

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 541**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/10** (2006.01)

**C12P 19/14** (2006.01)

**C12N 9/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.01.2012 E 12700002 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 2658984**

54 Título: **Hidrólisis eficiente de una lignocelulosa con producción integrada de enzimas**

30 Prioridad:

**31.12.2010 EP 10197455**

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

**23.03.2016**

73 Titular/es:

**CLARIANT PRODUKTE (DEUTSCHLAND) GMBH  
(100.0%)  
Brüningstrasse 50  
65929 Frankfurt am Main, DE**

72 Inventor/es:

**RARBACH, MARKUS;  
DRAGOVIC, ZDRAVKO;  
KOHL, ANDREAS;  
GERLACH, JOCHEN;  
BARTUCH, JÖRG y  
BRÜCK, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 564 541 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

Hidrólisis eficiente de una lignocelulosa con producción integrada de enzimas

Campo del invento

5 El presente invento proporciona un procedimiento para la producción biotecnológica de unos compuestos monoméricos, tales como unos azúcares y/o etanol a partir de una carga de alimentación lignocelulósica.

Antecedentes del invento

10 Debido a los recursos limitados de aceites minerales y a las demandas para reducir las emisiones de CO<sub>2</sub>, la industria química está buscando unas secuencias de producción más sostenibles para la fabricación de productos químicos de consumo de primera necesidad, tales como combustibles líquidos y productos químicos de base. Una parte de esa estrategia se enfoca en la conversión de una biomasa lignocelulósica en unos productos químicos o combustibles versátiles, tales como etanol. Una biomasa lignocelulósica contiene una celulosa (~ 25-40 % p/p s.s.), hemicelulosa (~ 15-25 % p/p s.s.) y lignina (~ 15-30 % p/p s.s.) como componentes principales y unas cantidades minoritarias de otros hidratos de carbono, de ceras, de proteínas y de compuestos inorgánicos. La composición específica de cualquier carga de alimentación se puede determinar tal como ha sido descrito por Sluiter y colaboradores, 2008. Entre las formas de una biomasa vegetal, una masa lignocelulósica que se deriva de cualesquiera corrientes residuales forestales y agrícolas, tales como los residuos de madera y la paja de los cereales, es particularmente bien idónea para la conversión de productos químicos de consumo y de combustibles a causa de su disponibilidad, su bajo costo y su producción sana para el medio ambiente. Adicionalmente, los análisis de los ciclos de vida de los procesos de producción, que utilizan unas cargas de alimentación lignocelulósicas, indican unas reducidas emisiones de gases de invernadero cuando se compara con unos procedimientos que se basan en otras cargas de alimentación.

15 Se han descrito diversas opciones de procesos que describen la conversión de una biomasa lignocelulósica en etanol y otros productos químicos básicos (Pejo y colaboradores, 2008). Para realizar estos procesos a una escala industrial es particularmente deseable transferir a los productos finales la máxima cantidad de energía, de carbono y del contenido de masa que están comprendidos en la carga de alimentación renovable. En el momento presente, ninguno de los procesos de conversión que se han descrito ha llevado a realidad esto en su plena extensión.

20 Unas típicas operaciones unitarias para la conversión biotecnológica de un material lignocelulósico (p.ej. una paja) en unos productos que añaden valor (p.ej. etanol) son: un descolado mecánico, un tratamiento previo físico-químico, una hidrólisis enzimática, una fermentación y una recuperación de los productos.

30 Una barrera clave en la realización de la producción celulósica de etanol a escala industrial es la hidrólisis enzimática eficiente en cuanto a los costos de una lignocelulosa previamente tratada con unas altas concentraciones de materiales sólidos.

35 La hidrólisis de la fracción de celulosa ha sido identificada como uno de los obstáculos principales en la conversión de una lignocelulosa en etanol. En el momento presente, el costo y el rendimiento de las enzimas que se requiere para una hidrólisis eficiente de biomasa son los principales “cuellos de botella”.

40 La conversión de materiales lignocelulósicos madereros o agrícolas en unos azúcares y adicionalmente en etanol es un proceso complejo que implica varias etapas que comprenden unas combinaciones secuenciales de un descolado mecánico de una biomasa, un tratamiento hidrotérmico previo, una hidrólisis enzimática o química de la biomasa, una fermentación microbiana de unos materiales hidrolizados de la biomasa y una recuperación de etanol realizada corriente abajo del proceso mediante una destilación o unos procesos equivalentes tecnológicos.

