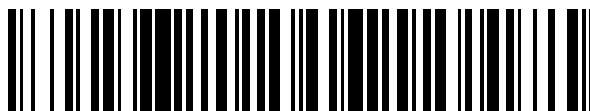


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 466**

51 Int. Cl.:

C12N 1/22 (2006.01)

C12P 7/10 (2006.01)

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2010 E 10730012 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2449092**

54 Título: **Proceso de hidrólisis de biomasa**

30 Prioridad:

30.06.2009 US 221689 P

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

30.11.2015

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (50.0%)
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK y
NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**REN, HAIYU;
HUANG, HONG ZHI;
WANG, YUN y
HIGGINS, DON**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 552 466 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso de hidrólisis de biomasa.

5 Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere a procesos que comprenden el reciclaje de soluciones de lavado usadas en el pretratamiento de materiales que contienen lignocelulosa.

10 Antecedentes de la invención

[0002] Debido a las reservas limitadas de combustibles fósiles y a la preocupación acerca de la emisión de gases invernadero, existe un interés creciente en el uso de fuentes de energía renovables, por ejemplo, los productos de fermentación, tales como el bioetanol. La producción de etanol a partir de material que contiene lignocelulosa se conoce en la técnica y, de forma convencional, incluye el pretratamiento, hidrólisis y fermentación del material que contiene lignocelulosa. El pretratamiento resulta en la liberación de productos de degradación del material que contiene lignocelulosa que pueden enlazar e inhibir irreversiblemente enzimas añadidas durante la hidrólisis y la fermentación.

20 [0003] La concentración de estos inhibidores en el material pretratado que contiene lignocelulosa se puede reducir mediante lavado antes de la hidrólisis. No obstante, los inhibidores frecuentemente tienen una baja solubilidad y el reciclaje del agua de lavado sólo es posible hasta cierto punto muy limitado debido al incremento de los inhibidores. El lavado, por lo tanto, requiere cantidades enormes de agua.

25 [0004] Por consiguiente, hay una necesidad de suministrar métodos mejorados para procesar el material pretratado que contiene lignocelulosa hasta obtener sustratos adecuados para la hidrólisis y la fermentación.

[0005] WO 2009/030713 divulga un proceso para la conversión de un material que contiene lignocelulosa en un hidrolizado que incluye las etapas de: (a) someter un material que contiene lignocelulosa a un pretratamiento, (b) lavar el material que contiene lignocelulosa pretratado en una solución de lavado, (c) separar la solución de lavado utilizada para obtener un material que contiene lignocelulosa pretratado y lavado, (d) someter el material pretratado y lavado que contiene lignocelulosa a un tratamiento que da como resultado al menos la hidrólisis parcial de la celulosa y/o hemicelulosa para obtener un hidrolizado, donde la solución de lavado utilizada en el paso (b) es tratada para eliminar un inhibidor enzimático y/o un inhibidor de un organismo fermentador antes de ser reciclada para el paso (b), preferiblemente donde la solución de lavado utilizada en el paso (b) es tratada mediante el contacto ésta con una columna de resina antes de ser reciclada para el paso (b).

Resumen de la invención

40 [0006] La presente invención se refiere a procesos que comprenden la eliminación de y/o inactivación de inhibidores de un material pretratado que contiene lignocelulosa mediante lavado, y el reciclaje de la solución de lavado utilizada. La solución de lavado utilizada se regenera mediante eliminación y/o inactivación de un inhibidor enzimático, lo que mejora la eficacia del paso de hidrólisis. La invención también se refiere a procesos de producción de un hidrolizado y de un producto de fermentación a partir de un material que contiene lignocelulosa.

45 [0007] Por consiguiente, la invención se refiere a un procedimiento para convertir un material que contiene lignocelulosa en un hidrolizado que comprende las etapas de: (a) someter un material que contiene lignocelulosa a un pretratamiento, (b) lavar el material que contiene lignocelulosa pretratado en una solución de lavado, (c) separar la solución de lavado utilizada para obtener un material que contiene lignocelulosa pretratado y lavado, (d) someter el material que contiene lignocelulosa pretratado y lavado a un tratamiento que da como resultado al menos la hidrólisis parcial de la celulosa y/o hemicelulosa para obtener un hidrolizado, y (e) tratar la solución de lavado utilizada en el paso (c) con una xilanasas antes de ser reciclada para el paso (b).

50 [0008] Entre las ventajas de los procedimientos se incluyen una reducción del consumo de agua, ya que la solución de lavado se puede reciclar, el hecho de que los azúcares solubles (por ejemplo, xilosa, oligosacáridos) producidos a partir del pretratamiento se pueden concentrar en la solución de lavado, y la eficacia aumentada de la hidrólisis.

Descripción detallada de la invención

60 Material que contiene lignocelulosa

[0009] El término "materiales que contienen lignocelulosa" utilizado en este documento se refiere a un material que consiste principalmente en celulosa, hemicelulosa y lignina. A los materiales con lignocelulosa frecuentemente se hace referencia como "biomasa".

65 [0010] La estructura de lignocelulosa no es directamente accesible a la hidrólisis enzimática. Por lo tanto, la

lignocelulosa tiene que ser pretratada, por ejemplo, mediante hidrólisis ácida en condiciones adecuadas de presión, humedad y temperatura, para romper el sello de lignina y romper la estructura cristalina de celulosa. Esto causa la solubilización y sacarificación de la fracción de hemicelulosa. Entonces, la fracción de celulosa puede ser hidrolizada, por ejemplo, de forma enzimática mediante enzimas de celulasa, para convertir los polímeros de carbohidrato en mono y oligosacáridos, que se pueden fermentar hasta lograr un producto de fermentación deseada, tal como etanol. De manera opcional, el producto de fermentación se recupera, por ejemplo, mediante destilación.

