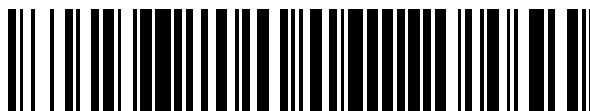


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 177**

51 Int. Cl.:

**C12P 39/00** (2006.01)

**C12P 7/24** (2006.01)

**C12P 7/06** (2006.01)

**C12M 1/00** (2006.01)

**C12N 1/22** (2006.01)

**C12P 7/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2010 E 10817728 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2478111**

54 Título: **Sacarificación y fermentación simultáneas compartimentalizadas de biomasa**

30 Prioridad:

**15.09.2009 US 242493 P**

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

**10.02.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DINER, BRUCE, A.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 559 177 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

Sacarificación y fermentación simultáneas compartimentalizadas de biomasa

**Campo de la invención**

5 Esta descripción se refiere al campo de la sacarificación de biomasa y la fermentación de los azúcares producidos. De modo específico, se describen métodos y aparatos para la sacarificación y la fermentación simultáneas de biomasa que proporcionan la compartimentalización del proceso de sacarificación y el proceso de fermentación que resulta en una disminución de la inhibición enzimática por el producto final.

**Antecedentes de la invención**

10 Las materias primas y los residuos de biomasa (celulósica y lignocelulósica), tales como residuos agrícolas, madera, residuos forestales, lodos procedentes de la fabricación de papel, y residuos sólidos municipales e industriales, proporcionan una materia prima renovable potencialmente grande para la producción de productos químicos, plásticos, combustibles y piensos. Las materias primas y los residuos celulósicos y lignocelulósicos, compuestos de polímeros de carbohidratos que comprenden celulosa, hemicelulosa y pectinas, en general se tratan por medio de una diversidad de medios químicos, mecánicos y enzimáticos (sacarificación enzimática) para liberar principalmente los azúcares hexosa y pentosa, que después pueden ser convertidos por microorganismos en productos útiles.

15 La sacarificación enzimática de biomasa provoca la acumulación de celobiosa y glucosa en el recipiente de sacarificación, produciendo la inhibición por el producto final de las exocelulasas, lo cual frena la velocidad de la hidrólisis de la celulosa. También se produce xilobiosa, que provoca una inhibición retroalimentada de las xilanasas, lo cual frena la velocidad de la hidrólisis de la hemicelulosa. La reducción de la velocidad de la hidrólisis de glucanos y xilanos puede mitigarse parcialmente mediante la adición de concentraciones mayores de enzima, aunque esta solución aumenta el coste del proceso.

20 Los métodos previos enfocados a la inhibición por los productos finales durante la sacarificación enzimática incluyen el uso de una sacarificación y fermentación simultáneas (SSF; Takagi, M., et al., en: Process Bioconversion Symposium, 551-571, 1977), en el que se combinan las dos etapas de sacarificación y fermentación.

25 La combinación de las dos etapas del proceso en la SSF durante la producción de biocombustibles tiene un menor coste monetario, y la presencia del producto de biocombustible disminuye en riesgo de contaminación de la fermentación (Wyman, C. E., et al., Biomass Bioenergy, 3:301-307,1992). Además, en este método, la glucosa formada es consumida por el microorganismo fermentador, lo cual mitiga la inhibición por el producto final de las enzimas  $\beta$ -glucosidasa y celobiohidrolasa. Por tanto, la formación de celobiosa a partir de celulosa, así como su hidrólisis para producir glucosa, se acelera, con lo cual se aumenta la velocidad de conversión de celulosa a glucosa. Otra estrategia para mitigar la inhibición de la glucosa por el producto final se describe en el documento WO 2006/101832, en el que la conversión reversible de glucosa a fructosa y xilosa a xilulosa mitiga parcialmente la inhibición por el producto final.

30 Klei et al. (Biotechnol. Bioeng. Symp. (1981), 11 Symp. Biotechnol. Energy Prod. Conserve., 3<sup>a</sup>, 593-601) analizan el uso de  $\beta$ -glucosidasa inmovilizada procedente de *Aspergillus phoenicis* en cartuchos de membranas de ultrafiltración de fibras huecas, empleados como reactores de enzimas, con lo que se produce la hidrólisis de la celobiosa. Este sistema también se ha empleado para la circulación de celulasas de *Trichoderma reesei* durante la sacarificación de la celulosa. La aplicación de membranas de fibras huecas permite el procesamiento continuo de la celulosa y reduce significativamente los requisitos de celulasa.

40 En el documento US 4.220.721 se realiza la sacarificación y la fermentación simultáneas mediante las enzimas endoglucanasa y celobiohidrolasa reutilizables adsorbidas sobre un soporte sólido.

45 El documento US 5.508.183 describe un aparato y un método para la sacarificación y la fermentación simultáneas compartimentalizadas de material celulósico desmenuzado empleando celulasas en un recipiente de sacarificación y haciendo circular los productos de la hidrólisis a través de membranas semipermeables en circuitos de filtro. El filtrado entra después en un reactor que comprende celobiosa inmovilizada para convertir la celobiosa en glucosa. Por último, la glucosa se fermenta para producir etanol.

50 El documento CN101173306 describe la hidrólisis enzimática y una fermentación continua combinadas para la fabricación de acetona y butanol a partir de paja sometida a explosión por vapor en un reactor de membranas de fibras huecas. Se indica que la enzima celulasa empleada para la hidrólisis enzimática de la paja puede reciclarse utilizando el reactor de membrana para lograr una alta eficacia y un bajo coste.

Los métodos descritos anteriormente han mejorado parcialmente el proceso de sacarificación y han mitigado mínimamente la inhibición por el producto final durante la sacarificación.

A pesar de los métodos descritos en la técnica, son necesarios métodos más eficaces para solucionar el problema de la inhibición por el producto final de la sacarificación enzimática durante la sacarificación y la fermentación simultáneas.

**Sumario de la descripción**

5 La presente descripción resuelve el problema mencionado anteriormente proporcionando métodos y aparatos para la sacarificación y la fermentación simultáneas compartimentalizadas de biomasa pretratada utilizando un circuito de circulación de fibras huecas en el que ciertas enzimas hidrolizantes de oligosacáridos son secuestradas. Los métodos y el aparato proporcionan la retirada de los componentes de la biomasa que pueden provocar la inhibición retroalimentada de las enzimas de la sacarificación durante la sacarificación de la biomasa pretratada para mejorar la liberación de los azúcares fermentables durante la sacarificación y aumentar los rendimientos de los productos diana en virtud de una mayor eficacia de la sacarificación.

10 Un aspecto de la invención se dirige a un aparato para procesar biomasa pretrata, que comprende: un recipiente de sacarificación y un recipiente de fermentación separado, en los que dichos recipientes están conectados por dos circuitos de circulación externos y un circuito de circulación de fibras hueca que conecta los dos circuitos de circulación externos y que comprende membranas semipermeables, en el que dicho aparato proporciona la sacarificación y la fermentación simultáneas compartimentalizadas de la biomasa pretratada.

15 En otro aspecto, se proporciona un aparato según la figura 2, en el que dicho aparato comprende un recipiente de sacarificación (1) que está conectado con un primer circuito de circulación externo (2) y en el que dicho primer circuito de circulación externo (2) es externo a y está conectado con una primera membrana semipermeable (10) de un circuito de circulación de fibras huecas (3); y dicho circuito de circulación de fibras huecas (3) está conectado con un segundo circuito de circulación externo (4) que es externo a y está conectado con una segunda membrana semipermeable (11) del circuito de circulación de fibras huecas (3); y dicho segundo circuito de circulación externo (4) está conectado con un recipiente de fermentación (5) con una salida para un producto diana (6). Este aparato puede comprender también una serie de bombas de circulación, que incluyen una primera bomba de circulación (7) para el primer circuito de circulación externo (2); una segunda bomba de circulación (8) para el segundo circuito de circulación externo (4); una tercera bomba de circulación (9) para el circuito de circulación de fibras huecas (3).

En otro aspecto, se proporciona un método para procesar una biomasa pretratada, comprendiendo dicho método:

- (a) proporcionar el aparato de la invención según se describe en la figura 2;
- (b) proporcionar una mezcla de biomasa a granel pretratada y un consorcio de enzimas de sacarificación al recipiente de sacarificación (1) de dicho aparato, en el que dicha mezcla produce, mediante sacarificación, componentes de peso molecular alto y bajo;
- (c) proporcionar al menos una enzima secuestrada en el circuito de circulación de fibras huecas (3);
- (d) transportar una cantidad de la mezcla de (b) a través del primer circuito de circulación a través de una primera membrana semipermeable de fibras huecas (10), por lo cual dichos componentes de peso molecular alto de la mezcla de (b) no difunden a través de dicha membrana, y dichos componentes de peso molecular bajo de la mezcla difunden a través de dicha membrana hacia el circuito de circulación de fibras huecas (3);
- (e) hidrolizar los componentes de peso molecular bajo que difunden hacia el circuito de circulación de fibras huecas (3) en (d) mediante dicha al menos una enzima secuestrada en dicho circuito de circulación de fibras huecas, por lo cual se forma un hidrolizado que comprende azúcares fermentables; y
- (f) transportar el hidrolizado que comprende azúcares fermentables a través de una segunda membrana semipermeable (11) hacia un segundo circuito de circulación (4) y hacia un recipiente de fermentación (5);

en el que los componentes de la biomasa pretratada se hacen circular a través del aparato por medio de bombas de circulación. En otro aspecto, los azúcares fermentables de (e) transportados al recipiente de fermentación de (f) son convertidos por al menos un microorganismo en al menos un producto diana.

45 En otro aspecto del método anterior, la presencia de la primera y la segunda membrana semipermeable evita la pérdida de una o más de las enzimas secuestradas evitando su difusión hacia dichos recipientes de sacarificación y fermentación.

En otro aspecto del método anterior, el hidrolizado formado por la acción de dicha enzima secuestrada sobre la biomasa se transporta a dicho recipiente de fermentación para mitigar la inhibición retroalimentada por el producto final en el recipiente de sacarificación.

En otro aspecto del método anterior, la permeabilidad de peso molecular de dicha primera y segunda membrana semipermeable es de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 kilodaltons.