**[Descolado mecánico de una biomasa]**

45 Unas típicas etapas de descolado implican un tratamiento mecánico, tal como de corte, trituración o molienda, de la carga de alimentación, que típicamente requiere un importante consumo de energía y provoca unos importantes costos operativos. Las cargas de alimentación son cortadas o trituradas a la forma de unas partículas que tienen un tamaño situado entre 0,5 mm y 2 cm, lo cual hace posible un proceso uniforme de suspensión dentro de una fase acuosa. El hecho de suspender las partículas de una carga de alimentación dentro de una suspensión espesa bombeable que puede ser transferida a unas operaciones unitarias realizadas corriente abajo requiere grandes cantidades de agua, lo cual se suma adicionalmente a los costos de funcionamiento del proceso (Tolan, 2002).

**[Tratamiento previo]**

5 La conversión de un material lignocelulósico en unos productos, tales como el etanol, comprende con frecuencia una etapa de tratamiento previo físico-químico. El tratamiento previo tiene como finalidad retirar y separar una hemicelulosa con respecto de una celulosa, romper y retirar la envoltura de lignina, disminuir la cristalinidad de la celulosa, aumentar el área de superficie accesible de la celulosa y/o aumentar el tamaño de poros de la celulosa para facilitar la penetración de los agentes de hidrólisis (Tolan, 2002; Wyman y colaboradores, 2005). La etapa de tratamiento previo moviliza preferentemente a la fracción de pentosas de dicha biomasa, al mismo tiempo que aumenta la digestibilidad de la fracción sólida que contiene celulosa (Wyman y colaboradores, 2005).

10 La etapa de tratamiento previo se lleva a cabo con frecuencia usando una suspensión espesa acuosa. Preferiblemente, dicha suspensión espesa tiene un alto contenido de materiales sólidos, conteniendo una masa seca de la carga de alimentación en el orden de 20 a 40 % (p/p). El procedimiento de tratamiento previo comprende con frecuencia un tratamiento hidrotérmico presurizado (a ~ 100-250 °C) de la biomasa en la ausencia o presencia de unos catalizadores de carácter ácido (esto es, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) o básico (esto es, NH<sub>4</sub>OH, NaOH, KOH, cal), que se añaden en unas concentraciones situadas entre 0,1 y 15 % p/p de la carga de alimentación (Kumar y colaboradores, 2009a; Kumar y colaboradores, 2009b; Kumar y colaboradores, 2009c, Wyman y colaboradores, 2005). Los períodos de tiempo de reacción varían entre 10 s (segundos) y 2 h (horas) para proporcionar una transformación eficiente de los componentes de la biomasa como preparación para la hidrólisis y la fermentación de la biomasa.

20 Unas estrategias alternativas de los tratamientos previos comprenden unos tratamientos hidrotérmicos suaves combinados con la utilización de unos disolventes orgánicos o de unos líquidos iónicos para reducir la recalcitrancia de la biomasa y solubilizar a los componentes de lignina y celulosa de la biomasa. Estas últimas opciones de tratamiento previo tienen con frecuencia unos costos más altos y una eficiencia limitada.

25 Chandra y colaboradores (2007) han descrito que un tratamiento previo hidrotérmico en la ausencia o presencia de un ácido diluido es un método preferible para reducir la recalcitrancia de la biomasa a la hidrólisis, puesto que él moviliza a la hemicelulosa y despolimeriza parcialmente a la lignina sin que se produzca ninguna solubilización. Adicionalmente, él da como resultado unas fibras celulósicas amorfas con una gran área de superficie, que es ideal para una hidrólisis enzimática.

30 Dependiendo de la naturaleza de los catalizadores y del perfil de temperaturas que se aplique, un tratamiento previo puede conducir también a la formación de unos agentes inhibidores solubles, que incluyen el ácido acético, un azúcar (p.ej. el furfural, el HMF) y unos productos de degradación de la lignina, que pueden reducir la efectividad de unos procesos de hidrólisis y de fermentación realizados corriente abajo (Margeot y colaboradores, 2009). Para aumentar la efectividad de la hidrólisis y de la fermentación, el material sobrenadante del tratamiento previo necesita ser desechado o puede ser desintoxicado (Tolan, 2002).

**[Hidrólisis de una biomasa previamente tratada]**

35 La descomposición de la suspensión espesa de biomasa previamente tratada en unos azúcares monoméricos fermentables se puede ejecutar mediante una hidrólisis catalizada ya sea por unos ácidos o por unas enzimas. La hidrólisis enzimática es más selectiva y precisa menos intensidad de energía que unas metodologías químicas comparables (tales como la que se basa en los ácidos), proporcionando por lo tanto unas condiciones económicas más favorables de los procesos y potencialmente un rendimiento más alto de etanol durante una fermentación.