[0011] Cualquier material que contiene lignocelulosa se contempla según la presente invención. El material que contiene lignocelulosa puede ser cualquier material que contenga lignocelulosa. En una forma de realización preferida, el material que contiene lignocelulosa contiene al menos 30 % en peso, preferiblemente al menos 50 % en peso, de forma más preferible al menos 70 % en peso, incluso de forma más preferible al menos 90 % en peso de lignocelulosa. Debe entenderse que el material que contiene lignocelulosa también puede comprender otros constituyentes tales como material celulósico, incluyendo celulosa y hemicelulosa, y también puede comprender otros constituyentes tales como material proteínico, almidón, azúcares, tales como azúcares fermentables y/o azúcares no fermentables.

[0012] Generalmente se encuentra material que contiene lignocelulosa en, por ejemplo, los tallos, hojas, vainas, cáscaras y mazorcas de plantas u hojas, ramas y madera de árboles. El material que contiene lignocelulosa puede ser, pero no se limita a, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos de silvicultura, residuos sólidos urbanos, papel de desecho, y pulpa y residuos de fábrica de papel. En este documento se entiende que el material que contiene lignocelulosa puede tener forma de material de pared celular vegetal que contiene lignina, celulosa, y hemicelulosa en una matriz mezclada.

[0013] El material que contiene lignocelulosa puede comprender rastrojos de maíz, maderas duras, tales como álamo y abedul, maderas blandas tales como madera de pino, pasto varilla, paja de cereal y/o vainas, tales como paja de arroz, trigo, centeno de cebada etc., residuos sólidos urbanos (RSU), residuos orgánicos industriales, papel de oficina, astillas de madera, bagazo, papel o residuos de tratamiento de pulpa o mezclas derivadas.

[0014] En una forma de realización preferida, el material que contiene celulosa es rastrojo de maíz. En otro aspecto preferido, el material que contiene celulosa es fibra de maíz.

Pretratamiento

[0015] El material que contiene lignocelulosa se puede pretratar de cualquier modo adecuado. El pretratamiento se realiza antes de la hidrólisis y/o de la fermentación. El objetivo del pretratamiento es separar y/o liberar celulosa, hemicelulosa y/o lignina y, de esta manera, mejorar el índice de hidrólisis. Métodos de pretratamiento tales como la oxidación húmeda y el pretratamiento alcalino actúan sobre la lignina, mientras que el ácido diluido y la autohidrólisis actúan sobre la hemicelulosa. La explosión de vapor es un ejemplo de pretratamiento que actúa sobre la celulosa.

[0016] Según la invención, el paso de pretratamiento (a) puede ser un paso de pretratamiento convencional que utiliza técnicas ampliamente conocidas en la técnica. En una forma de realización preferida, el pretratamiento tiene lugar en un lodo acuoso. Durante el pretratamiento, el material que contiene lignocelulosa puede estar presente en una cantidad entre 10-80 % en peso, preferiblemente entre 20-70 % en peso, especialmente entre 30-60 % en peso, tal como alrededor de 50 % en peso.

[0017] El pretratamiento se lleva a cabo antes de la hidrólisis y/o de la fermentación.

[0018] El término "tratamiento químico" se refiere a cualquier pretratamiento químico que favorece la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina. Los ejemplos de pretratamientos químicos adecuados incluyen tratamiento con, por ejemplo, ácido diluido, cal, solvente alcalino, orgánico, amoníaco, dióxido de azufre, dióxido de carbono. Además, la oxidación húmeda y la hidrotermólisis controlada por pH también se consideran pretratamiento químico.

[0019] En una forma de realización preferida, el pretratamiento químico es el tratamiento ácido, de forma más preferible, un diluido continuo y/o tratamiento ácido suave, tal como un tratamiento con ácido sulfúrico, u otro ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, cloruro de hidrógeno o mezclas de éstos. Otros ácidos también pueden ser usados. Tratamiento de ácido suave significa que el pH del tratamiento se encuentra en el rango de 1-5, preferiblemente pH 1-3. En una forma de realización específica, la concentración ácida está en el rango de 0.1 a 2.0 % en peso de ácido, preferiblemente ácido sulfúrico. El ácido puede ponerse en contacto con el material que contiene lignocelulosa y la mezcla se puede mantener a una temperatura en el rango de 160- 220°C, como por ejemplo 165-195°C, durante periodos que varían, por ejemplo, entre 1-60 minutos, tales como entre 2-30 minutos o 3-12 minutos. La adición de ácidos fuertes, como ácido sulfúrico, se puede llevar a cabo para eliminar la hemicelulosa. Esto favorece la digestibilidad de la celulosa.

[0020] También se contemplan otras técnicas. Se ha observado que el tratamiento con solvente de celulosa convierte aproximadamente el 90% de la celulosa en glucosa. También se ha observado que la hidrólisis enzimática

podría verse estimulada cuando la estructura de lignocelulosa se rompe. H₂O₂ alcalino, ozono, organosolv (usa ácidos de Lewis, FeCl₃, (Al)₂ SO₄ en alcoholes acuosos), glicerol, dioxano, fenol, o etilenglicol están entre los solventes que se sabe que interrumpen la estructura de celulosa y favorecen la hidrólisis (Mosier et al., 2005, Bioresource Technology 96: 673-686).

5 [0021] El pretratamiento químico alcalino con base, por ejemplo, NaOH, Na₂ CO₃ y/o amoníaco o similares, también se contempla según la invención. Se describen métodos de pretatamiento que usan amoníaco en, por ejemplo, WO 2006/110891, WO 2006/110899, WO 2006/110900, y WO 2006/110901.

10 [0022] Las técnicas de oxidación húmedas implican el uso de agentes oxidantes, tales como agentes oxidantes basados en sulfitos o similares. Entre los ejemplos de pretratamientos con solventes se incluyen el tratamiento con DMSO (dimetilsulfóxido) o similares. El pretratamiento químico se realiza generalmente durante 1 a 60 minutos, por ejemplo de 5 a 30 minutos, pero se puede realizar durante periodos de tiempo más cortos o más largos en función del material que va a ser pretratado.

15 [0023] Otros ejemplos de métodos de pretratamiento adecuado son descritos por Schell et al., 2003, Appl. Biochem, and Biotechn. 105-108: 69-85; Mosier et al., 2005, Bioresource Technology 96: 673- 686; Ahring et al. en WO 2006/032282 y WO 2001/060752, Foody et al. en WO 2006/034590; y Ballesteros et al. en la publicación de EEUU nº 2002/0164730.