### Breve descripción de las figuras

- Figuras 1A y 1B: La figura 1A muestra el desarrollo en el tiempo de la sacarificación desde 0-120 h, expresada como el porcentaje de rendimiento teórico de la glucosa monomérica procedente de bagazo de caña de azúcar pretratado con ácido/base a diferentes proporciones de enzimas de sacarificación. La sacarificación se realizó en presencia de Na-citrato 50 mM, pH 4,6, Tween 20 al 1% (en p/v) y  $\text{NaN}_3$  al 0,01% (en p/v), con una carga de sólidos del 11%. Las proporciones de enzima (mg de proteína/g de celulosa) fueron: 4:3:8, 8:3:4, 6:3:6, 6:6:12, 12:6:1,2 y 12:6:12 para la celulasa Spezyme® CP, la xilanasa Multifect®, y las enzimas Novozyme 188, respectivamente. La figura 1B muestra una comparación de los rendimientos de glucosa monomérica a 120 h de la figura 1A para las diferentes proporciones de enzima.
- Figura 2: Es una representación esquemática de un aparato de sacarificación y fermentación simultáneas compartimentalizadas, en la que los recipientes de sacarificación y fermentación separados están acoplados mediante dos circuitos de circulación externos y un circuito de circulación de fibras huecas.

### Descripción detallada de la invención

- A menos que se indique lo contrario, todos los porcentajes, partes, proporciones, etc., están en peso. Las marcas comerciales se muestran en mayúscula. Además, cuando una cantidad, una concentración u otro valor o parámetro se indican como un intervalo, un intervalo preferido o una lista de valores superiores preferidos y valores inferiores preferidos, debe entenderse que se están describiendo específicamente todos los intervalos formados a partir de cualquier par de cualquier límite superior de intervalo o valor preferido y cualquier límite inferior de intervalo o valor preferido, independientemente de que se indiquen intervalos por separado. Cuando en la presente se indica un intervalo de valores numéricos, a menos que se indique lo contrario, se pretende que el intervalo incluya sus límites, y todos los números enteros y fracciones dentro del intervalo. No se pretende limitar el alcance de la invención a los valores específicos indicados cuando se define un intervalo.

- Los presentes métodos y aparatos proporcionan la mitigación de la inhibición por el producto final de la sacarificación enzimática durante una sacarificación y fermentación simultáneas compartimentalizadas (CSSF) empleando membranas semipermeables de fibras huecas y un circuito de circulación de fibras huecas para conectar los recipientes de sacarificación y fermentación separados.

#### Definiciones

- Para aumentar la claridad, los términos y las expresiones utilizados en la presente deben entenderse según se describen en la presente o tal como entenderían dichos términos o expresiones los expertos en la técnica de la invención. A continuación se proporcionan más explicaciones de ciertos términos y expresiones utilizados en la presente:

“Glucosa” es un monosacárido que contiene seis átomos de carbono con la fórmula química  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  con un grupo funcional aldehído (hemiacetal) en C1.

- “Glucano” se refiere a un polisacárido de monómeros de D-glucosa  $\beta$ -1,4-alineados conectados por enlaces glicosídicos.

“Arabinosa” es un monosacárido que contiene cinco átomos de carbono, que incluye un grupo funcional aldehído.

“Xilosa” es un monosacárido que contiene cinco átomos de carbono con la fórmula química  $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$  con un grupo funcional aldehído (hemiacetal) en C1.

- “Celobiosa” es un disacárido derivado de la condensación de dos moléculas de glucosa conectadas mediante un enlace glicosídico  $\beta$  (1,4).

“Celobiohidrolasa” se refiere a enzimas que rompen las unidades de celobiosa de la celulosa en los extremos reductores y no reductores.

“Xilobiosa” es un disacárido de monómeros de xilosa con un enlace glicosídico  $\beta$ -1,4 entre ellos.

- “ $\beta$ -xilosidasa” se refiere a un grupo de enzimas que rompen los oligómeros que contienen xilosa conectados mediante enlaces  $\beta$ -glicosídicos (por ejemplo, xilobiosa).

“ $\beta$ -xilobiosidasa” es una enzima que hidroliza la xilobiosa a xilosa.

“Xilano” se refiere a un polisacárido lineal formado principalmente por unidades de D-xilosa  $\beta$ -1,4-enlazadas, que puede contener ramificaciones con otros azúcares, tales como L-arabinosa y D-xilosa.

- “Xilanasa” se refiere a una enzima que degrada el poli- y oligosacárido lineal  $\beta$ -1,4-xilano para producir xilosa y oligómeros de xilosa. Algunas xilanasas actúan sobre los oligómeros de cadena ramificada de xilosa.

- “ $\beta$ -glucosidasa” es una enzima que actúa sobre los enlaces  $\beta 1 \rightarrow 4$  que conectan dos moléculas de glucosa o sustituidas con glucosa (es decir, el disacárido celobiosa). Cataliza la hidrólisis de los restos no reductores terminales en  $\beta$ -D-glucósidos, con la liberación de glucosa.
- 5 “Arabinofuronosidasa” se refiere a una enzima que hidroliza los restos  $\alpha$ -L-arabinofuranósido no reductores terminales en los xilanos que contienen arabinosa.
- “Exocelulasas” se refiere a enzimas que liberan celobiosa desde los extremos reductores y no reductores de la celulosa.
- “Oligómeros de xilosa de cadena ramificada” se refiere a un esqueleto de oligoxilosa sobre el cual se localizan ramificaciones de arabinosa y xilosa.
- 10 “Enzimas hidrolizantes de oligómeros de xilosa de cadena ramificada” se refiere a las xilanasas que hidrolizan los oligómeros de xilosa de cadena ramificada.
- 15 “Membrana semipermeable” y “filtro de membrana semipermeable” se emplean de modo intercambiable en la presente y se refieren a una membrana que actúa como barrera física que solo permite el paso de materiales de hasta cierto tamaño, forma o carácter. Los ejemplos de membranas semipermeables útiles en este método incluyen membranas fabricadas con uno o más de polisulfona, polisulfona hidroxilada, poliéter sulfona, poliéter sulfona hidroxilada, polisulfona sulfonada, poliéter cetona, poliéter éter cetona, poliimida y poliéter imida, etc.
- “Membrana semipermeable de fibras huecas” y “filtro de membrana semipermeable de fibras huecas” son un tipo de membrana semipermeable fabricadas con fibras que son huecas y semipermeables. En una membrana semipermeable de fibras huecas existe una gran proporción de superficie a volumen.
- 20 “Primera membrana semipermeable” se refiere a la membrana semipermeable de fibras huecas que permite el paso de ciertos componentes que resultan de la sacarificación de la biomasa desde el recipiente de sacarificación al circuito de circulación de fibras huecas.
- 25 “Segunda membrana semipermeable” se refiere a la membrana semipermeable de fibras huecas que permite el paso de los azúcares producidos por las enzimas secuestradas en el circuito de circulación de fibras huecas hacia el segundo circuito de circulación externo. Tanto la primera como la segunda membrana semipermeable de fibras huecas están fabricadas con materiales similares, tales como los indicados anteriormente.
- “Retirada selectiva del producto diana” o “producto diana retirado selectivamente” significa retirar el producto diana sin retirar ningún otro componente dentro del recipiente de fermentación.
- 30 “Sacarificación y fermentación simultáneas compartimentalizadas (CSSF)”, en este contexto, se refiere a un proceso en el que la fermentación de uno o más azúcares y la sacarificación de la biomasa pretratada se producen simultáneamente en recipientes separados acoplados a través de al menos un circuito de circulación.
- “Fermentación” significa convertir unos sustratos químicos (a través de procesos aerobios o anaerobios) en productos diana empleando microorganismos.
- 35 “Recipiente de fermentación” significa cualquier recipiente adecuado para su uso en la presente, de modo que el recipiente es adecuado para la fermentación de sustratos para producir productos diana por medio de microorganismos.
- “Hidrolizado” se refiere al producto resultante de la sacarificación de biomasa. Los productos de la sacarificación en el hidrolizado variarán según la hidrólisis realizada por diferentes enzimas sacarificantes y durante diferentes periodos de tiempo. Una sacarificación eficaz produce un hidrolizado que contiene azúcares fermentables.
- 40 “Azúcares fermentables” se refiere a un contenido en azúcares que principalmente comprende monosacáridos (algunos disacáridos aún pueden estar presentes) que pueden ser utilizados como fuente de carbono por un microorganismo en un proceso de fermentación para producir uno o más productos diana.
- “Bomba de circulación” se refiere a una bomba que hace que las suspensiones líquidas en los diversos circuitos de circulación circulen y se muevan a través de un aparato.
- 45 “Producto diana” se refiere a un producto químico, un combustible o un componente básico de un producto químico producido mediante fermentación. “Producto” se emplea en un sentido amplio e incluye moléculas, tales como proteínas, que incluyen, por ejemplo, péptidos, enzimas y anticuerpos. Dentro de esta definición de producto diana también se contempla el etanol y el butanol.
- 50 “Biomasa” se refiere a cualquier material lignocelulósico, que incluye un material celulósico o hemicelulósico, por ejemplo, cultivos bioenergéticos, residuos agrícolas, residuos sólidos municipales, residuos sólidos industriales, residuos de jardines, madera, residuos forestales y sus combinaciones, tal como se describe con más detalle a continuación. Esta biomasa tiene un contenido en carbohidratos que comprende polisacáridos y oligosacáridos, y

también puede comprender otros componentes, tales como lignina, proteínas y lípidos. “Biomasa pretratada” es una biomasa que ha sido tratada por cualquier medio que facilite la sacarificación enzimática.

5 “Sacarificación” o “sacarificación enzimática” se refiere a la producción de azúcares fermentables a partir de polisacáridos mediante la acción de enzimas hidrolíticas. La producción de azúcares fermentables a partir de biomasa pretratada se produce a través de la sacarificación enzimática por enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas.

“Recipiente de sacarificación” significa cualquier recipiente adecuado para su uso en la presente para la sacarificación de biomasa. El recipiente de sacarificación puede comprender una biomasa pretratada en la que se produce la sacarificación enzimática.