40 Los sistemas de enzimas son unas mezclas de más de una actividad enzimática. Unos apropiados sistemas de enzimas son en este sentido unos sistemas de enzimas que convierten a unos azúcares poliméricos, tales como una celulosa y una hemicelulosa, en unos monómeros de hexosas (por ejemplo glucosa) y de pentosas (por ejemplo xilosa) que contienen típicamente actividades de celulasa, hemicelulasa y beta-glucosidasa. Los sistemas de enzimas que contienen actividades de celulasa y beta-glucosidasa se producen con frecuencia en unos cultivos líquidos sumergidos de hongos, p.ej. *Trichoderma sp.* y/o *Aspergillus sp.* Un residuo de biomasa fúngica es separado usualmente desde el caldo de fermentación y desechado. Luego el caldo de fermentación es concentrado, estabilizado y formulado para que sea enviado el resultante producto enzimático.

50 La hidrólisis enzimática de una biomasa se conduce corrientemente en unas condiciones en las que la dosificación total de enzimas comprende 1 - 5 % p/p (10-20 FPU/ g de celulosa) de las cargas de alimentación. Dependiendo del régimen de dosificación y de la composición específica de actividades del sistema de enzimas aplicado, una biomasa es hidrolizada a 40 - 55 °C durante 1 - 7 días. Hasta aproximadamente un 80-90 % p/p de los azúcares poliméricos contenidos en la biomasa se convierten en sus respectivos monómeros.

De acuerdo con Kristensen y colaboradores (2009) la hidrólisis enzimática de una biomasa se conduce con frecuencia con un más bajo contenido de materiales sólidos de 10 - 20 % p/p. Un contenido de materiales sólidos

que está situado por encima de 15 % p/p conduce con frecuencia a unas pérdidas significativas en los rendimientos de azúcares monoméricos. Este efecto es debido a los problemas que están asociados con la mezcladura homogénea de unas suspensiones espesas que tienen un alto contenido de materiales sólidos, conduciendo a una distribución irregular de las enzimas. Además, una acumulación de productos finales, tales como celobiosa y glucosa, que se liberan durante una hidrólisis enzimática puede conducir a una inhibición inherente de las actividades de celulasa y beta-glucosidasa (Xiao y colaboradores, 2004a).

Cardona & Sanchez (2007) describen el uso de un material sobrenadante del tratamiento previo y/o de unos materiales hidrolizados previos de biomásas como un sustrato para la inducción del crecimiento y de las enzimas para la producción de enzimas fúngicas. Howard y colaboradores, (2003) describen el uso directo de un caldo de fermentación líquido agotado procedente de la fermentación fúngica para realizar la hidrólisis. Rao y colaboradores, (1985) indican la utilización de la suspensión espesa entera de fermentación fúngica para una hidrólisis eficiente de sustratos de celulosas. Unos medios artificiales se usaron para la producción de enzimas para hidrólisis, que no permite ajustar a medida de los deseos los sistemas de enzimas para hidrólisis para una específica opción de carga de alimentación y/o de tratamiento previo. Otra desventaja del método descrito por Rao y colaboradores, (1985) consiste en que él está limitado a unas actividades enzimáticas secretadas, puesto que no se ha emprendido nada para facilitar la liberación de enzimas no secretorias o que están fijadas a la superficie de células.

Cuando unos sistemas de enzimas que se derivan de *Trichoderma* se usan para la hidrólisis de biomásas unas actividades de beta-glucosidasa extracelulares se vuelven con frecuencia limitadoras de la velocidad y del rendimiento debido a su actividad específica, que es bastante baja, y a la significativa inhibición de los productos finales por la glucosa que se ha liberado durante el proceso (Xiao y colaboradores, 2004a), Shewale, 1982). Por lo tanto, unas preparaciones de una enzima celulasa o unas mezclas de ellas son suplementadas típicamente con unas actividades alternativas de beta-glucosidasa (BGL), puesto que ellas son producidas por ejemplo por *Aspergillus niger* (Seidle y colaboradores, 2004). Unos regímenes de dosificación patrones para preparaciones de BGL recomiendan la adición de 0,01 a 2 unidades de celobiosa (CBU) por g de celulosa para aumentar la cinética de hidrólisis y los rendimientos de azúcares monoméricos (Chauve y colaboradores, 2010).

Unas estrategias alternativas para afrontar el problema técnico de la hidrólisis de biomásas con más altas concentraciones de materiales sólidos comprenden unos procesos que realizan simultáneamente una hidrólisis enzimática y una fermentación (SSF).

#### [Fermentación de etanol]

La producción industrial de etanol se lleva a cabo tradicionalmente por medio de la levadura *S. cerevisiae*. Unas nuevas cepas microbianas (ya sea levaduras o bacterias) han sido tratadas recientemente por ingeniería genética para utilizar eficientemente también unos azúcares que no son glucosa, que se derivan de la materia prima lignocelulósica. La utilización de pentosas y de todas las hexosas mejora la economía de la producción de etanol.

#### [Recuperación del producto]

El etanol es recuperado típicamente a partir de los medios de fermentación por unos conocidos métodos de destilación y/o rectificación.