20 [0024] El término "pretratamiento mecánico" se refiere a cualquier tratamiento mecánico (o físico) que ayuda a la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina a partir de un material que contiene lignocelulosa. Por ejemplo, el pretratamiento mecánico incluye varios tipos de fresado, irradiación, explosión de vaporización/vapor, oxidación húmeda y otros tratamientos hidrotermales.

25 [0025] El pretratamiento mecánico incluye fragmentación (reducción mecánica del tamaño). La fragmentación incluye molido en seco, molido en húmedo y molido con bolas vibratorio. El pretratamiento mecánico puede implicar altas presiones y/o temperaturas altas (explosión de vapor). En una forma de realización de la invención, alta presión significa presión en el rango de 300 a 600 psi, preferiblemente 400 a 500 psi, como alrededor de 450 psi. En una forma de realización de la invención, alta temperatura significa temperaturas en el rango de aproximadamente 100 a 300°C, preferiblemente de aproximadamente 140 a 235°C. En una forma de realización preferida, el pretratamiento mecánico es un sistema de hidrólisis con pistola de vapor y de procesamiento por lotes que usa una presión alta y una temperatura alta tal y como se ha definido anteriormente. Un hidrolizador Sunds (disponible en Sunds Defibrator AB (Suecia) se puede utilizar para esto.

35 [0026] En una forma de realización preferida, se llevan a cabo los pretratamientos tanto químico como mecánico. Por ejemplo, el paso de pretratamiento puede implicar un tratamiento con ácido diluido o suave y un tratamiento con alta temperatura y/o de presión. El pretratamiento químico y mecánico se pueden llevar a cabo de forma consecutiva o simultánea, como se desee.

40 [0027] Por consiguiente, en una forma de realización preferida, el material que contiene lignocelulosa está sujeto a ambos pretratamientos químico y mecánico para favorecer la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina.

45 [0028] En una forma de realización preferida, un pretratamiento mecánico se realiza antes de un pretratamiento por explosión de vapor.

[0029] En una forma de realización preferida, el pretratamiento se realiza como paso de explosión de vapor de ácido diluido o débil. En otra forma de realización preferida, el pretratamiento se realiza como un paso de explosión de fibra de amoníaco (o paso de pretratamiento AFEX).

50 [0030] Tal y como se usa en la presente invención, el término "pretratamiento biológico" se refiere a cualquier pretratamiento biológico que favorece la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa, y/o lignina del material que contiene lignocelulosa. Las técnicas de pretratamiento biológico pueden implicar la aplicación de microorganismos solubilizantes de lignina de (véase, por ejemplo, Hsu, T.-A., 1996, Pretreatment of biomass, en Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212 ; Ghosh, P., y Singh, A., 1993, Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass, Adv. Appl. Microbiol. 39: 295-333 ; McMillan, J. D., 1994, Pretreating lignocellulosic biomass: a review, en Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, Himmel, M. E., Baker, J. O., y Overend, R. P., eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, DC, capítulo 15 ; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., y Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, en Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207-241 ; Olsson, L., y Hahn-Hagerdal, B., 1996, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production, Enz. Microb. Tech. 18: 312-331 ; y Vallander, L., y Eriksson, K.-E. L., 1990, Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art, Adv. Biochem. Eng./Biotechnol 42: 63-95).

Lavado de material que contiene lignocelulosa pretratado

[0031] Cuando el material que contiene lignocelulosa es pretratado, se producen productos de degradación que son inhibitorios de las enzimas. Estos compuestos disminuyen considerablemente el índice de hidrólisis.

[0032] El lavado del material que contiene lignocelulosa pretratado para eliminar los inhibidores de enzimas mejorará la hidrólisis enzimática.

[0033] Los inhibidores son productos de degradación de lignocelulosa incluyendo productos de degradación de lignina, productos de degradación de celulosa y productos de degradación de hemicelulosa. Los productos de degradación de lignina pueden ser de naturaleza fenólica. Los productos de degradación de hemicelulosa incluyen furanos de azúcares (tales como hexosas y/o pentosas), incluyendo manosa, galactosa, ramnosa, arabinosa y xilosa, incluyendo oligosacáridos. Se cree que los compuestos inhibitorios de las enzimas incluyen xilo-oligosacáridos (XO) o complejos de XO y lignina soluble, presentes en la solución de RMP. Según la presente invención, los compuestos solubles inhibitorios de las enzimas se eliminan del material que contiene lignocelulosa pretratado mediante lavado con una solución de lavado. La solución de lavado es preferiblemente una solución de lavado acuosa. La solución de lavado puede ser una solución de agua sustancialmente pura, o agua con una cantidad considerable de aditivos, por ejemplo, tales como un detergente y/o un solvente orgánico para mejorar la extracción y/o solubilidad de los compuestos inhibitorios de enzimas. Un solvente orgánico adecuado es el etanol o el metanol.

[0034] La solución de lavado se aplica preferiblemente a una temperatura de 5 a 70°C, preferiblemente de 10 a 65°C, y de forma más preferible de 20 a 60°C, por ejemplo, a una temperatura de 30 a 55°C.

[0035] El paso de lavado finaliza cuando la solución de lavado utilizada se separa de los RMP lavados. La separación de la solución de lavado utilizada se puede conseguir mediante cualquier método adecuado, incluyendo pero sin limitarse a drenaje, filtración, centrifugado y presión.

[0036] Según la presente invención, la solución de lavado utilizada se trata para eliminar y/o inactivar un inhibidor enzimático antes de ser reciclada para el paso de lavado. El tratamiento regenera la solución de lavado utilizada para crear una solución de lavado utilizable. El tratamiento comprende poner en contacto la solución de lavado utilizada con una xilanasa y, de forma más preferible, una xilanasa inmovilizada. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que el efecto del proceso de la presente invención lo provoca la actividad de xilanasa en componentes solubles, en particular en xilo-oligosacáridos (XO) o complejos de XO y lignina soluble, presentes en la solución de RMP.