10 “Consortio de enzimas” o “consorcio de enzimas de sacarificación” es una colección de enzimas hidrolíticas. Estas enzimas generalmente son segregadas por un microorganismo. El consorcio de enzimas de sacarificación generalmente contendrá una o más celulasas, xilanasas, glicosidasas y esteratasas. En la presente invención, no es necesario que el consorcio de enzimas de sacarificación añadido al recipiente de sacarificación contenga  $\beta$ -xilosidasa,  $\beta$ -glucosidasa ni arabinofuranosidasas, puesto que estas están incluidas en el circuito de circulación de fibras huecas.

15 “Enzimas secuestradas”, tal como se emplea en la presente, se refiere a unas enzimas, tales como  $\beta$ -xilosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y arabinofuranosidasas y xilanasas, que están secuestradas dentro del circuito de circulación de fibras huecas y que son capaces de hidrolizar oligómeros de glucosa y oligómeros de xilosa de cadena lineal y de cadena ramificada de la biomasa.

20 “Inhibición retroalimentada por el producto final” se refiere a una situación en la que la acumulación del producto de una reacción enzimática inhibe la reacción que conduce a su formación. En esta descripción, por ejemplo, las exocelulasas son inhibidas en retroalimentación por la celobiosa y, hasta cierto punto, por la glucosa, y las xilanasas son inhibidas en retroalimentación por la xilobiosa y, hasta cierto punto, por la xilosa. La  $\beta$ -glucosidasa es inhibida en retroalimentación por su producto, la glucosa. La  $\beta$ -xilobiosidasa es inhibida por su producto, la xilosa.

25 “Circuito de circulación” se refiere a un circuito de circulación de líquidos que hace circular el contenido del recipiente de sacarificación o de fermentación a lo largo de las superficies externas de la primera o la segunda membrana semipermeable adyacente al circuito de circulación de fibras huecas, respectivamente.

“Primer circuito de circulación externo” es un circuito de circulación de fluidos que hace pasar a la biomasa y al consorcio de enzimas de sacarificación desde el recipiente de sacarificación a lo largo de la superficie externa de la primera membrana semipermeable del circuito de circulación de fibras huecas.

30 “Segundo circuito de circulación externo” es un circuito de circulación de fluidos que hace pasar al contenido del recipiente de fermentación a lo largo de la superficie externa de la segunda membrana semipermeable del circuito de circulación de fibras huecas, extrayendo la glucosa, la xilosa y la arabinosa que difunden a través de la membrana y transportándolas al recipiente de fermentación.

35 “Circuito de circulación de fibras huecas” se refiere a un circuito de circulación de fluidos que contiene el primero y el segundo filtro de membrana semipermeable y dichas una o más enzimas secuestradas, en el que se produce la hidrólisis enzimática y los productos se transportan entre los recipientes de sacarificación y de fermentación a través del primer y segundo circuito de circulación externo, a través de la primera y la segunda membrana semipermeable.

40 “Transporte selectivo de ciertos componentes” se refiere al transporte de ciertos componentes de tamaño (por ejemplo, oligosacáridos, tales como celobiosa, xilobiosa y oligómeros de xilosa de cadena ramificada) de la biomasa sacarificada desde el recipiente de sacarificación a través del primer filtro de membrana semipermeable hacia el circuito de circulación de fibras huecas y a través del segundo filtro de membrana semipermeable hacia el recipiente de fermentación.

“Componentes de peso molecular alto” se refiere a los componentes de la biomasa con un peso molecular mayor que 30 kD que no pueden difundir a través del filtro de membrana semipermeable del circuito de fibras huecas.

45 “Componentes de peso molecular bajo” se refiere a los componentes de la biomasa con un peso molecular menor que 30 kD que pueden difundir a través del filtro de membrana semipermeable del circuito de fibras huecas.

#### Biomasa

50 La biomasa adecuada para el método descrito en la presente incluye, pero no se limita a cultivos bioenergéticos, residuos agrícolas, residuos sólidos municipales, residuos sólidos industriales, lodos procedentes de la fabricación de papel, residuos de jardines, madera y residuos forestales. Los ejemplos de biomasa incluyen, pero no se limitan a mazorcas de maíz, residuos de cultivos, tales como hojas de maíz, tallos de maíz, hierbas, trigo, paja de trigo, cebada, paja de cebada, heno, paja de arroz, *Panicum virgatum*, residuos de papel, bagazo de caña de azúcar, sorgo, soja, componentes obtenidos de la molienda de granos, árboles, ramas, raíces, hojas, virutas de madera, serrín, matas y arbustos, verduras, frutas, flores y estiércol.

La biomasa puede proceder de una única fuente o puede comprender una mezcla derivada de más de una fuente: por ejemplo, la biomasa puede comprender una mezcla de mazorcas de maíz y tallos de maíz, o una mezcla de tallos y hojas.

5 En una realización, la biomasa que es útil para la invención tiene un contenido relativamente alto en carbohidratos, es relativamente densa y/o es relativamente fácil de recolectar, transportar, almacenar y/o manipular. En otra realización, la biomasa puede incluir residuos agrícolas, tales como tallos de maíz, paja de trigo, paja de cebada, paja de avena, paja de arroz, paja de canola, y tallos de soja; hierbas, tales como *Panicum virgatum*, *Miscanthus*, *Spartina* y *Phalaris arundinacea*; residuos de procesos de fibras, tales como fibras de maíz, pulpa de remolacha, finos y desechos de la trituración de pulpa y bagazo de caña de azúcar; sorgo; residuos forestales, tales como  
10 madera de álamo temblón, otras maderas nobles, maderas blandas y serrín; y productos de papel procedentes de residuos de consumo; así como otros cultivos o material lignocelulósico suficientemente abundante. En otra realización, la biomasa que es útil comprende mazorcas de maíz, tallos de maíz, bagazo de caña de azúcar y *Panicum virgatum*.

Pretratamiento de la biomasa antes de la sacarificación

15 En la biomasa, las fibrillas de celulosa cristalina están rodeadas de una matriz de hemicelulosa que, a su vez, está rodeada por una capa de lignina externa. Normalmente se requiere un pretratamiento de la biomasa para modificar la barrera de lignina para que el posterior proceso de sacarificación enzimática sea más eficaz. Los métodos para pretratar la biomasa para prepararla para la sacarificación son muy conocidos en la técnica (por ejemplo, Hsu, T.-A., 1996, "Pretreatment of Biomass", en Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, D.C., 179-212; Ghosh, P., Singh, A., 1993, y documentos US 7.503.981, US 7.504.245, US  
20 7.4138.82, WO2008/112291). Algunos métodos de pretratamiento son, por ejemplo, la hidrólisis con ácidos diluidos (T. A. Lloyd y C. E. Wyman, Bioresource Technol., 96:1967, 2005), la técnica de explosión de fibras con amoníaco (AFEX) (F. Teymouri et al., Bioresource Technol., 96:2014, 2005), el tratamiento con agua caliente líquida a pH controlado (N. Mosier et al., Bioresource Technol., 96: 1986, 2005), el proceso de reciclaje de amoníaco acuoso (ARP) (T. H. Kim e Y. Y. Lee, Bioresource Technol., 96: 2007, 2005), el pretratamiento con cal (S. Kim y M. T. Holzapple, Bioresource Technol., 96: 1994, 2005) y el pretratamiento líquido iónico (documento US 2008/0227162).

25 Para el pretratamiento de biomasa, la temperatura, el pH, el tiempo del pretratamiento y la concentración de los reactivos, la concentración de uno o más reactivos adicionales, la concentración de la biomasa, el tipo y tamaño de partícula de la biomasa están relacionados; así, estas variables pueden ajustarse según sea necesario para cada tipo de biomasa para optimizar el proceso de pretratamiento.  
30

La biomasa del presente método puede pretratarse mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente. Como alternativa, en una realización, para preparar la biomasa del presente método para la sacarificación, esta puede pretratarse inicialmente con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mM durante 1 hora a 121°C y lavarse con agua.

35 En una realización, el residuo de biomasa puede suspenderse también en EtOH al 69% (en v/v) que contiene NaOH al 2,9% (en p/v) y calentarse en un recipiente de presión de acero inoxidable (19 ml de capacidad) a una temperatura de 175°C durante 140 minutos, enfriarse hasta la temperatura ambiente, filtrarse y lavarse con EtOH al 69% para eliminar los productos de la degradación no deseados y los fragmentos de lignina. En otra realización, la biomasa pretratada puede secarse al aire. El secado puede realizarse por medios convencionales, tales como la exposición a temperatura ambiente al vacío o a un flujo de aire a presión atmosférica y/o calentando en una estufa o  
40 en una estufa de vacío.

La biomasa pretratada secada después puede analizarse empleando cualquier medio analítico conocido en la técnica para determinar la concentración de glucano, xilano y lignina insoluble en ácidos. El contenido en glucano y xilano de la biomasa pretratada secada se emplea para determinar las cargas enzimáticas requeridas en el proceso de sacarificación.

45 Sacarificación

La biomasa pretratada puede hidrolizarse en presencia de un consorcio de enzimas de sacarificación para liberar los oligosacáridos y/o monosacáridos en un hidrolizado. Pueden añadirse tensioactivos, tales como Tween 20 o Tween 80 o polioxiéteros, tales como PEG 2000, 4000 o 8000, para mejorar el proceso de sacarificación. También pueden emplearse otros tensioactivos, tales como los descritos en la patente de EEUU 7.354.743 B2. Las enzimas de  
50 sacarificación y los métodos para el tratamiento de biomasa se analizan en Lynd, L. R., et al. (Microbiol. Mol. Biol. Rev., 66:506-577, 2002). El consorcio de enzimas de sacarificación puede comprender una o más glicosidasas. Las glicosidasas pueden seleccionarse del grupo que consiste en glicosidasas que hidrolizan la celulosa, glicosidasas que hidrolizan la hemicelulosa, y glicosidasas que hidrolizan el almidón. Otras enzimas en el consorcio de enzimas de sacarificación pueden incluir peptidasas, lipasas, ligninasas y acetil y feruloil esterasas.

