). Cepas modificadas genéticamente de *Zymomonas mobilis* con producción mejorada de etanol se describen en US 2003/0162271 A1 y US 2009/0246846 A1.

En US 4.504.250 se dan a conocer microorganismos recombinantes que producen 1,3-propanodiol.

Cepas recombinantes de *E. coli* han sido utilizadas como biocatalizadores en fermentación para producir 1,3-propanodiol (US 6.013.494, US 6.514.733, y ácido adípico (Niu et al., (2002) Biotechnol. Prog. 18: 201-211).

Para crecer satisfactoriamente y conducir a una producción elevada de producto en un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica, puede seleccionarse o modificarse por ingeniería genética un biocatalizador a fin de tener mayor tolerancia a los inhibidores presentes en el hidrolizado de biomasa tales como acetato. Por ejemplo, la mejora de la utilización de xilosa y producción de etanol en condiciones estresantes tales como las encontradas en un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica por *Zymomonas* se describe en la Publicación de Solicitud de Patente US del mismo propietario y también en tramitación US 20110014670. En dicho documento se da a conocer el crecimiento continuo de células de *Zymomonas* en un medio que contiene xilosa, acetato, acetato de amonio, y etanol, y el aislamiento de cepas de *Zymomonas* mejoradas que utilizan xilosa tales como ZW705.

Proceso Para Tratamiento de un Caldo de Fermentación de Hidrolizado de Biomasa Lignocelulósica

En el presente proceso, se aplica un tratamiento térmico a un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica antes de su filtración para separar corrientes líquida y sólida. El caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica puede tratarse directamente después de la fermentación, o después de un paso de separación de producto. Por ejemplo, el producto diana (etanol o butanol) es producido por un biocatalizador y puede retirarse de un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica antes del presente tratamiento. El butanol puede retirarse del caldo de fermentación por extracción del medio de fermentación por ejemplo por destilación con arrastre de gas, o utilizando un agente de extracción orgánico inmiscible con el agua y separando la fase orgánica que contiene butanol de la fase acuosa como se da a conocer en WO 2009/149270. En este caso se produce un caldo empobrecido, que es un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica con producto separado. El etanol puede separarse o retirarse del caldo de fermentación por destilación, típicamente utilizando una columna de cerveza. En este caso se produce una corriente de hez total a partir de la destilación del caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica. La hez total es por tanto un tipo de caldo empobrecido.

El caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica o caldo empobrecido tal como hez total procedente de una columna de destilación, se trata térmicamente en condiciones en las que la resistencia de la torta de filtración del caldo o caldo empobrecido, tal como hez total, se reduce al menos un 20% aproximadamente. El caldo o caldo empobrecido, tal como hez total, se trata a una temperatura que está comprendida entre aproximadamente 70ºC y aproximadamente 150ºC durante un tiempo comprendido entre aproximadamente 30 segundos y 210 minutos. Se utilizan tiempos más largos con temperaturas más bajas en el intervalo, utilizándose tiempos más cortos con temperaturas más altas dentro del intervalo. Por ejemplo, en los ejemplos de esta memoria, el calentamiento de la hez total a 70ºC durante 60 minutos fue suficiente para permitir la resistencia de la torta de filtración en un 24%; el calentamiento a 110ºC durante 30 segundos fue suficiente para reducir la resistencia de la torta de filtración en un 21%; y un tratamiento de 30 segundos a 145ºC redujo la resistencia de la torta de filtración un 45%. Son particularmente útiles temperaturas comprendidas entre aproximadamente 95ºC y aproximadamente 150ºC, siendo eficaces tiempos más cortos tales como entre aproximadamente 30 segundos y 30 minutos. Para un tratamiento corto, son particularmente útiles temperaturas entre aproximadamente 110ºC y aproximadamente 150ºC durante tiempos comprendidos entre aproximadamente 30 segundos y 2 minutos. El tratamiento del caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica y otros tipos de caldo empobrecido pueden estar comprendidos en intervalos de temperatura similares durante tiempos similares, por reducción de la resistencia de la torta de filtración al menos un 20% aproximadamente.

El tratamiento térmico puede llevarse a cabo en cualquier sistema capaz de mantener la temperatura durante el tiempo deseado. Por ejemplo, el calentamiento puede realizarse en una vasija provista de camisa de calentamiento o en un cambiador de calor con mantenimiento subsiguiente en una vasija o bucle de tubos.

Un experto en la técnica, con conocimiento de los resultados en los ejemplos que se proporcionan en esta memoria, puede determinar una temperatura y un tiempo dentro de los intervalos dados que son apropiados para un proceso global específico. Por ejemplo, un tratamiento de 30 segundos a 110ºC hasta 145ºC puede realizarse fácilmente utilizando un bucle de tubos con tiempo de residencia, que permite utilizar un proceso continuo, y no se requiere vasija encamisada alguna, lo que hace esta disposición particular económicamente atractiva. Alternativamente, si se desea una temperatura inferior tal como la utilización de 95ºC a 100ºC, que es la temperatura de la hez total procedente de una destilación atmosférica, entonces podría utilizarse un tiempo de aproximadamente 15 a 30 minutos. Como en este caso, si la temperatura de la hez total o el caldo es igual o superior a la temperatura deseada debido a un paso de proceso previo, puede no ser necesaria aplicación adicional alguna de calor; la temperatura se mantiene durante el tiempo deseado manteniendo el caldo o la hez total en una vasija aislada durante el periodo de tiempo requerido.

El tiempo requerido para reducir la resistencia de la torta de filtración al menos aproximadamente 20%, a una temperatura dada, puede variar también dependiendo del pH del caldo, el caldo empobrecido, o la hez total durante el tratamiento. Se consigue una reducción mayor en la resistencia de la torta de filtración a pH inferior, siendo particularmente útil un pH de 6 o más bajo. Dependiendo del biocatalizador utilizado en la fermentación, el pH del caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica puede encontrarse ya a pH 6 o más bajo. Alternativamente, el pH del caldo, el caldo empobrecido, o la hez total del caldo puede ajustarse para alcanzar un pH de aproximadamente 6, 5, 4, ó 3 antes de o durante el tratamiento térmico. Es particularmente útil mezclar o agitar el caldo o la hez total durante el ajuste del pH para distribución uniforme del ácido de ajuste del pH. Adicionalmente, puede utilizarse mezcladura durante el tratamiento térmico para control uniforme de la temperatura. La mezcladura, que puede ser continua o discontinua, se realiza típicamente por un sistema de agitación tal como uno que utilice hélices.

El potencial zeta es una medida del grado de repulsión entre partículas adyacentes de carga similar en una /dispersión, que por consiguiente es una indicación de la estabilidad de una dispersión coloidal. Se encontró que la reducción del pH de la hez total procedente de la destilación de un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica educe la magnitud del potencial zeta. Sin embargo, la reducción en la magnitud del potencial zeta observada, desde -21,85 mV a pH 7 hasta -16,17 mV a pH 5,5, y a -12,58 mV a pH 3,9 (Ejemplo 2 de esta memoria), no es indicativa de un cambio a coagulación rápida o floculación que ocurre a un potencial zeta de aproximadamente +/- 5 mV e inferior. Así, la reducción del potencial zeta observada no puede explicar el cambio acusado entre la resistencia de la torta de filtración.

En el presente proceso, no se añade agente de procesamiento alguno, tal como un agente floculante, al caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica, caldo empobrecido, o hez total. El material termotratado se filtra para separar una fracción líquida, o hez fluida, y una fracción sólida. Pueden utilizarse diversos dispositivos de filtración tales como un filtro de cinta, prensa de cinta, prensa de tornillo, filtro de tambor, filtro de disco, filtro de Nucha, filtro-prensa, o centrífuga filtrante. La filtración puede favorecerse por ejemplo por aplicación de vacío, presión, o fuerza centrífuga. Es particularmente útil un filtro-prensa. El caldo, caldo empobrecido, o hez total se enfría típicamente, tal como a aproximadamente 65ºC, antes de hacerlo pasar a través de un filtro-prensa.

La fracción de sólidos, o torta húmeda, puede quemarse para suministrar energía al proceso de producción. La torta húmeda puede secarse antes de la combustión, por ejemplo por secado al aire, a fin de reducir la humedad.

Tratamiento Ulterior del Líquido para Reciclo

Una corriente de producto puede retirarse después de la filtración líquido/sólido de un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica tratado térmicamente. Por ejemplo, la corriente líquida puede extraerse o destilarse para generar una corriente de producto, tal como destilación a fin de producir una corriente de producto etanol y un líquido remanente.

Después de la filtración, quedan en la fracción líquida sólidos disueltos y suspendidos. La totalidad o una porción de la fracción líquida pueden reciclarse para uso directamente como retorno. Como retorno, el líquido puede añadirse en cualquier punto en el proceso en el que se necesite agua fresca, tal como en pretratamiento, sacarificación, o producción de siembra de biocatalizador. El resto, o la totalidad, de la fracción líquida pueden purificarse ulteriormente por evaporación produciendo agua que puede reciclarse y un jarabe. La evaporación de la fracción líquida de la hez fluida puede utilizarse para producir un jarabe con al menos aproximadamente 40% de sólidos. La corriente líquida de hez fluida tiene un contenido muy bajo de sólidos suspendidos, que son inferiores a 1000 ppm, ó 0,1%. Debido a la baja concentración de sólidos suspendidos en la hez fluida, la misma mantiene una viscosidad baja en un paso de evaporación subsiguiente. La viscosidad se mantiene por debajo de aproximadamente 100 centipoise a lo largo de la evaporación, permitiendo la evaporación de aproximadamente 40% de sólidos o más. El jarabe resultante con al menos aproximadamente 40% de sólidos puede quemarse para proporcionar energía, sin paso de secado adicional alguno requerido. Los jarabes que se producen típicamente en procesos de etanol con trituración en seco de granos de maíz tienen aproximadamente 35% o menos de sólidos y no proporcionan más energía que la que se utiliza en el secado cuando se queman los mismos.

La evaporación puede realizarse en cualquier sistema de evaporación, tal como película de caída, película ascendente, circulación forzada, placas o sistemas de recompresión de vapor mecánicos y térmicos. La evaporación puede ser continua o por lotes y puede utilizar un evaporador multi-efecto. El agua evaporada puede reciclarse en el proceso de fermentación del hidrolizado de biomasa lignocelulósica global.