[0037] En una forma de realización, la solución de lavado utilizada también se trata poniéndola en contacto con una resina o con una combinación de resinas. La combinación de resinas se pueden aplicar como una mezcla de dos o más resinas y/o puede consistir en dos o más resinas aplicadas una después de la otra. La resina puede ser una resina con un grupo funcional polar, débilmente polar o no polar. La resina puede ser un intercambiador catiónico fuertemente ácido, un intercambiador catiónico débilmente ácido, un intercambiador aniónico fuertemente básico o un intercambiador aniónico débilmente básico. Los grupos funcionales preferidos incluyen $-\text{SO}_3$, $-\text{COOH}$, $-\text{N}+(\text{CH}_3)_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ y $-\text{NH}_2$. La resina también puede ser una resina de carbón. En una forma de realización, la solución de lavado utilizada se trata por contacto esta con carbón activo.

[0038] En una forma de realización, la solución de lavado utilizada se pasa a través de una columna que comprende la resina y/o carbón activo.

Hidrólisis

[0039] Antes de y/o simultáneamente a la fermentación, el material que contiene lignocelulosa pretratado y lavado se hidroliza para descomponer la celulosa y la hemicelulosa en azúcares y/u oligosacáridos.

[0040] El contenido de sólidos secos durante la hidrólisis puede estar en el rango de 5-50 % en peso, preferiblemente 10-40 % en peso, de forma más preferible 20-35 % en peso. La hidrólisis puede, en una forma de realización preferida, efectuarse como un proceso de flujo continuo donde el material que contiene lignocelulosa pretratado (sustrato) se alimenta gradualmente a una, por ejemplo, solución de hidrólisis que contiene enzimas. El material que contiene lignocelulosa pretratado se puede suministrar a la solución de hidrólisis que contiene enzimas o en uno o en varios lotes diferentes, como uno o varios flujos continuos diferentes o como una combinación de uno o varios lotes diferentes y uno o varios flujos continuos diferentes.

[0041] La hidrólisis se realiza enzimáticamente. Según la invención, el material que contiene lignocelulosa pretratado se puede hidrolizar mediante una o varias hidrolasas (clase EC 3 según la nomenclatura de las enzimas), preferiblemente una o varias carbohidrasas seleccionadas del grupo consistente en celulasa, hemicelulasa, alfa-amilasa, glucoamilasa, esterasa, tal como lipasa, o proteasa. Durante la hidrólisis y/o fermentación pueden estar presentes alfa-amilasa y/o glucoamilasas, ya que el material que contiene lignocelulosa puede incluir algún

almidón.

5 [0042] La(s) enzima(s) usada para la hidrólisis es(son) capaz(ces) de convertir directa o indirectamente el material que contiene lignocelulosa pretratado lavado en azúcares fermentables que se pueden fermentar hasta lograr un producto de fermentación deseado, como por ejemplo etanol.

[0043] En la sección "Enzimas" que aparece más adelante se describen enzimas adecuadas.

10 [0044] Los polímeros de hemicelulosa pueden ser descompuestos por hemicelulasas y/o hidrólisis ácida para liberar sus componentes de azúcar de cinco y seis carbonos. Los azúcares de seis carbonos (hexosas), tales como glucosa, galactosa, arabinosa, y manosa, se pueden fermentar fácilmente hasta obtener, por ejemplo, etanol, acetona, butanol, glicerol, ácido cítrico, ácido fumárico etc. mediante organismos de fermentación adecuados, incluyendo la levadura.

15 [0045] En una forma de realización preferida, el material que contiene lignocelulosa pretratado se hidroliza utilizando una hemicelulasa, preferiblemente una xilanasas, esterasa, celobiasa, o combinación de las mismas.

20 [0046] El tratamiento enzimático se puede llevar a cabo en un entorno acuoso adecuado bajo condiciones que un experto en la técnica puede determinar fácilmente. En una forma de realización preferida, la hidrólisis se realiza en condiciones adecuadas y preferiblemente óptimas para la(s) enzima(s) en cuestión.

25 [0047] El tiempo de procesamiento, la temperatura y las condiciones de pH adecuados las puede determinar fácilmente un experto la técnica. Preferiblemente, hidrólisis se realiza a una temperatura entre 25°C y 70°C, preferiblemente entre 40°C y 60°C, especialmente alrededor de 50°C. El proceso se realiza preferiblemente a un pH en el rango de 3-8, preferiblemente pH 4-6, especialmente alrededor de pH 5. Preferiblemente, la hidrólisis se realiza durante entre 12 y 144 horas, preferible entre 16 y 120 horas, de forma más preferible entre 24 y 96 horas, por ejemplo entre 32 y 72 horas.

30 [0048] Según la invención, la hidrólisis en el paso (c) y la fermentación en el paso (d) se pueden llevar a cabo simultáneamente (proceso SHHF) o consecutivamente (proceso SHF).

Fermentación

35 [0049] Según la invención, el material que contiene lignocelulosa pretratado (e hidrolizado) se fermenta mediante al menos un organismo fermentador capaz de fermentar azúcares fermentables, tales como glucosa, xilosa, manosa, y galactosa directa o indirectamente hasta obtener un producto de fermentación deseado.

40 [0050] La fermentación dura preferiblemente entre 8 y 96 horas, preferiblemente entre 12 y 72, más preferiblemente entre 24 y 48 horas. En una forma de realización, la fermentación se realiza a una temperatura entre 20 y 40°C, preferiblemente entre 26 y 34°C, en particular alrededor de 32°C. En una forma de realización, el pH es de pH 3 a 6, preferiblemente alrededor de pH 4 a 5.

45 [0051] Para la fermentación de etanol se prefiere la levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, preferiblemente cepas que son resistentes hacia niveles altos de etanol, es decir, hasta, por ejemplo, aproximadamente 10, 12 o 15 vol. % de etanol o más, tal como 20 vol. % de etanol.

50 [0052] Según la invención, se contemplan la hidrólisis y fermentación simultáneas (SHF). En una forma de realización, no hay fase de retención separada para la hidrólisis, lo que significa que la(s) enzima(s) hidrolizantes y el organismo fermentador se añaden juntos. Cuando la fermentación se realizada de forma simultánea con la hidrólisis, la temperatura está preferiblemente entre 26°C y 35°C, de forma más preferible entre 30°C y 34°C, por ejemplo alrededor de 32°C. Un programa de temperatura que comprende al menos dos estadios de retención a temperaturas diferentes se pueden aplicar según la invención.