55 El consorcio de enzimas de sacarificación comprende una o más enzimas seleccionadas principal, pero no exclusivamente, del grupo de las "glicosidasas", que hidrolizan los enlaces glicosídicos de di-, oligo- y polisacáridos y que 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 de las "hidrolasas" (EC 3.). Las glicosidasas útiles en el presente método pueden clasificarse según el componente de la biomasa que hidrolizan. Las glicosidasas útiles para el presente método incluyen las glicosidasas que hidrolizan la celulosa (por ejemplo, celulasas, endoglucanasas, exoglucanasas, celobiohidrolasas,  $\beta$ -glucosidasas), las glicosidasas que hidrolizan la hemicelulosa (por ejemplo, xilanasas, endoxilanasas, exoxilanasas,  $\beta$ -xilosidasas, arabinofuranosidasas, manasas, galactasas, pectinasas, glucuronidasas), y las glicosidasas que hidrolizan el almidón (por ejemplo, amilasas,  $\alpha$ -amilasas,  $\beta$ -amilasas, glucoamilasas,  $\alpha$ -glucosidasas, isoamilasas). Las enzimas hidrolizantes de oligómeros de xilosa de cadena ramificada hidrolizan oligómeros de cadena ramificada que contienen xilosa y arabinosa, por ejemplo, L- $\alpha$ -arabinofuranosidasa.

Además, puede resultar útil añadir otras actividades al consorcio 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 acetil (EC 3.1.1.6) y feruloil (EC 3.1.1.73) estererasas, para ayudar a liberar los polisacáridos de los otros componentes de la biomasa. En la técnica es sabido que los microorganismos que producen enzimas hidrolizantes de polisacáridos a menudo muestran una actividad, tal como la degradación de la celulosa, que es catalizada por varias enzimas o un grupo de enzimas que tienen diferentes especificidades de sustrato. Así, una "celulasa" procedente de un microorganismo puede comprender un grupo de enzimas, todas las cuales pueden contribuir a la actividad hidrolizante de celulosa. Las preparaciones enzimáticas del mercado o no comerciales, tales como celulasa, pueden comprender numerosas enzimas dependiendo del esquema de purificación utilizado para obtener la enzima. Por tanto, el consorcio de enzimas de sacarificación del presente método puede comprender una actividad enzimática, tal como "celulasa", aunque se reconoce que esta actividad puede ser catalizada por más de una enzima.

Tal como se indicó anteriormente, en la presente invención, no es necesario que el consorcio de enzimas de sacarificación añadido al recipiente de sacarificación contenga  $\beta$ -xilosidasa,  $\beta$ -glucosidasa ni arabinofuranosidasas. Una o más de estas enzimas estará secuestrada dentro del circuito de circulación de fibras huecas. Las enzimas xilanasas, que actúan sobre xilosas poliméricas y oligoméricas, pueden incluirse en el consorcio de enzimas de sacarificación en el recipiente de sacarificación y también pueden secuestrarse dentro del circuito de circulación de fibras huecas.

Las enzimas de sacarificación pueden obtenerse en el mercado, en forma aislada, tal como la celulasa Spezyme® CP (Genencor International, Rochester, NY) y la xilanasas Multifect® (Genencor). Además, las enzimas de la sacarificación pueden no estar purificadas y se proporcionan como un tipo de extracto celular o preparación de células completas. Las enzimas pueden producirse utilizando microorganismos recombinantes que se han modificado para que expresen múltiples enzimas sacarificantes. Los expertos en la técnica saben cómo determinar la cantidad eficaz de enzimas para ser utilizadas en el consorcio y cómo ajustar las condiciones para una actividad enzimática óptima. Los expertos en la técnica también saben cómo optimizar las clases de actividades enzimáticas requeridas dentro del consorcio para obtener una sacarificación óptima de un producto de pretratamiento concreto bajo las condiciones seleccionadas.

Preferiblemente, la reacción de sacarificación se realiza a la temperatura y el pH óptimos, o cerca de estos, para las enzimas de sacarificación. El óptimo de temperatura utilizado con el consorcio de enzimas de sacarificación en el presente método varía de aproximadamente 15°C a aproximadamente 100°C. En otra realización, el óptimo de temperatura varía de aproximadamente 20°C a aproximadamente 80°C, y lo más generalmente de 45-50°C. El óptimo de pH puede variar de aproximadamente 2 a aproximadamente 11. En otra realización, el óptimo de pH utilizado con el consorcio de enzimas de sacarificación en el presente método varía de aproximadamente 4 a aproximadamente 5,5.

La sacarificación puede realizarse durante un tiempo de aproximadamente varios minutos a aproximadamente 120 horas, y preferiblemente de aproximadamente varios minutos a aproximadamente 48 horas. El tiempo para la reacción dependerá de la concentración enzimática y la actividad específica, así como del sustrato utilizado, su concentración (es decir, la carga de sólidos) y las condiciones ambientales, tales como la temperatura y el pH. Los expertos en la técnica pueden determinar con facilidad las condiciones óptimas de temperatura, pH y tiempo para ser utilizadas con un sustrato y un consorcio de enzimas de sacarificación concretos.

La sacarificación puede realizarse de modo discontinuo o como un proceso continuo. La sacarificación también puede realizarse en una etapa o en una serie de etapas. Por ejemplo, las diferentes enzimas necesarias para la sacarificación pueden mostrar diferentes óptimos de pH o temperatura. Puede realizarse un tratamiento primario con una o más enzimas a una temperatura y pH, seguido de un tratamiento secundario o terciario (o más tratamientos) con diferentes enzimas a diferentes temperaturas y/o pH. Además, el tratamiento con enzimas diferentes en etapas secuenciales puede ser al mismo pH y/o temperatura, o a diferentes pH y temperaturas, tal como empleando hemicelulasas estables y más activas a pH y temperaturas mayores, seguido de celulasas que son activas a pH y temperaturas más bajas.

El grado de solubilización de los azúcares de la biomasa después de la sacarificación puede controlarse midiendo la liberación de monosacáridos y oligosacáridos. Los métodos para medir monosacáridos y oligosacáridos son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, la concentración de azúcares reductores puede determinarse utilizando el



ensayo de ácido 1,3-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, G. L., Anal. Chem., 31:426-428, 1959). Como alternativa, los azúcares pueden medirse mediante HPLC utilizando una columna apropiada, tal como se describe a continuación.

#### Compartimentalización de la SSF

5 En el presente método, se ha desarrollado una SSF compartimentalizada (CSSF) para eliminar la inhibición retroalimentada de algunas de las enzimas de sacarificación que están presentes generalmente en el consorcio de enzimas de sacarificación, durante la sacarificación de la biomasa pretratada. En algunos casos, la inhibición retroalimentada por el producto puede solucionarse, en parte, mediante la adición de más enzimas al recipiente de sacarificación, disminuyendo así la pérdida de actividad enzimática debida a la inhibición retroalimentada durante la sacarificación. Sin embargo, la adición de más enzimas al proceso de sacarificación, aunque acelera las reacciones hidrolíticas, es cara y aumenta el coste total del proceso. Para eliminar el problema de la inhibición retroalimentada de las enzimas de sacarificación por sus productos finales es necesario retirar constantemente los productos finales para evitar su acumulación.

15 En este caso, la inhibición retroalimentada de las enzimas de la sacarificación se mitiga mediante la aplicación de CSSF y secuestrando algunas de las enzimas hidrolizantes en un compartimento separado, tal como un circuito de circulación de fibras huecas. La difusión de los sustratos enzimáticos desde el recipiente de sacarificación a través de un primer filtro de membrana semipermeable hacia un compartimento separado que contiene enzimas disminuye su concentración en el recipiente de sacarificación y con ello se elimina el potencial de inhibición retroalimentada de las enzimas del consorcio de enzimas de sacarificación por sus productos. Las enzimas secuestradas (por ejemplo,  $\beta$ -xilosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y arabinofuranosidasa) en el compartimento que contiene enzimas hidroliza sus sustratos para producir los productos de monosacáridos deseados. Los productos se mueven a través de una segunda membrana semipermeable, en donde se difunden hacia el recipiente de fermentación. Tanto la primera como la segunda membrana semipermeable tiene un límite de exclusión de peso molecular de 10 a aproximadamente 30 kDa, lo cual permite el paso solo de moléculas pequeñas (es decir, los oligosacáridos solubles, que incluyen oligómeros de xilosa de cadena ramificada pequeños). Las enzimas secuestradas permanecen en el compartimento separado, puesto que no son capaces de pasar a través de la primera o la segunda membrana semipermeable. La hidrólisis de los disacáridos para producir sus monosacáridos y su conversión en el producto diana reduce la inhibición por el producto final de las enzimas en el recipiente de sacarificación. El secuestro de enzimas en un circuito de circulación de fibras huecas permite su uso repetido durante la sacarificación, sin que sea necesario un proceso de recuperación enzimática. Tener recipientes de sacarificación y de fermentación separados permite que los recipientes desarrollen su función a diferentes temperaturas y también evita que las células fermentadoras se adhieran a la biomasa no digerida.

#### Membranas semipermeables de fibras huecas

35 En una realización, la membrana semipermeable es una membrana semipermeable de fibras huecas. Las membranas semipermeables de fibras huecas ofrecen las ventajas exclusivas de unas altas densidades de compactación de membrana, unas proporciones altas de superficie/volumen, diseños sanitarios y, debido a su construcción e integridad estructural, pueden soportar la contrapresión de permeado, lo cual permite obtener una flexibilidad en el diseño y el funcionamiento del sistema.

40 Las membranas semipermeables de fibras huecas actúan como barreras físicas que solo permiten el paso de materiales de hasta un cierto tamaño, forma o carácter, y son muy conocidas en la técnica (por ejemplo, Hollow fiber manufacture and application, Chem. Technol. Rev., volumen 194, editado por J. Scott, 1981, Noyes Data Corp., Park Ridge, NJ.; y Synthetic membranes, editado por M. B. Chenweth, p. 63, 1986, Harwood Academic Press, NY, NY; y Leeper, S. A., Membrane separation in the recovery of biofuels and biochemicas: an update review, Sep. Purif. Technol., pp. 99-194, 1992). Las dos morfologías básicas de membranas semipermeables de fibras huecas son la "isótropa" y la "anisótropa". La separación de membrana se logra utilizando estas morfologías.