Ejemplos

La presente invención se define adicionalmente en los Ejemplos que siguen.

El significado de las abreviaturas utilizadas es como sigue: "s" es segundo, "min" significa minuto(s), "h" o "hr" significa hora(s), "µL" significa microlitro(s), "mL" significa mililitro(s), "L" significa litro(s), "m" es metro, "nm" significa nanómetro(s), "mm" significa milímetro(s), "cm" significa centímetro(s), "µm" significa micrómetro(s), "mM" significa milimolar, "M" significa molar, "mmol" significa milimol(es), "µmol" significa micromol(es), "g" significa gramo(s), "µg" significa microgramo(s), "mg" significa miligramo(s), "kg" es kilogramo, "rpm" significa revoluciones por minuto, "C" es centígrado, "ppm" significa partes por millón, "cP" es centipoise, "NTU" son unidades nefelométricas de turbidez, y "psi" significa libras por pulgada cuadrada.

Métodos generales

Enzimas de Sacarificación

Accelerase® 1500 (A1500) y Xilanasa Multifect® se obtuvieron de Danisco U.S. Inc., Genencor, International (Rochester, NY).

Cepa de Producción de Celulasa y Hemicelulasa

Cepa 229: Una cepa de *Trichoderma reesei*, derivada de RL-P37 (Sheir-Neiss y Montenecourt, 1984, Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:46-53) por mutagénesis y selección para producción alta de celulasa, se sometió a co-transformación con la casete de expresión de β-glucosidasa (promotor cbh1, gen 1 de β-glucosidasa de *T. reesei*, terminador cbh1, y marcador amdS), y la casete de expresión de endoxilanasa (promotor cbh1, xyn3 de *T. reesei*, y terminador cbh1) utilizando transformación mediada con PEG (Penttila et al., 1987, Gene 61(2): 155-64). Se aislaron numerosos transformantes y se examinaron respecto a producción de β-glucosidasa y endoxilanasa. Un solo transformante, al que se hace referencia como cepa #229 de *T. reesei*, se utilizó en ciertos estudios descritos en esta memoria.

Cepa H3A: La cepa #229 de *T. reesei* se co-transformó con la casete de expresión Fv3A de β-xilosidasa (promotor cbh1, gen Fv3A, terminador cbh1, y marcador alsR), la casete de expresión Fv43D de β-xilosidasa (promotor egl1, gen Fv43D, terminador Fv43D nativo), y la casete de expresión de α-arabinofuranosidasa Fv51A (promotor egl1, gen Fv51A, terminador nativo Fv51A) utilizando electroporación. Los transformantes se seleccionaron sobre placas de agar Vogels que contenían clorimurón-etilo. Se aislaron numerosos transformantes y se examinaron respecto a producción de β-xilosidasa y L-α-arabinofuranosidasa. Se aisló la cepa H3A de expresión integrada de *T. reesei*, que expresa recombinantemente *T. reesei* β-glucosidasa 1, *T. reesei* xyn3, Fv3A, Fv51A, y Fv43D.

La proteína extracelular producida durante la fermentación de la cepa H3A se separó de la masa de células por centrifugación, se concentró por ultrafiltración con membrana a través de una membrana Millipore de peso molecular de corte 10 kD y se ajustó el pH a 4,8. La proteína total se determinó utilizando un método Biuret modificado como fue modificado por Weichselbaum utilizando Seroalbúmina Bovina como calibrador (Weichselbaum, 1960, Amer. J. Clin. Path. 16:40; Gornall et al., 1949 J. Biol. Chem 177:752). Esta preparación de proteína extracelular H3A, denominada en esta memoria proteína H3A, se utilizó como preparación de combinación de celulasa y hemicelulasa que realizaba la hidrólisis de carbohidratos complejos durante la SSF.

Preparación de biocatalizador e inóculo

Origen de las cepas de *Zymomonas mobilis* utilizadas en la fermentación

Un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica que se procesa como en estos ejemplos puede producirse utilizando biocatalizadores alternativos. En estos ejemplos se utilizan cepas ilustrativas y se describen a continuación. Como alternativa, puede utilizarse la cepa ZW658, depositada como ATCC #PTA-7858 para producir un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica para procesamiento.

La cepa ZW705 de *Zymomonas mobilis* se produjo a partir de la cepa ZW801-4 por métodos detallados en la Publicación de Patente de Estados Unidos U.S. 20110014670, como se detalla brevemente a continuación. Cultivos de la cepa ZW801-4 de *Z. mobilis* se dejaron crecer en condiciones de estrés como sigue. ZW801-4 es una cepa recombinante de *Z. mobilis* que utiliza xilosa que fue descrita en US 7.741.119. La cepa ZW801-4 se derivó de la cepa ZW800, que se derivaba de la cepa ZW658, todo ello como se describe en US 7.741.119. ZW658 se construyó por integración de dos operones, PgapxilAB y Pgaptaltkt, que contienen cuatro genes que utilizan xilosa que codifican xilosa-isomerasa, xiluloquinasa, transaldolasa y transcetolasa, en el genoma de ZW1 (ATCC #31821) por eventos de transposición secuenciales, seguido por adaptación en medios selectivos que contenían xilosa. ZW658

se depositó como ATCC #PTA-7858. En ZW658, el gen codificante de glucosa-fructosa-oxidorreductasa se desactivó por inserción utilizando recombinación homóloga mediada por el hospedador y con doble cruzamiento, y resistencia a espectinomicina como marcador seleccionable para crear ZW800. El marcador de resistencia a espectinomicina, que estaba limitado por sitios loxP, se retiró por recombinación específica del sitio utilizando recombinasa Cre para crear ZW801-4.

Se realizó un cultivo continuo de ZW801-4 en fermentadores agitados de 250 ml con control de pH y temperatura (Sixfors; Bottmingen, Suiza). El medio basal para fermentación era extracto de levadura de 5 g/L, fosfato de amonio 15 mM, 1 g/L sulfato de magnesio, sorbitol 10 mM, 50 g/L xilosa y 50 g/L glucosa. La adaptación al crecimiento en presencia de concentraciones altas de acetato y amoniaco se efectuó aumentando gradualmente la concentración de acetato de amonio añadida al medio de cultivo continuo anterior mientras se mantenía una tasa de crecimiento establecida como se midió por la tasa de dilución específica a lo largo de un periodo de 97 días. Se aumentó el acetato de amonio a una concentración de 160 mM. Aumentos ulteriores en la concentración de ion amonio se consiguieron por adición de fosfato de amonio hasta una concentración final total de ion amonio de 210 mM hasta el final de 139 días de cultivo continuo. La cepa ZW705 se aisló de la población adaptada por extensión en placas a colonias simples y amplificación de una colonia seleccionada.

Se produjo la cepa AR3 7-31 a partir de la cepa ZW705 por adaptación ulterior para crecimiento en medio de hidrolizado de mazorcas de maíz. ZW705 se cultivó en un turbidostato (US 6.686.194; Heurisko USA, Inc. Newark, DE), que es un dispositivo de cultivo en flujo continuo en el que la concentración de células en el cultivo se mantenía constante por control del flujo de medio al cultivo, de tal modo que la turbidez del cultivo se mantenía dentro de límites estrechos especificados. Estaban disponibles dos medios para el cultivo de crecimiento en el dispositivo de cultivo continuo, un medio de reposo (Medio A) y un medio de enfrentamiento (Medio B). Un cultivo se dejó crecer en medio de reposo en una cámara de crecimiento hasta un punto de ajuste de turbidez, y se diluyó luego a una tasa de dilución ajustada para mantener dicha densidad de células. La dilución se realizó por adición de medio a un volumen definido una vez cada 10 min. Cuando el turbidostato entró en un modo de enfrentamiento al medio, la elección de la adición de medio de enfrentamiento o medio de reposo se hizo basándose en la tasa de retorno al punto de ajuste después de la adición del medio anterior. La concentración en estado estacionario de medio en la cámara de crecimiento era una mezcla de Medio A y Medio B, dependiendo las proporciones de los dos medios de la tasa de extracción de cada medio que permitía el mantenimiento de la densidad de células ajustada a la tasa de dilución establecida. Una muestra de células representativas de la población en la cámara de crecimiento se recuperó del flujo de salida del turbidostato (en una cámara trampa) a intervalos semanales. La muestra de células se cultivó una sola vez en medio MRM3G6 y se guardó como un stock en glicerol a -80ºC.

ZW705 se cultivó hasta un punto de ajuste arbitrario de turbidez que dictaba que el cultivo utilizaba la totalidad de la glucosa y aproximadamente la mitad de la xilosa presentes en el medio de entrada para cumplir la densidad de células del punto de ajuste a la tasa de dilución ajustada. Utilizando medio de reposo que era 50% HYAc/YE y 50% MRM3G6.5X4.5NH_4Ac12.3 y medio de enfrentamiento que era HYAc/YE. Una cepa aislada al cabo de 3 semanas se utilizó en otra tanda de adaptación del turbidostato utilizando HYAc/YE como el medio de reposo y HYAc/YE + 9% en peso de etanol como el medio de enfrentamiento. La cepa AR3 7-31 se aisló después de 2 semanas y se caracterizó como una cepa con utilización mejorada de xilosa y glucosa, y producción mejorada de etanol, en medio de hidrolizado. Por análisis de la secuencia, se encontró que AR3 7-31 tenía una mutación en el marco de lectura abierto del genoma de *Zymomonas mobilis* que codificaba una proteína que tenía características de una proteína de transporte de membrana, y se anotó como codificante de una proteína de resistencia a ácido fusárico.

Medios

MRM3 contiene por litro: extracto de levadura (10 g), KH_2PO_4 (2 g) y $MgSO_4.7H_2O$ (1 g)

MRM3G6 es MRM3 que contiene 60 g/L de glucosa

MRM3G6.5X4.5NH_4Ac 12.3 es MRM3 que contiene 65 g/L de glucosa, 45 g/L de xilosa, y 12,3 g/L de acetato de amonio

HYAc/YE contiene hidrolizado de mazorca del que se retiraron los sólidos por centrifugación y que se esterilizó por filtración, que contenía 68 g/L de glucosa, 46 g/L de xilosa y 5,9 de acetato, suplementado con 6,2 g/L de acetato de amonio y 0,5% de extracto de levadura, ajustado a pH 5,8.