55 [0053] Durante el lavado del material que contiene lignocelulosa pretratado, se pueden acumular azúcares disueltos en la solución de lavado acuoso reciclada. Los azúcares disueltos comprenderán azúcares C5 procedentes de la degradación de la hemicelulosa, como xilosa. Estos azúcares se pueden fermentar con un organismo fermentador adecuado que es capaz de convertir azúcares C5 en un producto de fermentación deseado. Este fermentación de C5 se puede realizar separadamente, o se pueden añadir los azúcares disueltos acumulados en la solución acuosa de lavado reciclada al material que contiene lignocelulosa hidrolizado para una fermentación combinada de C6 y C5. Tal fermentación se lleva a cabo preferiblemente con al menos un organismo capaz de fermentar tanto los azúcares C6 (por ejemplo, glucosa) como los C5 (por ejemplo, xilosa). De forma alternativa, la fermentación se puede realizar con al menos dos organismos separados, cada uno de ellos optimizado para utilizar o los azúcares C6 o los C5, bien en un paso de fermentación bajo condiciones que permiten que ambos organismos fermenten, o bien en al menos dos pasos de fermentación, cada uno bajo condiciones que permiten que uno de los organismos fermenten,

65 [0054] El proceso de la invención se puede realizar como un lote, un lote alimentado o como un proceso continuo.

Preferiblemente, el paso de fermentación se lleva a cabo como fermentación continua.

Recuperación

5 [0055] Después de la fermentación, el producto de fermentación se puede separar del caldo de fermentación. El caldo se puede destilar para extraer el producto de fermentación o se puede extraer el producto de fermentación del caldo de fermentación mediante técnicas de microfiltración o filtración por membrana. De forma alternativa, el producto de fermentación se puede recuperar por desorción. En la técnica se conocen métodos de recuperación.

10 Productos de fermentación

[0056] El proceso de la invención se puede utilizar para producir cualquier producto de fermentación. Los productos de fermentación especialmente contemplados incluyen alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H₂ y CO₂); antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B12, betacaroteno); y hormonas.

15 [0057] Los productos también contemplados incluyen productos de industria de alcohol consumible, por ejemplo, cerveza y vino; productos de la industria lechera, por ejemplo, productos lácteos fermentados; productos de la industria del cuero y productos de la industria del tabaco. En una forma de realización preferida, el producto de fermentación es un alcohol, especialmente etanol. El producto de fermentación, como el etanol, obtenido según la invención, puede preferiblemente ser alcohol/etanol de combustible. No obstante, en el caso del etanol, éste también se puede usar como etanol potable.

25 Organismo fermentador

[0058] El término "organismo fermentador" se refiere a cualquier organismo, incluyendo organismos bacterianos y fúngicos, adecuados para producir un producto de fermentación deseado. Los organismos de fermentación especialmente adecuados según la invención son capaces de fermentar, es decir, convertir, azúcares, tales como glucosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado. También son adecuados los organismos de fermentación capaces de convertir azúcares C5 tales como xilosa en un producto de fermentación deseado. Ejemplos de organismos de fermentación incluyen organismos fúngicos, especialmente levadura. La levadura preferida incluye cepas de especies de *Saccharomyces*, en particular una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* o de *Saccharomyces uvarum*; una cepa de *Pichia*, preferiblemente *Pichia stipitis*, como *Pichia stipitis* CBS 5773; una cepa de *Candida*, en particular una cepa de *Candida utilis*, *Candida diddensii*, o *Candida boidinii*. Otras levaduras contempladas incluyen cepas de *Zymomonas*; *Hansenula*, en particular *H. anomala*; *Klyveromyces*, en particular *K. fragilis*; y *Schizosaccharomyces*, en particular *S. pombe*.

30 [0059] Las levaduras disponibles comercialmente incluyen, por ejemplo, la levadura ETHANOL RED™ (disponible en Fermentis/Lesaffre, EE.UU), FALI (disponible en Fleischmann's Yeast, EE.UU), levadura fresca de SUPERSTART y THERMOSACC™ (disponible en Ethanol Technology, Wisconsin, EE.UU), BIOFERM AFT y XR (disponible en NABC - North American Bioproducts Corporation, Georgia, EE.UU), GERT STRAND (disponible en GERT Strand AB, Suecia), y FERMIOL (disponible en DSM Specialties). ANQI YEAST (disponible en ANQI yeast (CHIFENG) CO., LTD, China).

45 Enzimas

[0060] Aunque no se menciona específicamente en el contexto de un proceso de la invención, se debe entender que las enzimas (así como otros compuestos) se usan en una "cantidad efectiva".

50 [0061] Celulasas: se entiende que el término "celulasas" tal y como se usa en este documento comprende las celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91), por ejemplo, celobiohidrolasa I y celobiohidrolasa I así como las endoglucanasas (EC 3.2.1.4) y betaglucosidasas (EC 3.2.1.21). En el paso de hidrólisis (d) se aplican celulasas.

55 [0062] Para que sea eficaz, la digestión de celulosa y hemicelulosa requiere diferentes tipos de enzimas que actúan cooperativamente. Se necesitan al menos tres categorías de enzimas para convertir celulosa en azúcares fermentables: endoglucanasas (EC 3.2.1.4) que cortan las cadenas de celulosa de forma aleatoria; celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) que disocian unidades de celobiosil de los extremos de la cadena de celulosa y betaglucosidasas (EC 3.2.1.21) que convierten celobiosa y celodextrinas solubles en glucosa. Entre estas tres categorías de enzimas que participan en la biodegradación de celulosa, las celobiohidrolasas son las enzimas clave para la degradación de celulosa cristalina nativa. El término "celobiohidrolasa I" se define aquí como una actividad de celulosa 1,4-beta-celobiosidasa (también denominada exoglucanasa, exocelobiohidrolasa o 1,4-beta-celobiohidrolasa), tal y como se define en la clase enzimática EC 3.2.1.91, que cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en la celulosa y celotetraosa, mediante la liberación de celobiosa desde los extremos no reductores de las cadenas. La definición del término "actividad de celobiohidrolasa II" es idéntica, excepto en que celobiohidrolasa II ataca desde los extremos reductores de las cadenas.