45 La configuración "anisótropa" contiene una película ultrafina, semipermeable y densa que se superpone a una estructura porosa de soporte. Las membranas semipermeables de polisulfona microporosas "isótropas" pueden prepararse utilizando una combinación concreta de disolución de vaciado y una formulación de disolución de precipitación, y condiciones de vaciado. Las membranas lisas y de fibras huecas pueden prepararse de esta manera. Las membranas isótropas carecen de película y se caracterizan por una porosidad uniforme a través de la membrana. Para los objetivos del método descrito en la presente, pueden utilizarse ambos tipos de membranas semipermeables de fibras huecas.

55 Puesto que en un proceso de filtración de fibras huecas no está implicado ningún cambio de fase y no es necesario el calor latente, los sistemas de membranas semipermeables de fibras huecas tienen unos requisitos energéticos modestos. Además, las membranas semipermeables de fibras huecas tienen una gran superficie de membrana por volumen de módulo. Por tanto, aunque el tamaño de una membrana semipermeable de fibras huecas puede ser más pequeños que otros tipos de membrana, puede tener un rendimiento mayor.

Las membranas semipermeables de fibras huecas son flexibles y pueden realizar la filtración en un proceso "de dentro hacia fuera" o "de fuera hacia dentro". Además, las membranas semipermeables de fibras huecas tienen unos

bajos costes de funcionamiento, comparado con otros tipos de operaciones de unidades. En la técnica se han descrito biorreactores de membranas semipermeables de fibras huecas (documentos WO2007/004170 y WO2008/006494 y WO2007/120449 y US2002/0164731; y Engasser, J. M., et al., Chem. Eng. Sci., 35:99-105, 1980, y Kitano, H. e Ise, N., Trends in Biotechnol., 2:5-7, 1984). Los biorreactores de membranas semipermeables de fibras huecas pueden hacerse funcionar de modo continuo y tienen la ventaja de una alta proporción de superficie a volumen. En estos sistemas, el biocatalizador (enzima y/o microorganismo) puede utilizarse en forma "libre" o "inmovilizada".

Las membranas semipermeables de fibras huecas están disponibles en diversos tamaños de poro para cualquier tipo de aplicación prevista. Para el presente método, la membrana semipermeable tiene un límite de exclusión de peso molecular de 10 a aproximadamente 30 kDa, con lo cual permite el paso solo de moléculas pequeñas (es decir, los oligosacáridos solubles, que incluyen oligómeros de xilosa de cadena ramificada pequeños), evitando así que las enzimas voluminosas secuestradas dentro de los confines del circuito de circulación de fibras huecas se introduzcan en los recipientes de sacarificación y de fermentación, y aislando la biomasa pretratada en el recipiente de sacarificación de las enzimas del circuito de circulación de fibras huecas y el recipiente de fermentación.

La membrana semipermeable de fibras huecas utilizada en el presente método puede estar fabricada con materiales tales como polisulfona (PSf), polisulfona hidroxilada (OHPSf), poliéter sulfona (PES), poliéter sulfona hidroxilada (OHPEs), polisulfona sulfonada, poliéter cetona (PEK), poliéter éter cetona (PEEK), poliimida (PI), poliéter imida (PEI), o cualquiera de sus combinaciones.

Aplicación del circuito de circulación de fibras huecas para facilitar la sacarificación y para evitar la inhibición de enzimas

En una realización, el presente método permite la aplicación de CSSF para la sacarificación de una biomasa pretratada y la fermentación de los azúcares resultantes para producir productos diana deseables en recipientes de sacarificación y de fermentación separados conectados entre sí a través de un circuito de circulación de fibras huecas que contiene dos membranas semipermeables de fibras huecas, en el que al menos se secuestra una enzima hidrolizante de oligosacáridos.

La biomasa pretratada se añade junto con el consorcio de enzimas de sacarificación al recipiente de sacarificación, en el que se trata la biomasa pretratada para producir componentes de peso molecular alto y bajo. Los componentes de la biomasa sacarificada se transportan a través de un primer circuito de circulación hacia un primer filtro de membrana semipermeable de fibras huecas. La membranas semipermeable evita la difusión de los componentes de peso molecular alto de la biomasa pretratada y, al mismo tiempo, permite la difusión de los componentes de peso molecular bajo solubles (menores que 30 kDa). Los componentes de peso molecular pasan a través de la membrana semipermeable hacia un circuito de circulación de fibras huecas que contiene al menos una enzima de sacarificación secuestrada.

Las enzimas secuestradas dentro del circuito de circulación de fibras huecas actúan sobre uno o más oligosacáridos de peso molecular bajo difundidos en el circuito de circulación de fibras huecas, por lo cual se forma al menos un producto de azúcar. El producto formado de esta manera después se transporta a través de un segundo circuito de circulación hacia el recipiente de fermentación, en el que es fermentado por microorganismos adecuados para producir un producto diana.

En una realización, las enzimas secuestradas pueden incluir  $\beta$ -xilosidasas, xilanasas,  $\beta$ -glucosidasas y arabinofuranosidasas. La celobiosa, la xilobiosa y los oligómeros de xilosas de cadena ramificada de la biomasa sacarificada difunden a través de la primera membrana semipermeable de fibras huecas y entran en el circuito de circulación de fibras huecas, en donde son hidrolizadas para producir glucosa, xilosa y arabinosa por la  $\beta$ -glucosidasa, la  $\beta$ -xilobiosidasa y las enzimas hidrolizantes de oligómeros de xilosa de cadena ramificada, respectivamente. Cualquier inhibición retroalimentada de la glucosa, xilosa y arabinosa sobre las enzimas secuestradas (por ejemplo,  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -xilobiosidasa, xilanasas y arabinofuranosidasas) se mitiga mediante el paso de los productos a través de la segunda membrana semipermeable hacia el segundo circuito de circulación y hacia el recipiente de fermentación, en el que son consumidos por un biocatalizador en la fermentación. Las enzimas secuestradas después se reciclan para que actúen sobre más sustratos procedentes del recipiente de sacarificación a través del primer circuito de circulación externo. Este sistema permite la reutilización barata de las enzimas secuestradas y mitiga la inhibición retroalimentada por el producto final de las enzimas en el recipiente de sacarificación y en el circuito de circulación de fibras huecas. Las enzimas secuestradas también se pueden inmovilizar, de modo que el contenido del circuito de circulación de fibras huecas se hace pasar sobre una matriz que contiene las enzimas inmovilizadas. Esta inmovilización puede proporcionar una mayor estabilización de las enzimas (por ejemplo, frente a la desnaturalización térmica). La utilización de recipientes separados elimina los problemas asociados con los diferentes requisitos de temperatura de la sacarificación y la fermentación. El calor generado en el recipiente de fermentación o transportado entre los recipientes puede transportarse al recipiente de sacarificación utilizando una bomba de calor. El microorganismo en el recipiente de fermentación tampoco está en contacto directo con la biomasa sin digerir, con lo cual se eliminan las posibles pérdidas en la capacidad de fermentación por la adsorción de las células a la biomasa. La retirada del producto diana también se realiza en ausencia de biomasa no digerida o digerida de modo incompleto.

#### Aparato y proceso para la CSSF

En una realización, la CSSF se produce en un aparato para procesar una biomasa pretratada, que comprende un recipiente de sacarificación y un recipiente de fermentación separado, en el que dichos recipientes están conectados por dos circuitos de circulación externos y un circuito de circulación de fibras huecas que conecta los dos circuitos de circulación externos y comprende membranas semipermeables, en el que dicho aparato proporciona la sacarificación y la fermentación simultáneas compartimentalizadas de una biomasa pretratada.

En la figura 2 se muestra una realización del presente aparato. Esta figura muestra un diagrama de bloques de un aparato para la CSSF de una biomasa pretratada, en el que los recipientes separados para la sacarificación y la fermentación están conectados a través de dos circuitos de circulación externos y un circuito de circulación de fibras huecas como sigue: recipiente de sacarificación (1); primer circuito de circulación externo (2); circuito de circulación de fibras huecas (3); segundo circuito de circulación externo (4); recipiente de fermentación (5); salida del producto diana (6); primera bomba de circulación para el primer circuito de circulación externo (7); segunda bomba de circulación para el segundo circuito de circulación externo (8); tercera bomba de circulación para el circuito de fibras huecas (9); primera membrana semipermeable (10) del circuito de circulación de fibras huecas, y segunda membrana semipermeable (11) del circuito de circulación de fibras huecas (3).

En una realización, un método para emplear el aparato de la figura 2 es el siguiente. El recipiente de sacarificación (1), que generalmente se mantiene a una temperatura de 35°C a 55°C y a un pH de 4 a aproximadamente 6, contiene una biomasa parcialmente sacarificada que contiene celobiosa, xilobiosa, oligómeros de xilosa y un consorcio de enzimas de sacarificación. Un primer circuito de circulación externo (2) pasa a través de la biomasa y el consorcio de enzimas de sacarificación desde el recipiente de sacarificación a lo largo del exterior de una primera membrana semipermeable de fibras huecas (10), cuyo interior es parte del circuito de circulación de fibras huecas (3). Los polisacáridos de la biomasa y las enzimas del consorcio de sacarificación, debido a su gran tamaño molecular, no pueden pasar a través de la membrana semipermeable de fibras huecas hacia el circuito de circulación de fibras huecas, mientras que las moléculas más pequeñas, tales como la celobiosa, la xilobiosa y los oligómeros de xilosa de cadena ramificada, pueden pasar a través de la membrana. La  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -xilosidasa, la xilanasa y las enzimas hidrolizantes de oligómeros de xilosa de cadena ramificada están secuestradas dentro del circuito de circulación de fibras huecas. La  $\beta$ -glucosidasa actúa sobre el sustrato soluble pequeño (celobiosa), que puede pasar a través de la primera membrana semipermeable (10). La  $\beta$ -xilobiosidasa, una enzima del tipo de la  $\beta$ -xilosidasa, convierte la xilobiosa, que también puede pasar a través de la primera membrana semipermeable, en xilosa. Las enzimas hidrolizantes de oligómeros de xilosa de cadena ramificada convierten los oligómeros de xilosa de cadena ramificada (por ejemplo, L-arabinosa unida a un esqueleto oligomérico de xilosa a través de un enlace  $\alpha$ -1,2), que pueden pasar a través de la primera membrana semipermeable, para ser hidrolizados en xilosa y arabinosa. La glucosa, la xilosa y la arabinosa generadas de esta forma en el circuito de circulación de fibras huecas se transportan, a través de la segunda membrana semipermeable (11) y el segundo circuito de circulación externo (4) hacia el recipiente de fermentación (5), en el que son convertidas en el producto o productos diana por los microorganismos. La segunda bomba (9) en el circuito de fibras huecas continuamente recircula las enzimas secuestradas y permite su uso repetido en sus respectivas reacciones. El uso repetido de las enzimas y la menor cantidad global requerida de enzimas para el proceso produce un ahorro global significativo en los costes. Además, el método descrito es un proceso de CSSF exclusivo que obvia la necesidad de que el sustrato lignocelulósico y el microorganismo fermentador estén en el mismo recipiente, con lo cual se solucionan problemas tales como la incompatibilidad de temperatura. La retirada del producto diana del recipiente de fermentación (6) ayuda a dirigir todo el proceso hasta su finalización. La primera y la tercera bomba del circuito externo (7) y (8) permite la recirculación de diversos componentes entre los recipientes de sacarificación y de fermentación, y el circuito de circulación de fibras huecas.