Resistencia Específica de la Torta

La resistencia específica de la torta cuantifica el cambio de resistencia de la torta de filtración por unidad de altura de torta. La misma es independiente de la concentración, viscosidad, presión y área de filtración de la papilla. El valor se obtiene por la ecuación de Ruth como se ha descrito arriba. [Véase Yin et al., Korean M. Chem. Eng., 18(5) 741, (2001)].

Equipo de Tratamiento Térmico

Los experimentos de tratamiento térmico se condujeron en tres tipos de sistemas.

- Un dispositivo de destilación por lotes Oldershaw 2L de vidrio de placa 10.

La temperatura del pote se controla utilizando un termopar en el pote que controla la manta calefactora. La tasa de ebullición se controla por el uso de un Variac Manual.

La ratio de reflujo se controla por un separador de material de vidrio que puede enviar el material condensado en el extremo superior de la columna a una vasija de recogida del producto o devolverlo a la columna como reflujo. La cantidad de tiempo que el material refluye como retorno a la columna dividida por la cantidad de tiempo que el material pasa a la recogida de producto es el valor de la ratio de reflujo. Para el tratamiento térmico, la unidad se hace funcionar a reflujo total.

- Una vasija de 50 galones (189,3 litros) encamisada con calentador de aceite.

La unidad consiste en una vasija de 50 galones (189,3 litros) encamisada y un agitador. La unidad está equipada con termopares para controlar el calor en el interior de la vasija. La fuente de calor es un calentador eléctrico de aceite con circulación de aceite a través de la camisa.

- Un Dispositivo de Tiempo Breve a Temperatura Elevada de Laboratorio con un cambiador de calor y un bucle de tubos de tiempo de residencia.

La unidad consiste en dos cambiadores de calor y un bucle de tubos entre ambos que permite un tiempo de retención de aproximadamente 20-60 s hasta 160ºC. El primer cambiador de calor calienta el material a la temperatura adecuada. El material se mantiene luego a dicha temperatura y se enfría de nuevo antes de salir del dispositivo.

Métodos Analíticos Utilizados Para Describir el Comportamiento de Separación. Turbidez

La turbidez se determina conforme a ASTM D7315-07a (Método Estándar de Test para Determinación de la Turbidez Superior a 1 Unidad de Turbidez (TU) en modo estático). El equipo externo utilizado para la determinación de la turbidez era un turbidimétrico HACH 2100AN (VWR International, West Chester, PA). La turbidez medible máxima es 10.000 NTU (Unidades de Turbidez Nefelométricas). Si bien 0-4000 NTU se miden en modo de transmisión, los valores superiores éstos se determinan por retrodispersión.

Filtratest

El Filtratest (BOKELA GmbH, Tullastr. 64, 76131 Karlsruhe, Alemania) es un filtro de Nucha de laboratorio que permite tests de filtración rápida por lotes con capacidad de evaluación instantánea. Una revisión de las especificaciones se da a continuación.

- Área del filtro: 20 cm^2
- Volumen de llenado 500 cm^3
- Presión máxima de filtración = 11 bar (1100 kilopascal) (estándar europeo)
- Temperatura máxima de operación 120ºC (60ºC en esta realización)
- Posibilidad de calentamiento por doble camisa (conexión de 2 x 3/8")
- Tapa de cierre rápido engoznada con mirilla
- Cabeza de fondo con accesorio de tipo bayoneta (uso con una sola mano)
- Conexión de aire comprimido con junta de apriete a resorte
- Material 1.4301 u otros
- Dimensiones: 420 x 700 x 180 mm
- Peso: aproximadamente 30 kg.

El medio de filtración se coloca en el soporte del filtro, que se cierra utilizando un adaptador de tipo bayoneta. Una vez que la muestra se carga en el cuerpo de la Nucha, se cierra la tapa y se aplica una presión diferencial preajustada. El equipo comprende una balanza, un sensor de presión y un medidor de flujo de aire que están conectados a una computadora para adquisición de los datos. La masa de filtrado frente al tiempo registrada por la computadora puede exportarse a Excel para evaluación ulterior a fin de calcular la resistencia específica de la torta, o la evaluación puede hacerse utilizando un algoritmo en el software proporcionado por el sistema Filtratest.

Filtro-Prensa Netzsch de 460 mm

Se utilizó la prensa en escala pre-piloto siguiente disponible comercialmente: filtro-prensa de membrana Netzsch 470/SP, Mix Pack Membrane con capacidad de Pre-Prensado 1,0 (ANDRITZ AG, Statteger Strasse 18, A-8045 Graz, Austria). Se incluyen tubos manuales con número apropiado de válvulas para alimentación, soplado de núcleo, soplado de torta, soplado de retroceso de membrana y bloque de filtrado. La prensa de 470 mm se utiliza en una separación líquido/sólidos. El equipo está constituido por dos mecanismos de operación; el primero tiene dos tanques de alimentación agitados y bombas neumáticas para alimentar la prensa, y la segunda parte es la prensa propiamente dicha.

- Área del filtro: 6800 cm^2
- Número de cámaras: 2
- Presión máxima de filtración = 7 bar (700 kilopascal)
- Temperatura máxima de operación 85ºC
- Mecanismo de cierre: pistón hidráulico
- Suministro de alimentación: bomba neumática de diafragma
- Dimensiones: 1300 x 1500 x 600 mm
- Peso: aproximadamente 250 kg

La prensa manipula fluidos a presión. La papilla se alimenta a la prensa a una presión de hasta 100 psi (689,5 kilopascal). Existe un pistón hidráulico que comprime la pila de placas de filtración a 6.000 psi (41,4 megapascal). Existe también un cilindro neumático separado que proporciona hasta 225 psi (1551,3 kilopascal) de presión de prensado a la prensa para compresión mecánica.

Ejemplo 1

Producción de Caldo de Fermentación de Hidrolizado de Biomasa Lignocelulósica y Pretratamiento

Lote de fermentación FRF 6

Se utilizó un reactor de paletas horizontal Jaygo (aproximadamente 170 L) para pretratar 4 lotes de trozos de mazorca, todas ellas de tamaño < ½" (1,27 cm). Las mazorcas se cargaron al reactor y se aplicó vacío a la vasija hasta alcanzar 0,1 bar (10 kilopascal) absoluto antes de la introducción de solución de hidróxido de amonio para dar aproximadamente 4 (2 lotes), 6 (1 lote) u 8 (1 lote) % en peso de NH_3 con relación al peso seco de biomasa. Se añadió vapor hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 145ºC. Esta temperatura se mantuvo durante 20 minutos. Al final del pretratamiento, se despresurizó el reactor de manera controlada hasta alcanzar la presión atmosférica, y se aplicó subsiguientemente vacío para llevar de nuevo la presión en la vasija a aproximadamente 0,1 bar (10 kilopascal) absoluto. Los trozos de mazorca pretratados que salían del reactor tenían aproximadamente 55% en peso de biomasa seca. Los trozos de mazorca se redujeron a tamaños inferiores a 1 mm en un micropulverizador (Model #1SH, Serial #10019; Pulverizing Machinery Division of Mikropul Corporation; Summit, NJ) provisto de un tamiz de 1,0 mm.

Lotes de fermentación FRF 7-10

Se utilizó una vasija de reactor de 130 L Littleford Day horizontal que contenía una camisa para circulación de vapor alrededor del cuerpo de la vasija y uno de los lados (Littleford Day, Inc., Florence, KY) para pretratamiento de lotes de mazorca. Para cada lote, la vasija se cargó con mazorca (de tamaño inferior a 1 mm). El tamaño de la mazorca se había reducido por tratamiento en un micropulverizador (Model #1SH, Serial #10019; Pulverizing Machinery Division of Mikropul Corporation; Summit, NJ) provisto de un tamiz de 1,0 mm. El porcentaje de humedad de la mazorca utilizada en diferentes lotes de pretratamiento se da en la Tabla 2.

Se aplicó vacío a la vasija hasta alcanzar 0,1 atm antes de la introducción de una solución de hidróxido de amonio al 28,9% en peso y agua cerca del extremo superior de la vasija para dar un 6% en peso de NH_3 con relación al peso seco de biomasa. Se introdujo vapor cerca del extremo superior de la vasija para elevar la temperatura interna de la vasija a 145ºC. Esta temperatura se mantuvo durante 20 minutos. Al final del pretratamiento, el reactor se despresurizó a través de un condensador de ventilación hasta alcanzar la presión atmosférica. Se aplicó luego vacío (aproximadamente hasta menos de 1 atm) durante 15 minutos para reducir la temperatura a menos de 60ºC. El porcentaje final de sólidos para cada lote de pretratamiento se da en el Tabla 2, junto con el lote de fermentación en el que se utilizó cada lote de pretratamiento.

Tabla 2. Mazorca, Lotes de Pretratamiento y de Fermentación

Mazorca, % de humedad	Lote de pretratamiento	% en peso final de sólidos	Lote de fermentación
5,9	SSL 9	53,1	7
5,9	SSL 10	65,7	7
5,9	SSL 11	71,3	7
5,9	SSL 12	71,9	7
5,9	SSL 13	69,8	8
5,9	SSL 14	67,6	8
5,9	SSL 15	68,9	8
5,2	SSL 18	65,1	9
5,2	SSL 19	68,1	9
5,2	SSL 20	68,1	9
8,0	SSL 24	61,1	10
8,0	SSL 25	66,7	10
8,0	SSL 26	67,8	10

Operaciones de Sacarificación para FRF 6-10

La sacarificación se llevó a cabo en un Biostato Sartorius D200 de 200 L durante 72 horas excepto el lote #9, que se mantuvo 24 horas. La carga de sólidos era 20% a 25%. El pH de la biomasa de mazorcas pretratada se ajustó a 5,3 con H_2SO_4. Las enzimas añadidas eran una asociación de A1500, Xyn3, Fv3A, Fv51A, y Fv43D que se añadió a 21,3 mg proteína/g glucano + xilano para #6-9, excepto en la operación #6 en la que se empleó Xilanasa Multifect® en sustitución de Xyn3, y en la operación #10 en el que se utilizó extracto de H3A (descrito en los Métodos Generales) a 14 mg/g glucano + xilano. La sacarificación se realizó a 47ºC.