- 5 [0063] Las endoglucanasas (EC nº 3.2.1.4) catalizan la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glicosídicos en la celulosa, derivados de la celulosa (tales como carboximetilcelulosa e hidroxietilcelulosa), liquenina, enlaces beta-1,4 en beta-1,3 glucanos mixtos tales como beta-D-glucanos o xiloglucanos de cereal y otros materiales vegetales que contienen partes celulósicas. El nombre autorizado es endo-1,4- beta-D-glucano 4-glucano hidrolasa, pero en la presente especificación se usa el término abreviado endoglucanasa.
- 10 [0064] La actividad de celulasa puede, en una forma de realización preferida, derivar de una fuente fúngica, tal como una cepa del género *Trichoderma*, preferiblemente una cepa de *Trichoderma reesei*; una cepa del género *Humicola*, tal como una cepa de *Humicola insolens*; o una cepa de *Chrysosporium*, preferiblemente una cepa de *Chrysosporium lucknowense*.
- 15 [0065] En una forma de realización preferida, la preparación con celulasa que comprende un polipéptido con actividad de mejora celulolítica (GH61A), preferiblemente el descrito en WO 2005/074656. La preparación con celulasa puede comprender además una beta-glucosidasa, como la proteína de fusión descrita en la solicitud provisional de EEUU nº 60/832,511. En una forma de realización, la preparación con celulasa también comprende un CBH II, preferiblemente celobiohidrolasa II CEL6A de *Thielavia terrestris*. En una forma de realización, la preparación con celulasa también comprende una preparación con celulasa derivada de *Trichoderma reesei*. En una forma de realización preferida, la preparación con celulasa es la Preparación con celulasa A usada en el ejemplo 1 y descrita en WO 2008/151079.
- 20 [0066] En una forma de realización, la celulasa es el producto disponible comercialmente CELLUCLAST® 1,5L o CELLUZYME™ (Novozymes A/S, Dinamarca).
- 25 [0067] La celulasa se puede dosificar en el rango de 0,1-100 UPF por gramo de materia seca (MS), preferiblemente 0,5-50 UPF por gramo de MS, especialmente 1-20 UPF por gramo de MS.
- 30 [0068] La celulasa se puede dosificar en el rango de 0,1-10000 mg de proteína enzimática (PE)/kg de materia seca (MS), preferiblemente 0,5-5000 mg PE/kg MS, especialmente 1-2500 mg PE/kg MS.
- 35 [0069] Hemicelulasas: la hemicelulosa puede ser rota por las hemicelulasas y/o la hidrólisis ácida para liberar sus componentes de azúcar de cinco y seis carbonos.
- 40 [0070] Cualquier hemicelulasa adecuada para ser usada la hidrolización de hemicelulosa puede ser utilizada. Las hemicelulasas preferidas incluyen xilanasas, arabinofuranosidasas, esterases de xilano de acetilo, esterases de ácido ferúlico, glucuronidasas, endo-galactanasas, manasas, endo o exo arabinasas, endo o exo galactanasas, y mezclas de dos o más de éstas. Preferiblemente, la hemicelulasa para usar en la presente invención es una hemicelulasa de acción exógena, y de forma más preferible, la hemicelulasa es un hemicelulasa de acción exógena que tiene la capacidad de hidrolizar hemicelulosa bajo condiciones ácidas por debajo de pH 7, preferiblemente pH 3-7. Los ejemplos de composiciones de hemicelulasa adecuados para usar en la presente invención incluyen VISCOZYME™ y ULTRAFLO™ (disponibles en Novozymes A/S, Dinamarca).
- 45 [0071] La xilanasas (EC 3.2.1.8) para usar en la presente invención es preferiblemente uan endo-1,4-beta xilanasas, y preferiblemente de la familia Glicósido Hidrolasa 10 o 11 (GH10 o GH11). GH10 o GH11 se definen en Cantarel et al., 2008, Nucleic Acids Res. 37: D233-D238 y en Internet (cazy.org).
- 50 [0072] La xilanasas puede ser de cualquier origen incluyendo mamífero, planta u origen animal; no obstante, se prefiere que la xilanasas sea de origen microbiano. En particular, la xilanasas puede ser una derivable de un hongo filamentoso o de una levadura. Preferiblemente, la xilanasas es derivada de un hongo filamentoso tal como de la especie *Aspergillus*, la especie *Bacillus*, la especie *Humicola*, la especie *Myceliophthora*, la especie *Poitrasia*, la especie *Rhizomucor* o la especie *Trichoderma*. La xilanasas es preferiblemente una xilanasas GH10.
- 55 [0073] La más preferida es una xilanasas derivada de *Aspergillus aculeatus* y descrita como xilanasas II en WO 1994/021785 y como SEC ID N°:1 en este documento. También son preferidas las xilanasas con al menos un 50% de identidad, al menos un 60% de identidad, al menos un 70% de identidad, al menos un 80% de identidad, al menos un 90% de identidad, al menos un 95% de identidad, o incluso al menos un 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°:1 en este documento.
- 60 [0074] La xilanasas aplicada en el proceso de la presente invención para tratar la solución de lavado utilizada es preferiblemente una xilanasas inmovilizada. Si se usa una xilanasas no inmovilizada, se añade en cantidades de 0,001-1,0 g/kg de sustrato de MS, preferiblemente en las cantidades de 0,005-0,5 g/kg de sustrato de MS, y de la forma más preferible de 0,05-0,10 g/kg de sustrato de MS.
- 65 [0075] Una xilanasas también se puede añadir en el paso de hidrólisis de la presente invención en cantidades de 0,001-1,0 g/kg de sustrato de MS, preferiblemente en las cantidades de 0,005-0,5 g/kg de sustrato de MS, y de la

forma más preferible de 0,05-0,10 g/kg de sustrato de MS.