En este método, puesto que el microorganismo no está en contacto directo con la biomasa sin digerir, se eliminan las posibles pérdidas en la capacidad de fermentación por la adsorción de células a la biomasa.

Además, la retirada del producto diana del recipiente de fermentación, tal como mediante destilación, membranas permoselectivas, pervaporación o cualquier otro método adecuado no se ve dificultada por la presencia de biomasa no digerida.

Los recipientes de sacarificación y de fermentación son muy conocidos en la técnica, y los expertos en la técnica están familiarizados con su aplicación.

#### Fermentación para producir los productos diana

Pueden emplearse diversos métodos de fermentación, con los microorganismos adecuados, para la conversión de los azúcares fermentables liberados de la biomasa sacarificada pretratada para producir los productos diana. Para el presente método puede emplearse un sistema de fermentación continuo o de alimentación discontinua. Estos métodos son muy conocidos en la técnica, y los expertos en la técnica están familiarizados con su aplicación. Los procesos de fermentación "de alimentación discontinua" comprenden un sistema discontinuo típico, con la excepción de que el sustrato se añade a medida que avanza la fermentación. Las fermentaciones discontinuas o de alimentación discontinua son muy conocidas en la técnica y pueden encontrarse ejemplos en Thomas D. Brock, en

Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, 2ª edición (1989), Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.: o Deshpande, Mukund V., Appl. Biochem. Biotechnol., 36:227, (1992), que se incorporan en la presente como referencia. Se anticipa que el presente método puede adaptarse también a los métodos de fermentación "continua". La fermentación continua es un sistema abierto en el que el medio de fermentación se añade continuamente a un biorreactor y simultáneamente se retira una cantidad igual de medio acondicionado para el procesamiento.

Pueden emplearse diversos tipos de medios de crecimiento en la presente invención. Estos medios de crecimiento pueden suplementarse, por ejemplo, con extracto de levadura, aminoácidos específicos, fosfato, fuentes de nitrógeno, sales y oligoelementos. También pueden incluirse los componentes requeridos para la producción de un producto específico fabricado por un biocatalizador específico, tal como un antibiótico, para mantener un plásmido o un cofactor necesario en una reacción catalizada por enzimas. También pueden incluirse azúcares adicionales para aumentar la concentración total de azúcares.

La temperatura y/o el gas de la parte superior también pueden ajustarse, dependiendo de las condiciones útiles para los microorganismos de la fermentación. La fermentación puede ser aerobia o anaerobia. Según el método descrito en la presente, la fermentación de uno o más azúcares y la sacarificación se producen de modo simultáneo, pero en compartimentos separados, y se definen como una sacarificación y una fermentación simultáneas compartimentalizadas (CSSF).

La fermentación de azúcares para producir productos diana puede ser realizada por uno o más microorganismos apropiados, tales como bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Pueden emplearse microorganismos de tipo salvaje y recombinantes. Estos microorganismos incluyen, pero no se limitan a *Escherichia*, *Zymomonas*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, y *Clostridium*.

Los productos diana incluyen, sin limitación, alcoholes (por ejemplo, arabinitol, butanol, etanol, glicerol, metanol, 1,3-propandiol, sorbitol, y xilitol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido acetónico, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucárico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutárico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido málico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido propiónico, ácido succínico, y ácido xilónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina, serina, y treonina); gases (por ejemplo, metano, hidrógeno (H<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), y monóxido de carbono (CO)).

Los procesos de fermentación también incluyen procesos utilizados en la industria de los alcoholes de consumo (por ejemplo, cerveza y vino), la industria láctea (por ejemplo, productos lácteos fermentados), la industria del cuero y la industria del tabaco.

Además de los anteriores, pueden producirse otros productos generales, tales como productos orgánicos, productos químicos, combustible, productos químicos de consumo y especializados, tales como xilosa, acetona, acetato, glicina, lisina, ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido láctico), 1,3-propandiol, butandiol, glicerol, etilenglicol, furfural, polihidroxialcanoatos, ácido cis,cis-mucónico, y piensos animales (Lynd, L. R., Wyman, C. E., y Gerngross, T. U., Biocommodity engineering, Biotechnol. Prog., 15:777-793, 1999; y Philippidis, G. P., Cellulose bioconversion technology, en Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, D.C., 179-212, 1996; y Ryu, D. D. Y., y Mandels, M., Cellulases: biosynthesis and applications, Enz. Microb. Technol., 2:91-102, 1980), utilizando el presente método.

También pueden producirse subproductos potenciales, tales como múltiples productos orgánicos a partir de carbohidratos fermentables. Los residuos ricos en lignina que permanecen después de la sacarificación y la fermentación pueden convertirse en productos químicos derivados de la lignina, componentes básicos de productos químicos, o emplearse para la producción de energía.

Los productos diana pueden producirse después del paso de ciertos componentes de la biomasa sacarificada pretratada a través del circuito de circulación que contiene fibras huecas hacia el recipiente de fermentación, según se describe en la presente.

Los productos diana pueden retirarse del recipiente de fermentación mediante métodos tales como destilación, empleando membranas permosselectivas, o pervaporación, o de modo no selectivo mediante el reabastecimiento continuo o discontinuo del caldo de fermentación. La retirada del producto diana ayuda a dirigir toda la reacción hasta su finalización.

## 50 Ejemplos

La presente invención se define con más detalle en los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se ofrecen solo como ilustración. A partir del anterior análisis y de estos ejemplos, los expertos en la técnica pueden determinar las características fundamentales de esta invención y, sin apartarse de su espíritu ni de su alcance, pueden realizar diversos cambios y modificaciones en la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones.

## Materiales

Las enzimas de sacarificación se obtuvieron de las siguientes fuentes: Spezyme® CP y xilanasa Multifect® (Genencor International, Palo Alto, CA) y Novozyme 188 (Novozymes, 2880 Bagsvaerd, Dinamarca).

5 En la presente se empleó un bagazo de caña de azúcar que fue molido en un molino de cuchillas Wiley a través de un tamiz de 1 mm.

## Abreviaturas utilizadas en los ejemplos

10 En los ejemplos se emplean las siguientes abreviaturas: "°C" es grados centígrados o Celsius; "%" es porcentaje; "ml" es mililitro; "h" es hora u horas; "rpm" es revoluciones por minuto; "EtOH" es etanol; "mg/ml" es miligramo por mililitro; "g/100 ml" es gramo por 100 mililitros; "N" es normal; "g" es gramo; "NaOH" es hidróxido de sodio; "en v/v" es en volumen por volumen; "mm" es milímetro; "ml/min" es mililitro por minuto; y "min" es minuto o minutos, "mM" es milimolar, "mg de proteína/g de celulosa" significa miligramos de proteína por gramo de celulosa, "kDa" significa kilodaltons.

Ejemplo 1: El aumento de la concentración de  $\beta$ -glucosidasa disminuye la necesidad de celulasa mediante la disminución de la inhibición por el producto final durante la sacarificación de la biomasa

15 Para preparar la biomasa para la sacarificación, primero se pretrató como se describe en la presente. Se suspendió bagazo de caña de azúcar molido con cuchillas (2 g) en 15 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mM y la suspensión se sometió a un autoclave en viales de vidrio sellados durante 1 hora a 121 °C. Los contenidos se enfriaron y se colocaron en dos cartuchos de columna cromatográfica desechables que contenían filtros de plástico fritado, se colocaron en tubos cónicos de 15 ml y se centrifugaron a temperatura ambiente a 3000 rpm utilizando un rotor de cubeta flotante HS-4  
20 en una centrífuga RC-5B Sorvall (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) para lavar la biomasa pretratada. Cada columna se lavó 3 veces con 5 ml de H<sub>2</sub>O antes de lavar cada una dos veces con 2,5 ml de EtOH al 69% (en v/v) en H<sub>2</sub>O más NaOH (5 mg/1,75 ml) y antraquinona (1 mg/1,75 ml). El residuo de la biomasa pretratada húmedo, que pesaba 3,8 g (1,4 g de materia seca), se suspendió en 4,6 g más de disolución de lavado. La suspensión se colocó en un recipiente de presión de acero inoxidable (19 ml de volumen interno), se cerró y se calentó a 175 °C durante  
25 140 min. El recipiente de presión se enfrió hasta la temperatura ambiente y el contenido se centrifugó en 2 cartuchos de columna cromatográfica según se describió anteriormente. La biomasa pretratada en cada columna se lavó 4 veces con 1,5 ml de EtOH al 69% (en v/v) en H<sub>2</sub>O. El residuo de la biomasa pretratada después se secó al aire (aproximadamente 92% de biomasa seca).