Preparación del Cultivo de Siembra

Se dejaron crecer 2 mL de la cepa de stock ZW705 congelada (cepa descrita en los Métodos Generales) en MRM3G6 (10 g/L de extracto de levadura BBL, 2 g/L KH_2PO_4, 1 g/L $MgSO_4*7H_2O$, 60 g/L glucosa) a 33ºC, sin sacudidas durante 8 horas como cultivo de reactivación. Frascos de sacudidas que contenían 1 L de medio MRM3G10 (igual que MRM3G6 pero con 100 g/L de glucosa) se inocularon con 20 mL de cultivo de reactivación, y se incubaron a 33ºC con agitación mediante sacudidas durante 13-16 horas. El cultivo se mantuvo hasta DO_{600} entre 1,5 y 3,1. Se utilizó cantidad suficiente de cultivo en los frascos de sacudidas para inocular fermentadores de siembra de 10 L hasta DO_{600} inicial de 0,1 (FRF 7-10) o 0,35 (FRF 6).

Fermentaciones de siembra en MaxSMG20 o MaxSMG15 (20 g/L extracto de levadura, 2 g/L KH_2PO_4, 5 g/L $MgSO_4*7H_2O$, 10 mM sorbitol, y 200 g/L glucosa). Las fermentaciones de siembra se realizaron a 33ºC y pH 5,8 (FRF 6 & 7) ó 5,5 (FRF 8-10). La siembra se cosechó después de la primera observación de reducción de la glucosa a menos de 85 g/L, midiéndose la glucosa por utilización de un Analizador de Bioquímica YSI 2700 SELEC T™ (YSI Life Sciences; Yellow Springs, OH).

Fermentación

Los lotes de fermentación enumerados en la Tabla 2 se ejecutaron en un Biostato Sartorius D200 de 200 L que contenía 180 L de hidrolizado de biomasa y 20 L de cultivo de siembra ZW705. El pH se ajustó a 5,8 con NaOH. Las operaciones se mantuvieron a 30ºC-33ºC durante 80 horas (FRF 6,7), 90 horas (FRF 8,10) o 120 horas (FRF 9).

Ejemplo 2

Efecto del Tratamiento Térmico de la Hez Total Sobre la Resistencia de la Torta de Filtración

Las preparaciones de caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica FRF 6, 7 y 8 se destilaron cada una en un dispositivo a escala de laboratorio (Métodos Generales) por destilación continua a la presión atmosférica, con un tiempo de residencia en la columna de aproximadamente 8 min. Las muestras de hez total resultantes, con pH de 6, se utilizaron en ensayos de tratamiento térmico. El tratamiento térmico se efectuó a temperaturas diferentes (70ºC, 80ºC, 95ºC) por mantenimiento de la temperatura especificada en el pote de destilación por lotes Oldershaw de 2 L de vidrio de placa 10, descrito en Métodos Generales. A lo largo del tratamiento térmico se tomaron muestras del pote de destilación por lotes. Cada muestra se filtró y se determinó la

resistencia específica de la torta de filtración. Las operaciones de filtración en el equipo Filtratest descrito en Métodos Generales se utilizaron para determinar el cambio en filtrabilidad. Se realizaron un total de más de 25 tratamientos térmicos utilizando hez total de la producción de etanol celulósico. El cambio en la resistencia de la torta de filtración en función de la temperatura se muestra en la Tabla 3. La tabla establece una selección representativa de los datos disponibles. Las operaciones A y B utilizaron hez total de FRF 8, y la operación C utilizó hez total de FRF 6.

Tabla 3. Cambio en la Resistencia de la Torta de Filtración de Muestras de Hez Total Calentadas Durante Tiempos Variables y a Temperaturas Diferentes Utilizando un Filtratest

pH 6		% de probabilidad de resistencia de la torta con el tiempo a la temperatura de tratamiento						
Temp.	OPERACIÓN	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min	210 min
70°C	A	0%	-8%	-24%	-27%	-25%	-32%	-34%
80°C	B	0%	-24%	-41%	-42%	-44%	-49%	-54%
95°C	C	0%	-53%	nd*	nd	nd	nd	-73%
*nd = no determinado								

0 min se refiere a la primera muestra (muestra inicial) del tratamiento térmico, que es la papilla de hez total sin tratar. El porcentaje indica el cambio relativo en la resistencia específica de la torta comparada con la muestra inicial. Después de 30 min de tratamiento térmico se observaron cambios espectaculares en la filtrabilidad, que eran mayores a temperatura más alta. Después de 210 min de tiempo de tratamiento térmico, la operación a 70ºC exhibía una resistencia específica de la torta reducida en un 34% frente a 73% para el caso de 95ºC.

El lote de fermentación FRF 7 se trató térmicamente a 95ºC durante 210 min, y los resultados se dan en la Tabla 4. Se alcanzó una reducción en la resistencia específica de la torta de 39% utilizando el filtro-prensa de 460 mm. El tratamiento térmico se realizó en la vasija encamisada de 50 galones (189,3 litros) con calentamiento por recirculación de aceite, descrita en Métodos Generales.

Tabla 4. Cambio en la Resistencia de la Torta de Filtración de la Muestra de Hez total Calentada Utilizando el Filtro-Prensa de 460 mm

pH 6			
Temp.	OPERACIÓN	0 min	210 min
95°C	D	0%	-39%

Ejemplo 3

Efecto del pH y el Tratamiento Térmico Sobre la Resistencia de la Torta de Filtración de Hez total

Para este ejemplo, se realizaron varias operaciones con ajuste del pH del caldo de fermentación antes de la destilación, con destilación subsiguiente seguida por tratamiento térmico y filtración. Muestras del caldo de fermentación de FRF 10 descrito en el Ejemplo 1 se ajustaron a pH 5, 6, ó 7 antes de la destilación. La destilación se realizó como se describe en el Ejemplo 1. La hez total procedente de la columna de destilación se mantuvo a 95ºC durante tiempos variables y se filtró como en el Ejemplo 1, presentándose los resultados en la Tabla 5. Los porcentajes son los cambios relativos en la resistencia específica de la torta comparada con la muestra de 0 min a pH 7. Se realizaron varias operaciones de test; la tabla muestra un ejemplo representativo.

Como puede verse en la columna de 0 min (muestra sin tratamiento térmico), el ajuste del pH solo generó una diferencia en resistencia específica de la torta de 42%. El tratamiento térmico mejoraba adicionalmente la eficiencia.

En el caso de pH 5 y 180 min o 210 min, se alcanzó repetidas veces una reducción de 70% en la resistencia específica de la torta de filtración.

Tabla 5. Cambio en la resistencia de la torta de filtración de muestras de hez total calentada de caldo de fermentación ajustado en pH, calentadas durante tiempos variables a 95ºC

95°C							
pH	RUN	0 min	30 min	90 min	120 min	180 min	210 min
pH7	E	0%	-10%	-20%	-32%	-48%	-52%
pH6	F	-34%	-38%	-49%	-52%	-55%	

95°C							
pH5	G	-42%	-62%	-62%	-66%	-70%	-70%

El filtrado del caldo de fermentación que estaba ajustado a pH 6 se ajustó en pH utilizando ácido sulfúrico. Los resultados de la observación visual fueron que la muestra inicialmente clara se volvía cada vez más turbia a medida que se reducía el pH. Para cada pH enumerado en la Tabla 6, se ensayó la turbidez como se describe en Métodos Generales. Los resultados en la Tabla 6 muestran que la turbidez aumentaba a medida que se reducía el pH. La materia previamente disuelta precipitaba a medida que disminuía el pH.

Tabla 6. Turbidez del Filtrado de Hez total a pH Variable

pH	NTU
5,8	132
5,2	137
4,9	170
4,5	220
4,1	313
3,6	408

La hez total del caldo de fermentación que se ajustó a pH 7 se ajustó en pH por pasos utilizando ácido sulfúrico. Para cada pH enumerado en la Tabla 7, se ensayó en el potencial zeta. Los resultados de la Tabla 7 muestran que la hez se volvía más inestable electrocinéticamente a medida que disminuía el pH, pero no hasta un nivel que se espera soporte la coagulación o floculación rápidas (potencial zeta de 0 a +/- 5 mV).

Tabla 7. Potencial zeta del filtrado de hez total a pH variable

pH	Potencial Zeta (mV)
7,0	-21,85
6,6	-18,28
5,5	-16,17
4,7	-15,03
3,9	-12,58

Ejemplo 4

Tratamiento Térmico de la Hez Total Utilizando Temperatura Alta y Tiempo Corto

Para estos experimentos se realizó en lugar de un tratamiento térmico a temperatura relativamente baja y durante tiempo largo, un tratamiento térmico a temperatura elevada y tiempo corto.

La hez total se trató en el dispositivo de Alta Temperatura y Tiempo Corto (HTST) descrito en Métodos Generales. Las muestras se mantuvieron durante 30 s a 110ºC o 145ºC y se determinó para cada muestra el cambio relativo en la resistencia específica de la torta como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados en la Tabla 8 muestran que el tiempo corto a temperatura elevada era apto para alcanzar la misma magnitud de reducción de la resistencia que las operaciones durante largo tiempo a baja temperatura. Ya a 110ºC durante 30 s se consiguió un 21% de reducción en la resistencia. A 145ºC durante 30 s se observó una reducción de 45% en la resistencia de la torta.

Tabla 8. Cambio en la Resistencia de la Torta de Filtración de las Muestras de Hez total Calentadas Durante Tiempo Corto a Temperatura Elevada

30 s		
RT	110° C	145°C
0%	-21%	-45%

Ejemplo 5

Efecto del Tratamiento Térmico Sobre la Resistencia de la Torta de Filtración del Caldo de Fermentación

Para este ejemplo se realizó una operación con tratamiento térmico de caldo de fermentación FRF 7 seguido por filtración. Se utilizó el dispositivo de destilación por lotes Oldershaw 2 L de vidrio de placa 10 descrito en Métodos Generales en modo de reflujo total para realizar el tratamiento térmico sin retirada de destilado alguno.

El caldo de fermentación FRF 7 se retiró del almacenamiento a aproximadamente 5ºC; se cargaron 769 gramos en el pote de lotes de 2 L, y dicho material se calentó luego a 93ºC. El pote se mantuvo en el punto de ebullición de 93ºC del caldo de fermentación que contenía etanol durante 150 min. Una vez completado el tratamiento térmico, el material termotratado en el pote se vació a una botella provista de tapón para transporte al instrumento Filtratest para las medidas de filtración. La botella se transportó dentro de un vaso Dewar provisto de tapa para mantener la temperatura de la muestra antes del test de filtración. Se proporcionó también una muestra del caldo de fermentación FRF 7 correspondiente no tratado térmicamente, como la muestra de 0 min.