[0076] La esterasa de ácido ferúlico (EC 3.1.1.73) cataliza la hidrólisis del grupo 4-hidroxi-3- metoxicinamoil (feruloil) de un azúcar esterificado, que es normalmente arabinosa en arabinoxilano. Una esterasa de ácido ferúlico adecuada se puede obtener de una cepa de un hongo filamentoso (por ejemplo, *Trichoderma*, *Meripilus*, *Humicola*, *Aspergillus*, *Fusarium*) o de una bacteria (por ejemplo, *Bacillus*), como por ejemplo de *Aspergillus niger*, por ejemplo, la esterasa de ácido ferúlico FAEIII descrita por Faulds et al. 1994, *Microbiology*, 140, págs. 779-787.

[0077] La arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) cataliza la hidrólisis de residuos terminales no reductores de alfa-L-arabinofuranosida.

[0078] La galactanasa (EC 3.2.1.89), arabinogalactano endo-1,4-beta-galactosidasa, cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4-D-galactosídicos en arabinogalactanos.

[0079] La pectinasa (EC 3.2.1.15) cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-alfa-D-galactosidurónicos en el pectato y otros galacturonanos.

[0080] La xiloglucanasa cataliza la hidrólisis del xiloglucano.

[0081] La hemicelulasa se puede añadir en una cantidad eficaz para hidrolizar la hemicelulosa, por ejemplo, en cantidades de aproximadamente 0,001 a 0,5 % en peso de materia seca (MS), de forma más preferible de aproximadamente 0,05 a 0,5 % en peso de MS.

Materiales y métodos

Enzimas:

[0082] Una composición de xilanasa que comprende la xilanasa mostrada en la SEC ID N°:1.

[0083] Preparación con celulasa A que comprende enzimas celulolíticas derivadas de *Trichoderma reesei*, un polipéptido con actividad de aumento celulolítico (GH61A) descrito en WO 2005/074656, y una beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (en la proteína de fusión descrita en WO 2008/057637). La preparación con celulasa A se describe en WO 2008/151079.

Determinación de identidad

[0084] La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad".

[0085] El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar mediante el método Clustal (Higgins, 1989, *CABIOS* 5: 151-153) utilizando el software de LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiple: penalización por gap de 10 y penalización por longitud del gap de 10. Los parámetros de alineamiento por pares son Ktuple=1, gap penalty=3, windows=5, y diagonals=5.

[0086] El grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar mediante el método Wilbur-Lipman (Wilbur y Lipman, 1983, *Proceedings of the National Academy of Science*, EE.UU 80: 726-730) utilizando el Software de LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiple: penalización por gap de 10 y penalización por longitud del gap de 10. Los parámetros de alineamiento por pares son Ktuple=3, gap penalty=3, y windows=20.

Ejemplos

Ejemplo 1

[0087] Se pretrataron rastrojos de maíz utilizando explosión de vapor a 195°C durante 5,4 min. Los rastrojos de maíz pretratados (RMP) 250 g con un contenido en materia seca (MS) de 53,10% se mezclaron con 1L de solución acuosa de lavado (proporción de agua a RMP de 4:1) y se incubaron con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución de lavado consumida por los RMP fue colada a través de 8 capas de estameña y filtrada a través de 32 capas de estameña. Los RMP lavados fueron recogidos y se obtuvieron aproximadamente 880 g de solución de lavado usada. La solución de lavado usada se trató con 8,8 ml de xilanasa (176 mg de proteína enzimática, a 50°C durante 90 minutos, seguidos de 90°C durante 30 minutos para la inactivación de enzima. La solución de lavado utilizada de 880 g se mezcló con 220 g de RMP sin lavar y se incubó con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución de lavado usada de los RMP fue colada a través de 8 capas de estameña y filtrada a través de 32 capas de estameña. Los RMP lavados se recogieron y se obtuvieron aproximadamente 770 g de solución de lavado utilizada. La solución de lavado utilizada fue tratada con 7,7 ml de

xilanasa (154 mg de proteína enzimática, a 50°C durante 90 minutos, seguidos de 90°C durante 30 minutos para la inactivación de la enzima. La solución de lavado utilizada de 770 g fue mezclada con 192,5 g de RMP sin lavar e incubada con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución de lavado usada con los RMP fue colada a través de 8 capas de estameña y filtrada a través de 32 capas de estameña. Los RMP lavados se recogieron. Se obtuvieron tres lotes de RMP lavados. Los RMP lavados fueron repartidos en muestras de MS inicial de 6% y un peso de 20 g. Se añadió penicilina para controlar la contaminación bacteriana. Se añadió la composición de celulasa A en una concentración de 6 mg PE/g de celulosa y la hidrólisis fue realizada durante 72 horas a 50°C y pH 5,0.

[0088] Para el control, los RMP sin lavar fueron lavados según el procedimiento anteriormente indicado excepto por el hecho de que la solución de xilanasa fue sustituida por agua. Se obtuvieron tres lotes de RMP lavados.

[0089] Tras la hidrólisis siguiente, los azúcares C6 solubles se cuantificaron mediante HPLC. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Conversión equivalente de glucosa (%) de los RMP lavados determinada por HPLC		
Ciclo nº	Control	Tratados con xilanasa
I	59,87	59,24
II	50,61	58,32
III	45,39	53,37

[0090] Se llevó a cabo la inactivación de la xilanasa mediante la incubación durante 30 minutos a 90°C en este ejemplo sólo para demostrar que el efecto de la xilanasa fue la actividad debida hacia un sustrato soluble en la solución de lavado, y no actividad hacia el sustrato sólido de los RMP.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0091]

<110> Novozymes A/S
Novozymes North America, Inc.