30 La muestra de biomasa pretratada secada al aire (78,7% de glucano, 5,5% de xilano) se suspendió en tampón Nacitrato 50 mM, pH 4,6, con una carga de sólidos de aproximadamente 11%. Se añadieron la celulasa Spezyme® CP, la xilanasa Multifect®, y Novozyme 188 a diferentes proporciones y concentraciones por g de celulosa. Estas proporciones (mg de proteína/g de celulosa) fueron de 4:3:8, 8:3:4, 6:3:6, 6:6:12, 12:6:1,2 y 12:6:12. Además se añadieron Tween 20 al 1% (en p/v) y NaN<sub>3</sub> al 0,01% (en p/v). Se añadieron volúmenes de muestra de  
35 aproximadamente 0,5 ml a viales de cierre roscado de 6 ml que contenían dos esferas de vidrio (3 mm) y se incubaron a 46 °C en un agitador rotatorio (250 rpm). Se retiraron partes alícuotas a las 4 h y cada 24 h después del inicio de la incubación y se diluyeron hasta 41,25 veces con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N para el análisis. Las muestras se filtraron a través de filtros Spin-X (Corning. Inc., Corning, NY) y los filtrados se analizaron mediante HPLC (Agilent serie 1100/1200, Agilent, Palo Alto, CA). Se empleó una columna BioRad HPX-87H Aminex (Bio-Rad, Hercules, CA) para fraccionar los azúcares liberados utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N como fase móvil. La columna se mantuvo a 60 °C y el caudal a 0,6 mg/min. Se empleó un detector del índice refractario, mantenido a 55 °C, para detectar los azúcares eluidos.

45 La figura 1A muestra el desarrollo en el tiempo de la sacarificación de la biomasa a diferentes cargas de enzima, expresándose los rendimientos de glucosa monomérica como el porcentaje de rendimiento teórico solo para la sacarificación. La figura 1B muestra una comparación de los rendimientos de la glucosa monomérica a las 120 h de la figura 1A para las diferentes proporciones de enzima. Los experimentos de sacarificación enzimática utilizando cargas de Spezyme® CP:xilanasa Multifect®:Novozyme 188 de [6:3:6], [6:6:12] y [12:6:1,2] por g de celulosa produjeron prácticamente los mismos rendimientos a las 120 h de incubación. Los resultados demuestran que la  
50 disminución de la carga de la enzima Spezyme® CP puede compensarse aumentando la carga de Novozyme 188 (principalmente  $\beta$ -glucosidasa). Basándose en estos resultados, si la  $\beta$ -glucosidasa es estable y reutilizable, entonces su reutilización y su capacidad para reemplazar a parte de la celulasa puede dar como resultado un menor coste de la enzima celulasa por cantidad de azúcar monomérico producido.

Ejemplo 2 (profético): Un circuito de circulación de fibras huecas doble atrapa a las enzimas  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilobiosidasa para mitigar la inhibición por el producto final y permitir su reciclaje

55 Basándose en los resultados descritos en el ejemplo 1, un proceso en el que los productos de la sacarificación de una biomasa se retiran, y en el que las enzimas  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilobiosidasa son recicladas, puede proporcionar un significativo ahorro de costes para la producción de azúcares fermentables.

En la figura 2 se muestra una representación esquemática de un aparato de SSF continua que emplea recipientes separados para la sacarificación y la fermentación, que están conectados por un circuito de circulación de fibras huecas semipermeable. El recipiente de sacarificación (1) se mantiene a 46 °C y pH 5. La biomasa pretratada se añade al recipiente de sacarificación junto con la celulasa y la xilanasa. Los pequeños oligómeros de hexosa y pentosa, que incluyen celobiosa y xilobiosa, que son producidos por las reacciones de sacarificación enzimática, son trasladados a través del primer circuito de circulación externo (2) hacia la primera membrana de fibras huecas semipermeable (10), en donde pasan a través de la membrana hacia el circuito de circulación de fibras huecas (3). El circuito de circulación de fibras huecas contiene las enzimas  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilobiosidasa secuestradas. Estas enzimas son moléculas grandes que no puede difundir a través de la membrana de fibras huecas, que tiene un límite de exclusión de peso molecular de 30 kDa. Sin embargo, la membrana semipermeable es permeable a reactivos de molécula pequeña (celobiosa y xilobiosa) y a los productos (glucosa y xilosa) de estos reactantes. Las enzimas  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilobiosidasa hidrolizan la celobiosa y la xilobiosa para producir glucosa y xilosa. La glucosa y la xilosa formadas de esta manera se trasladan a la segunda membrana semipermeable (11), y a través de la membrana hacia el segundo circuito de circulación externo (4) y el recipiente de fermentación (5). El recipiente de fermentación, que puede mantenerse a 30-33 °C y pH 5,8, contiene el medio de crecimiento requerido y los microorganismos adecuados para la producción de un producto diana, por ejemplo, etanol o butanol. Durante la fermentación, el producto diana puede retirarse del recipiente de fermentación a través de una salida (6). La retirada del producto del recipiente de fermentación (por ejemplo, mediante purga o a través de una membrana permosselectiva, o pervaporación) ayuda a dirigir la reacción hasta su finalización. El circuito de circulación (2) devuelve la biomasa que está parcialmente extraída de celobiosa y xilobiosa hacia el recipiente de sacarificación. La primera y la tercera bomba de circulación (7) y (8) hacen circular los contenidos del primer y segundo circuito externo, respectivamente. La segunda bomba de circulación (9) hace circular el contenido del circuito de circulación de fibras huecas interno (que incluye las enzimas  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilobiosidasa) para otra ronda de reacción. Así, la inhibición por el producto final de la exocelulasa y la xilanasa en el recipiente de sacarificación es mitigada por las enzimas  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilobiosidasa contenidas dentro del circuito de fibras huecas interno, conduciendo toda la reacción hacia su finalización, produciendo un proceso más económico para la conversión de biomasa en su producto diana.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un aparato para procesar una biomasa pretratada, que comprende:
- 5 un recipiente de sacarificación y un recipiente de fermentación separado, en el que dichos recipientes están conectados por dos circuitos de circulación externos y un circuito de circulación de fibras huecas que conecta los dos circuitos de circulación externos, y
- comprende membranas semipermeables, en el que dicho aparato proporciona la sacarificación y la fermentación simultáneas compartimentalizadas de una biomasa pretratada.
- 2.- El aparato de la reivindicación 1, en el que dicho aparato comprende un recipiente de sacarificación (1) que está conectado con un primer circuito de circulación externo (2), y en el que dicho primer circuito de circulación externo (2) es externo a y está conectado con una primera membrana semipermeable (10) de un circuito de circulación de fibras huecas (3); y dicho circuito de circulación de fibras huecas (3) está conectado con un segundo circuito de circulación externo (4) que es externo a y está conectado con una segunda membrana semipermeable (11) del circuito de circulación de fibras huecas (3); y dicho segundo circuito de circulación externo (4) está conectado con un recipiente de fermentación (5) con una salida para un producto diana (6).
- 10 3.- El aparato de la reivindicación 2, que comprende también una serie de bombas de circulación, que incluyen una primera bomba de circulación (7) para el primer circuito de circulación externo (2); una segunda bomba de circulación (8) para el segundo circuito de circulación externo (4); una tercera bomba de circulación (9) para el circuito de circulación de fibras huecas (3).
- 15 4.- El aparato de la reivindicación 1 o 2, en el que las membranas semipermeables están fabricadas con un material seleccionado del grupo que consiste en polisulfona, polisulfona hidroxilada, poliéter sulfona, poliéter sulfona hidroxilada, polisulfona sulfonada, poliéter cetona, poliéter éter cetona, poliimida y poliéter imida.
- 20 5.- El aparato de la reivindicación 1 o 2, en el que las membranas semipermeables tienen una permeabilidad de peso molecular de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 kilodaltons.
- 6.- El aparato de la reivindicación 2, en el que el circuito de circulación de fibras huecas (3) comprende una enzima de sacarificación secuestrada.
- 25 7.- Un método para procesar una biomasa pretratada, que comprende:
- (a) proporcionar el aparato de la reivindicación 3;
- (b) proporcionar una mezcla de biomasa pretratada y un consorcio de enzimas de sacarificación al recipiente de sacarificación (1) de dicho aparato, en el que dicha mezcla produce, mediante sacarificación, componentes de peso molecular alto y bajo;
- 30 (c) proporcionar al menos una enzima secuestrada en el circuito de circulación de fibras huecas (3);
- (d) transportar una cantidad de la mezcla de (b) a través del primer circuito de circulación a través de una primera membrana semipermeable de fibras huecas (10), por lo cual dichos componentes de peso molecular alto de la mezcla de (b) no difunden a través de dicha membrana, y dichos componentes de peso molecular bajo de la mezcla difunden a través de dicha membrana hacia el circuito de circulación de fibras huecas (3);
- 35 (e) hidrolizar los componentes de peso molecular bajo que difunden hacia el circuito de circulación de fibras huecas (3) en (d) mediante dicha al menos una enzima secuestrada en dicho circuito de circulación de fibras huecas, por lo cual se forma un hidrolizado que comprende azúcares fermentables; y
- (f) transportar el hidrolizado que comprende azúcares fermentables a través de una segunda membrana semipermeable (11) hacia un segundo circuito de circulación (4) y hacia un recipiente de fermentación (5);
- 40 en el que los componentes de la biomasa pretratada se hacen circular a través del aparato por medio de bombas de circulación, y en el que la biomasa pretratada se procesa.
- 8.- El método de la reivindicación 7, en el que dicho consorcio de enzimas de sacarificación de (b) comprende enzimas seleccionadas del grupo que consiste en celulasas, xilanasas, glicosidasas, ligninasas y esterases.
- 45 9.- El método de la reivindicación 7, en el que la enzima secuestrada de (c) comprende una enzima seleccionada del grupo que consiste en  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -xilosidasa y xilanasas que pueden hidrolizar oligómeros de xilosa de cadena ramificada solubles.
- 10.- El método de la reivindicación 7, en el que los azúcares fermentables de (e) transportados al recipiente de fermentación en (f) son convertidos por al menos un microorganismo en al menos un producto diana.

11.- El método de la reivindicación 10, en el que el producto diana se retira selectivamente del recipiente de fermentación.

12.- El método de la reivindicación 7, en el que el hidrolizado formado mediante la acción de dicha enzima secuestrada sobre una biomasa se transporta hacia dicho recipiente de fermentación.

5 13.- El método de la reivindicación 7, en el que dicha enzima secuestrada de (c) se recicla múltiples veces.