Cada muestra se filtró y se determinó la resistencia específica de la torta de filtración. Se utilizaron operaciones de filtración en el equipo Filtratest descrito en Métodos Generales para determinar el cambio en filtrabilidad. El cambio en resistencia de la torta de filtración se da en la Tabla 9.

Tabla 9. Cambio en la Resistencia de la Torta de Filtración de la Muestra de Caldo de Fermentación Calentado Utilizando un Filtratest

Temp.	RUN	0 min	150 min
93°C	H	0%	-95%

El porcentaje indica el cambio relativo en la resistencia específica de la torta comparado con la muestra inicial. Después de 150 min de tiempo de tratamiento térmico a 93ºC, la resistencia específica de la torta se redujo en 95%.

Ejemplo 6

Producción de Caldo de Fermentación de Hidrolizado de Biomasa Lignocelulósica a Escala Semiindustrial

Pretratamiento

Se utilizó un pretratador a escala semiindustrial (aproximadamente 370 L) 7 se utilizó para pretratar un lote de forraje de maíz que se había molido a aproximadamente 1/8" (3,125 mm). El forraje se cargó al reactor y se aplicó vacío a la vasija hasta alcanzar 0,1 bar (10 kilopascal) absoluto antes de la introducción de solución de hidróxido de amonio para dar aproximadamente 8% en peso de NH_3 con relación al peso seco de biomasa. Se añadió vapor hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 140ºC. Esta temperatura se mantuvo durante 30 minutos. Al final del pretratamiento, el reactor se despresurizó de manera controlada hasta alcanzar la presión atmosférica, y se aplicó subsiguientemente vacío para llevar de nuevo la presión en la vasija a aproximadamente 0,1 bar (10 kilopascal) absoluto. Los trozos de forraje pretratados que salían del reactor tenían aproximadamente 65% en peso de biomasa seca.

Sacarificación

La sacarificación para producir hidrolizado de biomasa se llevó a cabo en una vasija de sacarificación de 1000 L. La carga de sólidos era 25%. El pH de la biomasa de forraje de maíz pretratada se ajustó a 5,3 con H_2SO_4 al 5% en peso. La mezcla de enzimas de añadió a 14 mg proteína/g glucano + xilano. Las enzimas de sacarificación eran una mezcla de celulasas y hemicelulasas expresadas en una cepa de *Trichoderma reesei* derivada de RL-P37 (Sheir-Neiss y Montenecourt (1984) Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:46-53), similar a la preparación de la cepa H3A descrita en Métodos Generales, que podría utilizarse también. La sacarificación se realizó a 47ºC durante 72 horas produciendo hidrolizado de biomasa.

Preparación del Cultivo de Siembra

Se cultivaron 2 mL de stock de la cepa AR3 7-31 de Zymomonas mobilis congelada en MRM3G6 (10 g/L extracto de levadura BBL, 2 g/L KH_2PO_4, 1 g/L $MgSO_4*7H_2O$, 60 g/L glucosa) a 33ºC, sin sacudidas durante 8 horas como un cultivo de reactivación. Un matraz de sacudidas de 2 L que contenía 1,5 L de medio MRM3G10 (igual que MRM3G6 pero con 100 g/L de glucosa) se inoculó con 10 mL de cultivo de reactivación, y se incubó a 33ºC con sacudidas durante 14-16 horas. El crecimiento se mantuvo hasta una DO_{600} entre 1,5 y 3,1. El cultivo completo del matraz de sacudidas se utilizó para inocular un fermentador de siembra de 100 L hasta una DO_{600} inicial de aproximadamente 0,05.

La fermentación de siembra se llevó a cabo en un fermentador de 100 L con 10 g/L de extracto de levadura, 2 g/L KH_2PO_4, 5 g/L $MgSO_4*7H_2O$, 10 mM sorbitol, y 150 g/L glucosa. La fermentación de siembra se realizó a 33ºC y pH 5,5. La siembra se recogió después de la primera observación de reducción de la glucosa a menos de 50 g/L, realizándose la medición de glucosa utilizando un Analizador de Bioquímica SELEC T™ YSI 2700 (YSI Life Sciences; Yellow Springs, OH).

Fermentación

La fermentación se realizó en un fermentador a escala piloto de 1000 L que contenía 900 L de hidrolizado de biomasa y 100 L de cultivo de siembra AR3 7-31. Se añadió sorbitol 10 mM al hidrolizado de biomasa antes de la inoculación con el cultivo de siembra. El pH se ajustó a 5,8 y se mantuvo con NaOH al 20% en peso. Las operaciones se mantuvieron a 30ºC-33ºC durante 48-72 horas. El caldo de fermentación final resultante se transportó refrigerado y almacenado a 5ºC hasta el destino final para tratamiento térmico y filtración.

Ejemplo 7

Efecto del Tratamiento Térmico del Caldo de Fermentación de Forraje de Maíz Sobre la Resistencia de la Torta de Filtración

Para este ejemplo, se realizó una operación con tratamiento térmico del caldo de fermentación Y013 seguido por filtración. El dispositivo de destilación por lotes Oldershaw 2 L en vidrio de placa 10 descrito en Métodos Generales se utilizó en modo de reflujo total para realizar el tratamiento térmico sin retirada de destilado alguno.

El caldo de fermentación Y013 se retiró del almacenamiento a aproximadamente 5ºC, se cargaron 676 gramos en el pote de lotes de 2 L, y dicho material se calentó luego a 93ºC. El pote se mantuvo en el punto de ebullición de 93ºC del caldo de fermentación que contenía etanol durante 180 min. Se tomaron muestras al alcanzar 93ºC, después de 30 minutos a 93ºC, después de 60 min a 93ºC y después de 180 min a 93ºC utilizando frascos de muestra provistos de tapón. Cada frasco se transportó instantáneamente al interior de un vaso Dewar provisto de tapa para mantener la temperatura de la muestra antes del test de filtración. Se proporcionó también una muestra del caldo de fermentación Y013 correspondiente sin tratamiento térmico como la muestra de referencia.

Cada muestra se filtró y se determinó la resistencia específica de la torta de filtración. Las operaciones de filtración en el equipo Filtratest descrito en Métodos Generales se utilizaron para determinar el cambio en filtrabilidad.

El test se repitió con ajuste del pH a pH 5,03 antes del tratamiento térmico. En dicho caso, se cargaron 636 gramos de caldo de fermentación ajustado en pH en el pote de destilación.

El cambio de resistencia de la torta de filtración se proporciona en la Tabla 10.

Tabla 10. Cambio de Resistencia de la Torta de Filtración de las Muestras de Caldo de Fermentación Calentadas Utilizando un Filtratest

Temp.	Tiempo de Tratamiento Térmico	Cambio en la resistencia específica de la torta a pH 5,83	Cambio en la resistencia específica de la torta a pH 5,0
	Y013 Fermbroth	0,0 %	0,0 %
60°C	(Referencia)		
93°C	0 min	-98,7 %	-97,7 %
93°C	30 min	-98,5 %	-98,7 %
93°C	60 min	-99,0 %	-99,0 %
93°C	180 min	-99,1 %	-99,2 %

El porcentaje indica el cambio relativo en resistencia específica de la torta comparado con la muestra inicial. Después de 180 min de tratamiento térmico a 93ºC, la resistencia específica de la torta se redujo en 99% en el caso de pH 5,83 y el caso de pH 5,3.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> E. I. du Pont de Nemours and Company

<120> Proceso para separación líquido/sólido de un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica

<130> CL4802

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
< 211> 347
< 212> PRT

< 213> Trichoderma reesei

<400> 1

```
Met Lys Ala Asn Val Ile Leu Cys Leu Leu Ala Pro Leu Val Ala Ala
1               5                  10                  15

Leu Pro Thr Glu Thr Ile His Leu Asp Pro Glu Leu Ala Ala Leu Arg
            20                  25                  30

Ala Asn Leu Thr Glu Arg Thr Ala Asp Leu Trp Asp Arg Gln Ala Ser
        35                  40                  45

Gln Ser Ile Asp Gln Leu Ile Lys Arg Lys Gly Lys Leu Tyr Phe Gly
    50                  55                  60

Thr Ala Thr Asp Arg Gly Leu Leu Gln Arg Glu Lys Asn Ala Ala Ile
65                  70                  75                  80

Ile Gln Ala Asp Leu Gly Gln Val Thr Pro Glu Asn Ser Met Lys Trp
                85                  90                  95

Gln Ser Leu Glu Asn Asn Gln Gly Gln Leu Asn Trp Gly Asp Ala Asp
            100                 105                 110

Tyr Leu Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Lys Ser Ile Arg Gly His
        115                 120                 125

Thr Leu Ile Trp His Ser Gln Leu Pro Ala Trp Val Asn Asn Ile Asn
    130                 135                 140

Asn Ala Asp Thr Leu Arg Gln Val Ile Arg Thr His Val Ser Thr Val
145                 150                 155                 160

Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Arg Ala Trp Asp Val Val Asn Glu
                165                 170                 175

Ile Phe Asn Glu Asp Gly Thr Leu Arg Ser Ser Val Phe Ser Arg Leu
            180                 185                 190
```

Leu Gly Glu Glu Phe Val Ser Ile Ala Phe Arg Ala Ala Arg Asp Ala
195 200 205

Asp Pro Ser Ala Arg Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Asn Leu Asp Arg Ala
210 215 220

Asn Tyr Gly Lys Val Asn Gly Leu Lys Thr Tyr Val Ser Lys Trp Ile
225 230 235 240

Ser Gln Gly Val Pro Ile Asp Gly Ile Gly Ser Gln Ser His Leu Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Thr Leu Gly Ala Leu Gln Gln Leu Ala Thr
260 265 270

Val Pro Val Thr Glu Leu Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Gln Gly Ala
275 280 285

Pro Thr Thr Asp Tyr Thr Gln Val Val Gln Ala Cys Leu Ser Val Ser
290 295 300

Lys Cys Val Gly Ile Thr Val Trp Gly Ile Ser Asp Lys Asp Ser Trp
305 310 315 320

Arg Ala Ser Thr Asn Pro Leu Leu Phe Asp Ala Asn Phe Asn Pro Lys
325 330 335

Pro Ala Tyr Asn Ser Ile Val Gly Ile Leu Gln
340 345

<210> 2
< 211> 766
< 212> PRT
< 213> Fusarium verticilloides

<400> 2

Met Leu Leu Asn Leu Gln Val Ala Ala Ser Ala Leu Ser Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Gly Gly Leu Ala Glu Ala Ala Thr Pro Tyr Thr Leu Pro Asp Cys
20 25 30