<120> Proceso de hidrólisis de biomasa

<130> 11580-WO-PCT

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 406

<212> PRT

<213> Aspergillus aculeatus

<400> 1

ES 2 552 466 T3

Met Val Gly Leu Leu Ser Ile Thr Ala Ala Leu Ala Ala Thr Val Leu
1 5 10 15

Pro Asn Ile Val Ser Ala Val Gly Leu Asp Gln Ala Ala Val Ala Lys
20 25 30

Gly Leu Gln Tyr Phe Gly Thr Ala Thr Asp Asn Pro Glu Leu Thr Asp
35 40 45

Ile Pro Tyr Val Thr Gln Leu Asn Asn Thr Ala Asp Phe Gly Gln Ile
50 55 60

Thr Pro Gly Asn Ser Met Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Gly
65 70 75 80

Thr Phe Thr Phe Thr Lys Gly Asp Val Ile Ala Asp Leu Ala Glu Gly
85 90 95

Asn Gly Gln Tyr Leu Arg Cys His Thr Leu Val Trp Tyr Asn Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Trp Val Thr Ser Gly Thr Trp Thr Asn Ala Thr Leu Thr Ala
115 120 125

Ala Leu Lys Asn His Ile Thr Asn Val Val Ser His Tyr Lys Gly Lys
130 135 140

Cys Leu His Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Leu Asn Asp Asp Gly Thr
145 150 155 160

Tyr Arg Thr Asn Ile Phe Tyr Thr Thr Ile Gly Glu Ala Tyr Ile Pro
165 170 175

Ile Ala Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ala Asp Pro Asp Ala Lys Leu Phe

	180						185					190			
Tyr	Asn	Asp	Tyr	Asn	Leu	Glu	Tyr	Gly	Gly	Ala	Lys	Ala	Ala	Ser	Ala
		195					200					205			
Arg	Ala	Ile	Val	Gln	Leu	Val	Lys	Asn	Ala	Gly	Ala	Lys	Ile	Asp	Gly
	210					215						220			
Val	Gly	Leu	Gln	Ala	His	Phe	Ser	Val	Gly	Thr	Val	Pro	Ser	Thr	Ser
	225				230					235					240
Ser	Leu	Val	Ser	Val	Leu	Gln	Ser	Phe	Thr	Ala	Leu	Gly	Val	Glu	Val
				245					250					255	
Ala	Tyr	Thr	Glu	Ala	Asp	Val	Arg	Ile	Leu	Leu	Pro	Thr	Thr	Ala	Thr
			260					265						270	
Thr	Leu	Ala	Gln	Gln	Ser	Ser	Asp	Phe	Gln	Ala	Leu	Val	Gln	Ser	Cys
		275					280					285			
Val	Gln	Thr	Thr	Gly	Cys	Val	Gly	Phe	Thr	Ile	Trp	Asp	Trp	Thr	Asp
	290					295					300				
Lys	Tyr	Ser	Trp	Val	Pro	Ser	Thr	Phe	Ser	Gly	Tyr	Gly	Ala	Ala	Leu
	305				310					315					320
Pro	Trp	Asp	Glu	Asn	Leu	Val	Lys	Lys	Pro	Ala	Tyr	Asn	Gly	Leu	Leu
				325					330					335	
Ala	Gly	Met	Gly	Val	Thr	Val	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Ala
			340					345						350	
Thr	Ala	Thr	Gly	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Gly	Ala	Thr	Ser	Thr
		355					360					365			
Gly	Thr	Thr	Ala	Ala	His	Trp	Gly	Gln	Cys	Gly	Gly	Leu	Asn	Trp	Ser
	370					375					380				
Gly	Pro	Thr	Ala	Cys	Ala	Thr	Gly	Tyr	Thr	Cys	Thr	Tyr	Val	Asn	Asp
	385				390					395					400
Tyr	Tyr	Ser	Gln	Cys	Leu										
				405											

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proceso para convertir un material que contiene lignocelulosa en un hidrolizado que comprende las etapas de:
- a) someter un material que contiene lignocelulosa a un pretratamiento,
 - b) lavar el material que contiene lignocelulosa pretratado en una solución de lavado,
 - c) separar la solución de lavado utilizada para obtener un material que contiene lignocelulosa pretratado y lavado,
 - 10 d) someter el material que contiene lignocelulosa pretratado y lavado a un tratamiento que da como resultado al menos la hidrólisis parcial de la celulosa y/o hemicelulosa para obtener un hidrolizado, y
 - e) tratar la solución de lavado utilizada del paso (c) con una xilanasas antes de que sea reciclada para el paso (b).
- 15 2. Proceso según la reivindicación 1, que comprende además poner en contacto el hidrolizado del paso (d) con un organismo fermentador para producir un producto de fermentación.
3. Proceso según la reivindicación 2, que comprende hidrólisis y fermentación simultáneas.
- 20 4. Proceso según la reivindicación 2 o 3, que comprende además la recuperación del producto de fermentación.
5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la xilanasas es una xilanasas GH10.
6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la xilanasas es inmovilizada.
- 25 7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el material que contiene lignocelulosa se origina a partir de materiales seleccionados del grupo que comprende: rastrojos de maíz, fibra de maíz, madera dura, tal como álamo y abedul, madera blanda, paja de cereal, tal como paja de trigo, pasto varilla, paja de arroz, residuos sólidos urbanos, residuos orgánicos industriales, papel de oficina, o mezclas derivadas.
- 30 8. Proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el material que contiene lignocelulosa del paso (a) se trata químicamente y/o mecánicamente.
9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el material que contiene lignocelulosa del paso (a) se pretrata químicamente con ácido.
- 35 10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el pretratamiento del paso (a) se pretrata con ácido y se realiza mediante un ácido orgánico, preferiblemente ácido sulfúrico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, y/o mezclas de éstos.
- 40 11. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el material que contiene lignocelulosa del paso (a) se pretrata con ácido de 0,1 a 2,0 % en peso, preferiblemente ácido sulfúrico.
- 45 12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el material que contiene lignocelulosa del paso (a) se pretrata mecánicamente a alta temperatura y/o a alta presión.
13. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el material que contiene lignocelulosa del paso (a) se pretrata por explosión de vapor, explosión de vapor con ácido diluido y/u oxidación húmeda.
- 50 14. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la solución de lavado del paso (b) comprende agua, solvente orgánico o una mezcla de agua y un solvente orgánico.
- 55 15. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los azúcares disueltos que se acumulan en la solución de lavado acuosa reciclada (i) se llevan al paso de fermentación (d) y se fermentan con un organismo fermentador C5, o (ii) se separan y se fermentan con un organismo fermentador C5.