14.- El método de la reivindicación 7, en el que dicha primera y dicha segunda membrana semipermeable están cada una fabricadas con un material seleccionado del grupo que consiste en polisulfona, polisulfona hidroxilada, poliéter sulfona, poliéter sulfona hidroxilada, polisulfona sulfonada, poliéter cetona, poliéter éter cetona, poliimida y poliéter imida.

10



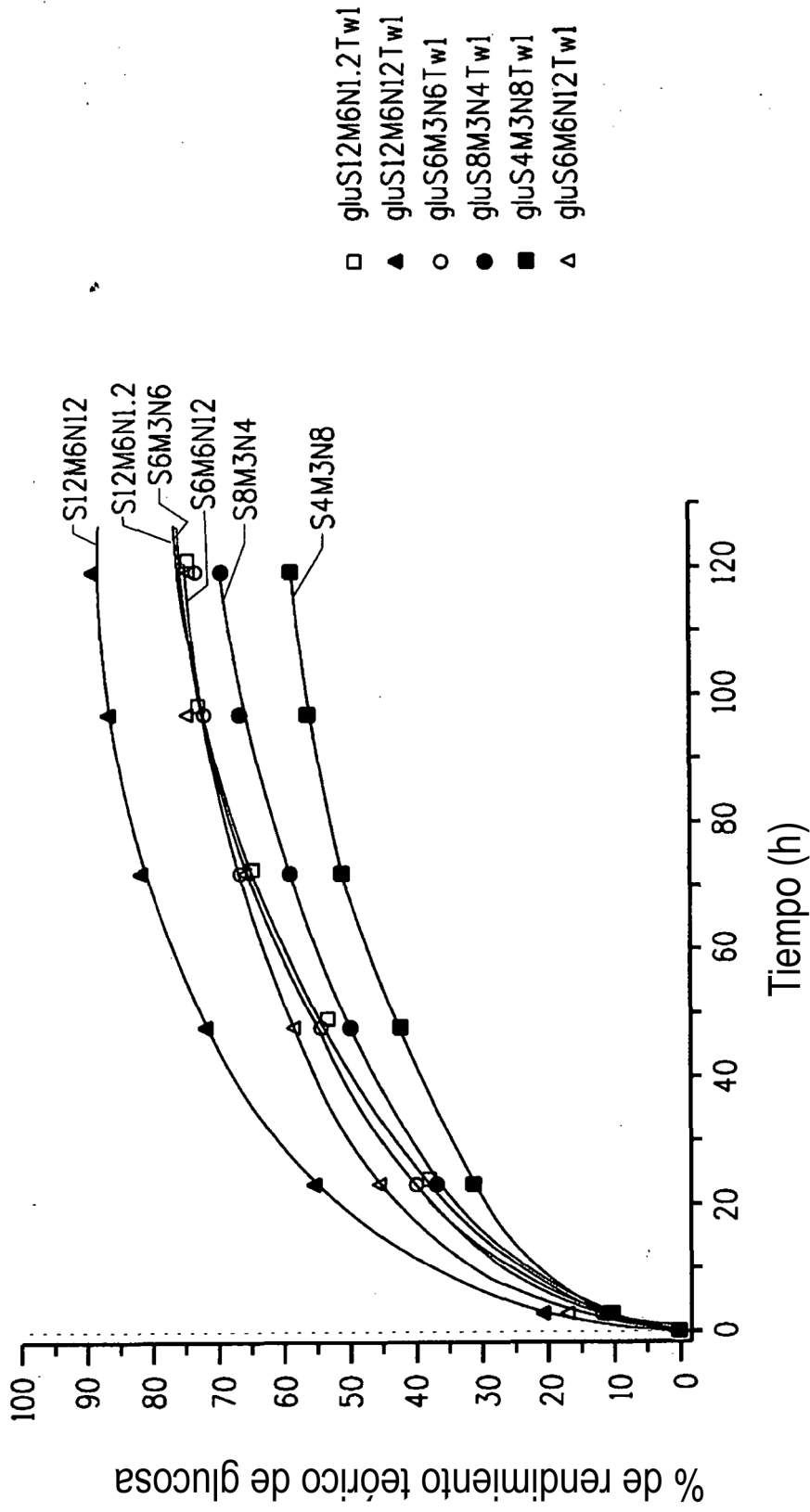


FIG. 1A

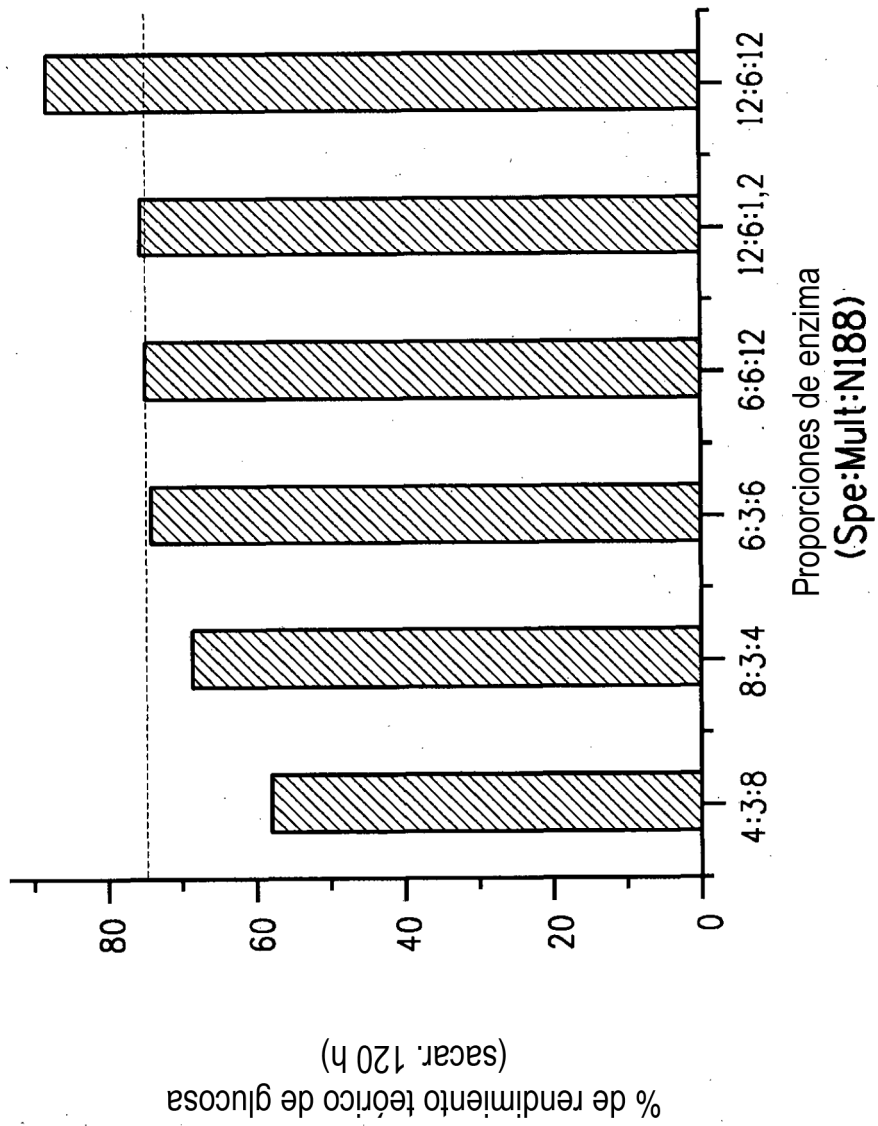


FIG. 1B

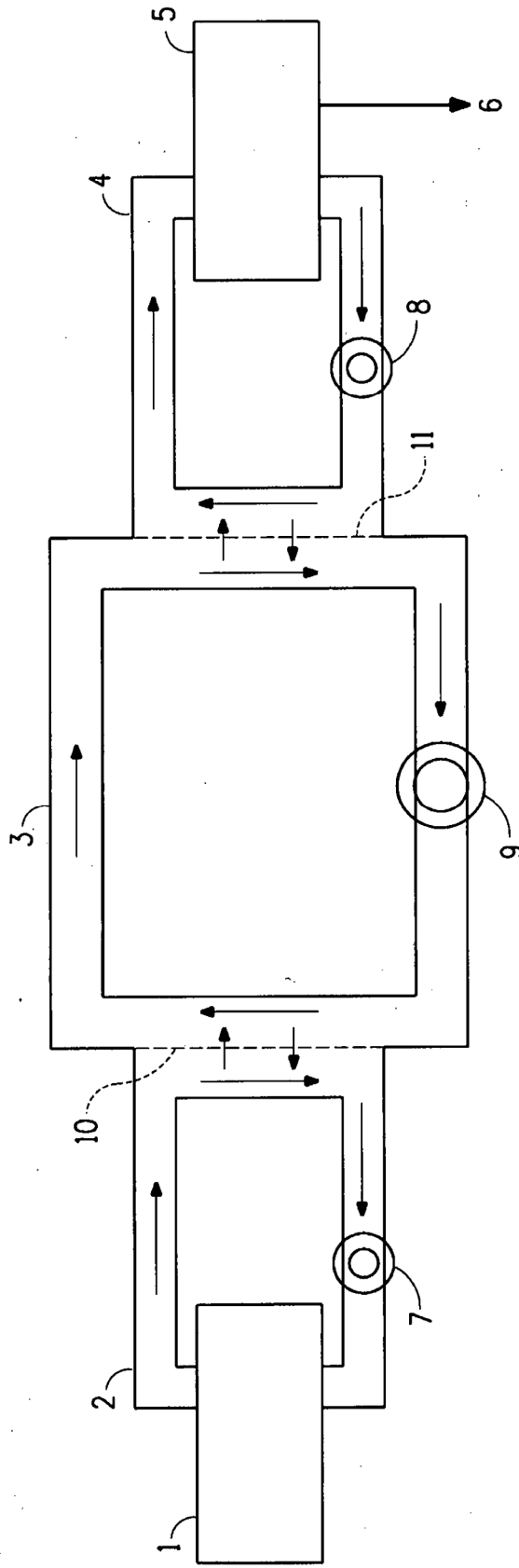


FIG. 2