Thr Lys Gly Pro Leu Ser Lys Asn Gly Ile Cys Asp Thr Ser Leu Ser
35 40 45

Pro Ala Lys Arg Ala Ala Ala Leu Val Ala Ala Leu Thr Pro Glu Glu
50 55 60

Lys Val Gly Asn Leu Val Ser Asn Ala Thr Gly Ala Pro Arg Ile Gly
65 70 75 80

```
Leu Pro Arg Tyr Asn Trp Trp Asn Glu Ala Leu His Gly Leu Ala Gly
                85                  90                  95

Ser Pro Gly Gly Arg Phe Ala Asp Thr Pro Pro Tyr Asp Ala Ala Thr
            100                 105                 110

Ser Phe Pro Met Pro Leu Leu Met Ala Ala Ala Phe Asp Asp Asp Leu
        115                 120                 125

Ile His Asp Ile Gly Asn Val Val Gly Thr Glu Ala Arg Ala Phe Thr
    130                 135                 140

Asn Gly Gly Trp Arg Gly Val Asp Phe Trp Thr Pro Asn Val Asn Pro
145                 150                 155                 160

Phe Lys Asp Pro Arg Trp Gly Arg Gly Ser Glu Thr Pro Gly Glu Asp
                165                 170                 175

Ala Leu His Val Ser Arg Tyr Ala Arg Tyr Ile Val Arg Gly Leu Glu
            180                 185                 190

Gly Asp Lys Glu Gln Arg Arg Ile Val Ala Thr Cys Lys His Tyr Ala
        195                 200                 205

Gly Asn Asp Phe Glu Asp Trp Gly Gly Phe Thr Arg His Asp Phe Asp
    210                 215                 220

Ala Lys Ile Thr Pro Gln Asp Leu Ala Glu Tyr Tyr Val Arg Pro Phe
225                 230                 235                 240

Gln Glu Cys Thr Arg Asp Ala Lys Val Gly Ser Ile Met Cys Ala Tyr
                245                 250                 255

Asn Ala Val Asn Gly Ile Pro Ala Cys Ala Asn Ser Tyr Leu Gln Glu
            260                 265                 270

Thr Ile Leu Arg Gly His Trp Asn Trp Thr Arg Asp Asn Asn Trp Ile
        275                 280                 285

Thr Ser Asp Cys Gly Ala Met Gln Asp Ile Trp Gln Asn His Lys Tyr
    290                 295                 300

Val Lys Thr Asn Ala Glu Gly Ala Gln Val Ala Phe Glu Asn Gly Met
305                 310                 315                 320

Asp Ser Ser Cys Glu Tyr Thr Thr Thr Ser Asp Val Ser Asp Ser Tyr
                325                 330                 335

Lys Gln Gly Leu Leu Thr Glu Lys Leu Met Asp Arg Ser Leu Lys Arg
            340                 345                 350
```

```
Leu Phe Glu Gly Leu Val His Thr Gly Phe Phe Asp Gly Ala Lys Ala
        355                 360                 365

Gln Trp Asn Ser Leu Ser Phe Ala Asp Val Asn Thr Lys Glu Ala Gln
    370                 375                 380

Asp Leu Ala Leu Arg Ser Ala Val Glu Gly Ala Val Leu Leu Lys Asn
385                 390                 395                 400

Asp Gly Thr Leu Pro Leu Lys Leu Lys Lys Lys Asp Ser Val Ala Met
                405                 410                 415

Ile Gly Phe Trp Ala Asn Asp Thr Ser Lys Leu Gln Gly Gly Tyr Ser
            420                 425                 430

Gly Arg Ala Pro Phe Leu His Ser Pro Leu Tyr Ala Ala Glu Lys Leu
        435                 440                 445

Gly Leu Asp Thr Asn Val Ala Trp Gly Pro Thr Leu Gln Asn Ser Ser
    450                 455                 460

Ser His Asp Asn Trp Thr Thr Asn Ala Val Ala Ala Ala Lys Lys Ser
465                 470                 475                 480

Asp Tyr Ile Leu Tyr Phe Gly Gly Leu Asp Ala Ser Ala Ala Gly Glu
                485                 490                 495

Asp Arg Asp Arg Glu Asn Leu Asp Trp Pro Glu Ser Gln Leu Thr Leu
            500                 505                 510

Leu Gln Lys Leu Ser Ser Leu Gly Lys Pro Leu Val Val Ile Gln Leu
        515                 520                 525

Gly Asp Gln Val Asp Asp Thr Ala Leu Leu Lys Asn Lys Lys Ile Asn
    530                 535                 540

Ser Ile Leu Trp Val Asn Tyr Pro Gly Gln Asp Gly Gly Thr Ala Val
545                 550                 555                 560

Met Asp Leu Leu Thr Gly Arg Lys Ser Pro Ala Gly Arg Leu Pro Val
                565                 570                 575

Thr Gln Tyr Pro Ser Lys Tyr Thr Glu Gln Ile Gly Met Thr Asp Met
            580                 585                 590

Asp Leu Arg Pro Thr Lys Ser Leu Pro Gly Arg Thr Tyr Arg Trp Tyr
        595                 600                 605

Ser Thr Pro Val Leu Pro Tyr Gly Phe Gly Leu His Tyr Thr Lys Phe
    610                 615                 620
```

Gln Ala Lys Phe Lys Ser Asn Lys Leu Thr Phe Asp Ile Gln Lys Leu
625 630 635 640

Leu Lys Gly Cys Ser Ala Gln Tyr Ser Asp Thr Cys Ala Leu Pro Pro
645 650 655

Ile Gln Val Ser Val Lys Asn Thr Gly Arg Ile Thr Ser Asp Phe Val
660 665 670

Ser Leu Val Phe Ile Lys Ser Glu Val Gly Pro Lys Pro Tyr Pro Leu
675 680 685

Lys Thr Leu Ala Ala Tyr Gly Arg Leu His Asp Val Ala Pro Ser Ser
690 695 700

Thr Lys Asp Ile Ser Leu Glu Trp Thr Leu Asp Asn Ile Ala Arg Arg
705 710 715 720

Gly Glu Asn Gly Asp Leu Val Val Tyr Pro Gly Thr Tyr Thr Leu Leu
725 730 735

Leu Asp Glu Pro Thr Gln Ala Lys Ile Gln Val Thr Leu Thr Gly Lys
740 745 750

Lys Ala Ile Leu Asp Lys Trp Pro Gln Asp Pro Lys Ser Ala
755 760 765

<210> 3
< 211> 350
< 212> PRT
< 213> Fusarium verticillioides

<400> 3

Met Gln Leu Lys Phe Leu Ser Ser Ala Leu Leu Leu Ser Leu Thr Gly
1 5 10 15

Asn Cys Ala Ala Gln Asp Thr Asn Asp Ile Pro Pro Leu Ile Thr Asp
20 25 30

Leu Trp Ser Ala Asp Pro Ser Ala His Val Phe Glu Gly Lys Leu Trp
35 40 45

Val Tyr Pro Ser His Asp Ile Glu Ala Asn Val Val Asn Gly Thr Gly
50 55 60

Gly Ala Gln Tyr Ala Met Arg Asp Tyr His Thr Tyr Ser Met Lys Thr
65 70 75 80

Ile Tyr Gly Lys Asp Pro Val Ile Asp His Gly Val Ala Leu Ser Val
85 90 95

```
Asp Asp Val Pro Trp Ala Lys Gln Gln Met Trp Ala Pro Asp Ala Ala
            100                 105                 110

Tyr Lys Asn Gly Lys Tyr Tyr Leu Tyr Phe Pro Ala Lys Asp Lys Asp
        115                 120                 125

Glu Ile Phe Arg Ile Gly Val Ala Val Ser Asn Lys Pro Ser Gly Pro
    130                 135                 140

Phe Lys Ala Asp Lys Ser Trp Ile Pro Gly Thr Tyr Ser Ile Asp Pro
145                 150                 155                 160

Ala Ser Tyr Val Asp Thr Asn Gly Glu Ala Tyr Leu Ile Trp Gly Gly
                165                 170                 175

Ile Trp Gly Gly Gln Leu Gln Ala Trp Gln Asp His Lys Thr Phe Asn
            180                 185                 190

Glu Ser Trp Leu Gly Asp Lys Ala Ala Pro Asn Gly Thr Asn Ala Leu
        195                 200                 205

Ser Pro Gln Ile Ala Lys Leu Ser Lys Asp Met His Lys Ile Thr Glu
    210                 215                 220

Thr Pro Arg Asp Leu Val Ile Leu Ala Pro Glu Thr Gly Lys Pro Leu
225                 230                 235                 240

Gln Ala Glu Asp Asn Lys Arg Arg Phe Phe Glu Gly Pro Trp Val His
                245                 250                 255

Lys Arg Gly Lys Leu Tyr Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Gly Asp Thr His
            260                 265                 270

Phe Leu Val Tyr Ala Thr Ser Lys Asn Ile Tyr Gly Pro Tyr Thr Tyr
        275                 280                 285

Gln Gly Lys Ile Leu Asp Pro Val Asp Gly Trp Thr Thr His Gly Ser
    290                 295                 300

Ile Val Glu Tyr Lys Gly Gln Trp Trp Leu Phe Phe Ala Asp Ala His
305                 310                 315                 320

Thr Ser Gly Lys Asp Tyr Leu Arg Gln Val Lys Ala Arg Lys Ile Trp
                325                 330                 335

Tyr Asp Lys Asp Gly Lys Ile Leu Leu Thr Arg Pro Lys Ile
            340                 345                 350
```

<210> 4
< 211> 660
< 212> PRT
< 213> Fusarium verticillioides

<400> 4

```
Met Val Arg Phe Ser Ser Ile Leu Ala Ala Ala Ala Cys Phe Val Ala
1               5                  10                  15

Val Glu Ser Val Asn Ile Lys Val Asp Ser Lys Gly Gly Asn Ala Thr
            20                  25                  30

Ser Gly His Gln Tyr Gly Phe Leu His Glu Asp Ile Asn Asn Ser Gly
        35                  40                  45

Asp Gly Gly Ile Tyr Ala Glu Leu Ile Arg Asn Arg Ala Phe Gln Tyr
    50                  55                  60

Ser Lys Lys Tyr Pro Val Ser Leu Ser Gly Trp Arg Pro Ile Asn Asp
65                  70                  75                  80

Ala Lys Leu Ser Leu Asn Arg Leu Asp Thr Pro Leu Ser Asp Ala Leu
                85                  90                  95

Pro Val Ser Met Asn Val Lys Pro Gly Lys Gly Lys Ala Lys Glu Ile
            100                 105                 110

Gly Phe Leu Asn Glu Gly Tyr Trp Gly Met Asp Val Lys Lys Gln Lys
        115                 120                 125

Tyr Thr Gly Ser Phe Trp Val Lys Gly Ala Tyr Lys Gly His Phe Thr
    130                 135                 140

Ala Ser Leu Arg Ser Asn Leu Thr Asp Asp Val Phe Gly Ser Val Lys
145                 150                 155                 160

Val Lys Ser Lys Ala Asn Lys Lys Gln Trp Val Glu His Glu Phe Val
                165                 170                 175

Leu Thr Pro Asn Lys Asn Ala Pro Asn Ser Asn Asn Thr Phe Ala Ile
            180                 185                 190

Thr Tyr Asp Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ala Leu Asp Phe Asn Leu Ile
        195                 200                 205

Ser Leu Phe Pro Pro Thr Tyr Lys Gly Arg Lys Asn Gly Leu Arg Val
    210                 215                 220

Asp Leu Ala Glu Ala Leu Glu Gly Leu His Pro Ser Leu Leu Arg Phe
225                 230                 235                 240

Pro Gly Gly Asn Met Leu Glu Gly Asn Thr Asn Lys Thr Trp Trp Asp
                245                 250                 255

Trp Lys Asp Thr Leu Gly Pro Leu Arg Asn Arg Pro Gly Phe Glu Gly
```

260 265 270

Val Trp Asn Tyr Gln Gln Thr His Gly Leu Gly Ile Leu Glu Tyr Leu
275 280 285

Gln Trp Ala Glu Asp Met Asn Leu Glu Ile Ile Val Gly Val Tyr Ala
290 295 300

Gly Leu Ser Leu Asp Gly Ser Val Thr Pro Lys Asp Gln Leu Gln Pro
305 310 315 320

Leu Ile Asp Asp Ala Leu Asp Glu Ile Glu Phe Ile Arg Gly Pro Val
325 330 335

Thr Ser Lys Trp Gly Lys Lys Arg Ala Glu Leu Gly His Pro Lys Pro
340 345 350

Phe Arg Leu Ser Tyr Val Glu Val Gly Asn Glu Asp Trp Leu Ala Gly
355 360 365

Tyr Pro Thr Gly Trp Asn Ser Tyr Lys Glu Tyr Arg Phe Pro Met Phe
370 375 380

Leu Glu Ala Ile Lys Lys Ala His Pro Asp Leu Thr Val Ile Ser Ser
385 390 395 400

Gly Ala Ser Ile Asp Pro Val Gly Lys Lys Asp Ala Gly Phe Asp Ile
405 410 415

Pro Ala Pro Gly Ile Gly Asp Tyr His Pro Tyr Arg Glu Pro Asp Val
420 425 430

Leu Val Glu Glu Phe Asn Leu Phe Asp Asn Asn Lys Tyr Gly His Ile
435 440 445

Ile Gly Glu Val Ala Ser Thr His Pro Asn Gly Gly Thr Gly Trp Ser
450 455 460

Gly Asn Leu Met Pro Tyr Pro Trp Trp Ile Ser Gly Val Gly Glu Ala
465 470 475 480

Val Ala Leu Cys Gly Tyr Glu Arg Asn Ala Asp Arg Ile Pro Gly Thr
485 490 495

Phe Tyr Ala Pro Ile Leu Lys Asn Glu Asn Arg Trp Gln Trp Ala Ile
500 505 510

Thr Met Ile Gln Phe Ala Ala Asp Ser Ala Met Thr Thr Arg Ser Thr
515 520 525

Ser Trp Tyr Val Trp Ser Leu Phe Ala Gly His Pro Met Thr His Thr

530 535 540

Leu Pro Thr Thr Ala Asp Phe Asp Pro Leu Tyr Tyr Val Ala Gly Lys
545 550 555 560

Asn Glu Asp Lys Gly Thr Leu Ile Trp Lys Gly Ala Ala Tyr Asn Thr
565 570 575

Thr Lys Gly Ala Asp Val Pro Val Ser Leu Ser Phe Lys Gly Val Lys
580 585 590

Pro Gly Ala Gln Ala Glu Leu Thr Leu Leu Thr Asn Lys Glu Lys Asp
595 600 605

Pro Phe Ala Phe Asn Asp Pro His Lys Gly Asn Asn Val Val Asp Thr
610 615 620

Lys Lys Thr Val Leu Lys Ala Asp Gly Lys Gly Ala Phe Asn Phe Lys
625 630 635 640

Leu Pro Asn Leu Ser Val Ala Val Leu Glu Thr Leu Lys Lys Gly Lys
645 650 655

Pro Tyr Ser Ser
660

<210> 5
< 211> 1352
< 212> ADN
< 213> Trichoderma reesei

<400> 5

atgaaagcaa acgtcatctt gtgcctcctg gccccccctgg tcgccgctct ccccaccgaa 60
accatccacc tcgaccccga gctcgccgct ctccgcgcca acctcaccga gcgaacagcc 120
gacctctggg accgccaagc ctctcaaagc atcgaccagc tcatcaagag aaaaggcaag 180
ctctactttg gcaccgccac cgaccgcggc ctcctccaac gggaaaagaa cgcggccatc 240
atccaggcag acctcggcca ggtgacgccg gagaacagca tgaagtggca gtcgctcgag 300
aacaaccaag gccagctgaa ctggggagac gccgactatc tcgtcaactt tgcccagcaa 360
aacggcaagt cgatacgcgg ccacactctg atctggcact cgcagctgcc tgcgtgggtg 420
aacaatatca acaacgcgga tactctgcgg caagtcatcc gcacccatgt ctctactgtg 480
gttgggcggt acaagggcaa gattcgtgct tgggtgagtt ttgaacacca catgcccctt 540
ttcttagtcc gctcctcctc ctcttggaac ttctcacagt tatagccgta tacaacattc 600
gacaggaaat ttaggatgac aactactgac tgacttgtgt gtgtgatggc gataggacgt 660
ggtcaatgaa atcttcaacg aggatggaac gctgcgctct tcagtctttt ccaggctcct 720
cggcgaggag tttgtctcga ttgcctttcg tgctgctcga gatgctgacc cttctgcccg 780
tctttacatc aacgactaca atctcgaccg cgccaactat ggcaaggtca acgggttgaa 840

gacttacgtc tccaagtgga tctctcaagg agttcccatt gacggtattg gtgagccacg 900

acccctaaat gtcccccatt agagtctctt tctagagcca aggcttgaag ccattcaggg 960

actgacacga gagccttctc tacaggaagc cagtcccatc tcagcggcgg cggaggctct 1020

ggtacgctgg gtgcgctcca gcagctggca acggtacccg tcaccgagct ggccattacc 1080

gagctggaca ttcaggggggc accgacgacg gattacaccc aagttgttca agcatgcctg 1140

agcgtctcca agtgcgtcgg catcaccgtg tggggcatca gtgacaaggt aagttgcttc 1200

ccctgtctgt gcttatcaac tgtaagcagc aacaactgat gctgtctgtc tttacctagg 1260

actcgtggcg tgccagcacc aaccctcttc tgtttgacgc aaacttcaac cccaagccgg 1320

catataacag cattgttggc atcttacaat ag 1352

<210> 6
< 211> 2358
< 212> ADN
< 213> Fusarium verticillioides

<400> 6

atgctgctca atcttcaggt cgctgccagc gctttgtcgc tttctctttt aggtggattg 60

gctgaggctg ctacgccata taccttccg gactgtacca aaggaccttt gagcaagaat 120

ggaatctgcg atacttcgtt atctccagct aaaagagcgg ctgctctagt tgctgctctg 180

acgcccgaag agaaggtggg caatctggtc aggtaaaata taccccccc cataatcact 240

attcggagat tggagctgac ttaacgcagc aatgcaactg gtgcaccaag aatcggactt 300

ccaaggtaca actggtggaa cgaagccctt catggcctcg ctggatctcc aggtggtcgc 360

tttgccgaca ctcctcccta cgacgcggcc acatcatttc ccatgcctct tctcatggcc 420

gctgctttcg acgatgatct gatccacgat atcggcaacg tcgtcggcac cgaagcgcgt 480

gcgttcacta acggcggttg gcgcggagtc gacttctgga cacccaacgt caacccttt 540

aaagatcctc gctggggtcg tggctccgaa actccaggtg aagatgccct tcatgtcagc 600

cggtatgctc gctatatcgt caggggtctc gaaggcgata aggagcaacg acgtattgtt 660

gctacctgca agcactatgc tggaaacgac tttgaggact ggggaggctt cacgcgtcac 720

gactttgatg ccaagattac tcctcaggac ttggctgagt actacgtcag gcctttccag 780

gagtgcaccc gtgatgcaaa ggttggttcc atcatgtgcg cctacaatgc cgtgaacggc 840

attcccgcat gcgcaaactc gtatctgcag gagacgatcc tcagagggca ctggaactgg 900

acgcgcgata acaactggat cactagtgat tgtggcgcca tgcaggatat ctggcagaat 960

cacaagtatg tcaagaccaa cgctgaaggt gcccaggtag cttttgagaa cggcatggat 1020

tctagctgcg agtatactac taccagcgat gtctccgatt cgtacaagca aggcctcttg 1080

actgagaagc tcatggatcg ttcgttgaag cgccttttcg aagggcttgt tcatactggt 1140

ttctttgacg gtgccaaagc gcaatggaac tcgctcagtt ttgcggatgt caacaccaag 1200

gaagctcagg atcttgcact cagatctgct gtggagggtg ctgttcttct taagaatgac 1260

ggcactttgc ctctgaagct caagaagaag gatagtgttg caatgatcgg attctgggcc 1320
aacgatactt ccaagctgca gggtggttac agtggacgtg ctccgttcct ccacagcccg 1380
ctttatgcag ctgagaagct tggtcttgac accaacgtgg cttggggtcc gacactgcag 1440
aacagctcat ctcatgataa ctggaccacc aatgctgttg ctgcggcgaa gaagtctgat 1500
tacattctct actttggtgg tcttgacgcc tctgctgctg gcgaggacag agatcgtgag 1560
aaccttgact ggcctgagag ccagctgacc cttcttcaga agctctctag tctcggcaag 1620
ccactggttg ttatccagct tggtgatcaa gtcgatgaca ccgctctttt gaagaacaag 1680
aagattaaca gtattctttg ggtcaattac cctggtcagg atggcggcac tgcagtcatg 1740
gacctgctca ctggacgaaa gagtcctgct ggccgactac ccgtcacgca atatcccagt 1800
aaatacactg agcagattgg catgactgac atggacctca gacctaccaa gtcgttgcca 1860
gggagaactt atcgctggta ctcaactcca gttcttccct acggctttgg cctccactac 1920
accaagttcc aagccaagtt caagtccaac aagttgacgt ttgacatcca gaagcttctc 1980
aagggctgca gtgctcaata ctccgatact tgcgcgctgc cccccatcca agttagtgtc 2040
aagaacaccg gccgcattac ctccgacttt gtctctctgg tctttatcaa gagtgaagtt 2100
ggacctaagc cttaccctct caagaccctt gcggcttatg gtcgcttgca tgatgtcgcg 2160
ccttcatcga cgaaggatat ctcactggag tggacgttgg ataacattgc gcgacgggga 2220
gagaatggtg atttggttgt ttatcctggg acttacactc tgttgctgga tgagcctacg 2280
caagccaaga tccaggttac gctgactgga aagaaggcta ttttggataa gtggcctcaa 2340
gaccccaagt ctgcgtaa 2358

<210> 7
< 211> 1053
< 212> ADN
< 213> Fusarium verticillioides

<400> 7

atgcagctca agtttctgtc ttcagcattg ttgctgtctt tgaccggcaa ttgcgctgcg 60
caagacacta atgatatccc tcctctgatc accgacctct ggtctgcgga tccctcggct 120
catgttttcg agggcaaact ctgggtttac ccatctcacg acatcgaagc caatgtcgtc 180
aacggcaccg gaggcgctca gtacgccatg agagattatc acacctattc catgaagacc 240
atctatggaa aagatcccgt tatcgaccat ggcgtcgctc tgtcagtcga tgatgtccca 300
tgggccaagc agcaaatgtg ggctcctgac gcagcttaca agaacggcaa atattatctc 360
tacttccccg ccaaggataa agatgagatc ttcagaattg gagttgctgt ctccaacaag 420
cccagcggtc ctttcaaggc cgacaagagc tggatccccg gtacttacag tatcgatcct 480
gctagctatg tcgacactaa tggcgaggca tacctcatct ggggcggtat ctggggcggc 540
cagcttcagg cctggcagga tcacaagacc tttaatgagt cgtggctcgg cgacaaagct 600
gctcccaacg gcaccaacgc cctatctcct cagatcgcca agctaagcaa ggacatgcac 660
aagatcaccg agacaccccg cgatctcgtc atcctggccc ccgagacagg caagcccctt 720

caagcagagg acaataagcg acgatttttc gaggggccct gggttcacaa gcgcggcaag 780

ctgtactacc tcatgtactc taccggcgac acgcacttcc tcgtctacgc gacttccaag 840

aacatctacg gtccttatac ctatcagggc aagattctcg accctgttga tgggtggact 900

acgcatggaa gtattgttga gtacaaggga cagtggtggt tgttctttgc ggatgcgcat 960

acttctggaa aggattatct gagacaggtt aaggcgagga agatctggta tgacaaggat 1020

ggcaagattt tgcttactcg tcctaagatt tag 1053

<210> 8
< 211> 2186
< 212> ADN
< 213> Fusarium verticillioides

<400> 8

atggttcgct tcagttcaat cctagcggct gcggcttgct tcgtggctgt tgagtcagtc 60

aacatcaagg tcgacagcaa gggcggaaac gctactagcg gtcaccaata tggcttcctt 120

cacgaggttg gtattgacac accactggcg atgattggga tgctaacttg gagctaggat 180

atcaacaatt ccggtgatgg tggcatctac gctgagctca tccgcaatcg tgctttccag 240

tacagcaaga aataccctgt ttctctatct ggctggagac ccatcaacga tgctaagctc 300

tccctcaacc gtctcgacac tcctctctcc gacgctctcc ccgtttccat gaacgtgaag 360

cctggaaagg gcaaggccaa ggagattggt ttcctcaacg agggttactg gggaatggat 420

gtcaagaagc aaaagtacac tggctctttc tgggttaagg gcgcttacaa gggccacttt 480

acagcttctt tgcgatctaa ccttaccgac gatgtctttg gcagcgtcaa ggtcaagtcc 540

aaggccaaca agaagcagtg ggttgagcat gagtttgtgc ttactcctaa caagaatgcc 600

cctaacagca acaacacttt tgctatcacc tacgatccca aggtgagtaa caatcaaaac 660

tgggacgtga tgtatactga caatttgtag ggcgctgatg gagctcttga cttcaacctc 720

attagcttgt tccctcccac ctacaagggc cgcaagaacg gtcttcgagt tgatcttgcc 780

gaggctctcg aaggtctcca ccccgtaagg tttaccgtct cacgtgtatc gtgaacagtc 840

gctgacttgt agaaaagagc ctgctgcgct tccccggtgg taacatgctc gagggcaaca 900

ccaacaagac ctggtgggac tggaaggata ccctcggacc tctccgcaac cgtcctggtt 960

tcgagggtgt ctggaactac cagcagaccc atggtcttgg aatcttggag tacctccagt 1020

gggctgagga catgaacctt gaaatcagta ggttctataa aattcagtga cggttatgtg 1080

catgctaaca gatttcagtt gtcggtgtct acgctggcct ctccctcgac ggctccgtca 1140

cccccaagga ccaactccag cccctcatcg acgacgcgct cgacgagatc gaattcatcc 1200

gaggtcccgt cacttcaaag tggggaaaga agcgcgctga gctcggccac cccaagcctt 1260

tcagactctc ctacgttgaa gtcggaaacg aggactggct cgctggttat cccactggct 1320

ggaactctta caaggagtac cgcttcccca tgttcctcga ggctatcaag aaagctcacc 1380

ccgatctcac cgtcatctcc tctggtgctt ctattgaccc cgttggtaag aaggatgctg 1440

gtttcgatat tcctgctcct ggaatcggtg actaccaccc ttaccgcgag cctgatgttc 1500
ttgttgagga gttcaacctg tttgataaca ataagtatgg tcacatcatt ggtgaggttg 1560
cttctaccca ccccaacggt ggaactggct ggagtggtaa ccttatgcct tacccctggt 1620
ggatctctgg tgttggcgag gccgtcgctc tctgcggtta tgagcgcaac gccgatcgta 1680
ttcccggaac attctacgct cctatcctca agaacgagaa ccgttggcag tgggctatca 1740
ccatgatcca attcgccgcc gactccgcca tgaccacccg ctccaccagc tggtatgtct 1800
ggtcactctt cgcaggccac cccatgaccc atactctccc caccaccgcc gacttcgacc 1860
ccctctacta cgtcgctggt aagaacgagg acaagggaac tcttatctgg aagggtgctg 1920
cgtataacac caccaagggt gctgacgttc ccgtgtctct gtccttcaag ggtgtcaagc 1980
ccggtgctca agctgagctt actcttctga ccaacaagga gaaggatcct tttgcgttca 2040
atgatcctca caagggcaac aatgttgttg atactaagaa gactgttctc aaggccgatg 2100
gaaagggtgc tttcaacttc aagcttccta acctgagcgt cgctgttctt gagaccctca 2160
agaagggaaa gccttactct agctag 2186

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para separar una fracción líquida de un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica que comprende:

a) proporcionar un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica que comprende un producto diana seleccionado del grupo constituido por etanol, butanol y 1,3-propanodiol;

b) opcionalmente, retirar el producto diana del caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica de (a), produciendo un caldo empobrecido;

c) tratar térmicamente el caldo de (a) o el caldo empobrecido de (b) a una temperatura y durante un tiempo suficientes para producir un caldo o caldo empobrecido que tiene una resistencia de la torta de filtración reducida al menos aproximadamente un 20% en comparación con el caldo inicial respectivo de (a) o el caldo empobrecido de (b); y

d) hacer pasar el caldo tratado o caldo empobrecido de (c) a través de un filtro, separando con ello una fracción líquida de una fracción sólida.

2. El proceso de la reivindicación 1 en donde el paso de tratamiento de (c) se realiza a una temperatura entre 70ºC y 150ºC.

3. El proceso de la reivindicación 2 en donde la temperatura está comprendida entre 95ºC y 150ºC.

4. El proceso de la reivindicación 1 en donde el tiempo de tratamiento en el paso (c) está comprendido entre 30 minutos y 210 minutos.

5. El proceso de la reivindicación 1 en donde el tratamiento del paso (c) tiene lugar a una temperatura comprendida entre 110ºC y 150ºC, y durante un tiempo comprendido entre 30 segundos y 2 minutos.

6. El proceso de la reivindicación 1 en donde el caldo de fermentación del hidrolizado de biomasa lignocelulósica de (a) o caldo empobrecido de (b) alcanza un pH de pH 6 o inferior antes o durante el tratamiento de (c).

7. El proceso de la reivindicación 1 en donde el paso a través de un filtro de (d) tiene lugar por filtración a vacío o filtración a presión.

8. El proceso de la reivindicación 1 en donde el producto diana es etanol, y en donde el etanol se retira del caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica en el paso (b) por destilación, produciéndose un caldo empobrecido que es una hez completa.

9. El proceso de la reivindicación 1 en donde el producto diana es butanol, y en donde el butanol se retira del caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica en el paso (b) por extracción con disolvente, produciéndose un caldo empobrecido.

10. El proceso de la reivindicación 1 en donde el caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica se produce a partir de biomasa que se selecciona del grupo constituido por mijo perenne, papel de desechos, papilla de fabricación de papel, mazorcas de maíz, cascarilla de maíz, forraje de maíz, hierbas, trigo, paja de trigo, heno, paja de cebada, paja de arroz, bagazo de caña de azúcar, componentes obtenidos del procesamiento de cereales, árboles, ramas, raíces, hojas, virutas de madera, serrín de madera, arbustos y matorrales, hortalizas, frutos, y flores.

11. El proceso de la reivindicación 1 en donde la fracción líquida del paso (d) se recicla.