#### Problema que se ha de resolver

Las técnicas convencionales para la degradación de una biomasa, o bien son ineficaces o dependen de la adición, que consume tiempo y gastos, de unas enzimas o unas mezclas de enzimas que se han producido por separado, que son apropiadas para la degradación de la biomasa específica. Por lo tanto, el objetivo del presente invento es la creación de un procedimiento mejorado para la degradación de una biomasa, tal como una biomasa lignocelulósica, mediando evitación de estas desventajas.

#### Sumario del invento

El presente invento proporciona un procedimiento para degradar una biomasa lignocelulósica previamente tratada, que comprende las etapas de:

- c) cultivación de un microorganismo que es capaz de producir por lo menos una enzima que tiene una actividad celulolítica y/o hemicelulolítica en un medio de crecimiento, obteniéndose de esta manera una suspensión rica en microorganismos, que comprende dicha por lo menos una enzima;
- d) elaboración del microorganismo y/o de la suspensión rica en microorganismo de la etapa c) por

- (i) un tratamiento mecánico que comprende el sometimiento a una entrada de energía volumétrica de 1-500 kW/m<sup>3</sup>, durante un período de tiempo de 0,1-60 min;

y/o

(ii) un tratamiento mecánico que se selecciona entre un tratamiento con un mezclador, un tratamiento con un homogeneizador y un tratamiento con un molino;

y/o

5 (iii) un tratamiento mecánico que implica bombear la suspensión espesa de fermentación que contiene microorganismos, desde el recipiente de fermentación hasta el recipiente de hidrólisis;

e) sometimiento conjunto de una biomasa lignocelulósica previamente tratada y del producto de la etapa d), a la acción de un reactor para la hidrólisis de una biomasa con el fin de obtener unos azúcares solubles.

10 Opcionalmente, la biomasa lignocelulósica previamente tratada se ha obtenido a partir de una biomasa lignocelulósica mediante un tratamiento físico-químico. Es posible que el medio de crecimiento de la etapa c) comprenda una biomasa lignocelulósica, que preferiblemente ha sido tratada previamente. En una forma de realización particular de lo anterior, el medio de crecimiento final, en el que es cultivado el microorganismo, comprende una parte de una suspensión espesa previamente tratada, de manera tal que el procedimiento para  
15 degradar una biomasa lignocelulósica comprende las etapas de:

a) un tratamiento previo físico-químico de una biomasa lignocelulósica para obtener una suspensión espesa previamente tratada;

b) separación de la suspensión espesa previamente tratada de la etapa a) en dos partes, la parte A y la parte B;

20 c) incorporación de la parte A en un medio de crecimiento en bruto para proporcionar un medio de crecimiento final, y cultivación de por lo menos un microorganismo capaz de producir por lo menos una enzima que tiene una actividad celulolítica y/o hemicelulolítica en el medio de crecimiento final, obteniéndose de esta manera una suspensión rica en microorganismos que comprende dicha por lo menos una enzima;

25 d) elaboración del microorganismo y/o de la suspensión rica en microorganismos de la etapa c), en que dicha elaboración comprende un tratamiento mecánico que es uno o más de los siguientes:

(i) un tratamiento mecánico que comprende el sometimiento a una entrada de energía volumétrica de 1-500 kW/m<sup>3</sup> durante un periodo de tiempo de 0,1-60 min;

y/o

(ii) un tratamiento mecánico que se selecciona entre un tratamiento con un mezclador, un tratamiento con un homogeneizador y un tratamiento con un molino;

y/o

35 (iii) un tratamiento mecánico que implica bombear la suspensión espesa de fermentación que contiene microorganismos, desde el recipiente de fermentación hasta el recipiente de hidrólisis;

e) sometimiento conjunto de la parte B y del producto de la etapa d) a la acción de un reactor para la hidrólisis de una biomasa con el fin de obtener unos azúcares solubles.

40 Los hongos son unos microorganismos preferidos en la etapa c). La elaboración de la etapa d) puede realizarse por medios físicos o mecánicos o químicos o por una combinación de ellos. Los azúcares solubles, obtenidos a partir de la etapa e), pueden ser sometidos opcionalmente a unos procesos de conversión realizados corriente abajo, tales como la producción de etanol. Con esta finalidad, se puede llevar a cabo por ejemplo una separación del tipo de sólido/líquido para obtener una fase líquida rica en azúcares, que comprende los azúcares solubles.

45 El presente invento crea un procedimiento mejorado para la hidrólisis de una biomasa lignocelulósica. El presente invento describe un procedimiento de hidrólisis y fermentación para la producción de etanol a partir de los residuos de una biomasa lignocelulósica (un ejemplo del cual se muestra en la Fig. 1), que integra la utilización eficiente de una producción de enzimas integrada.

50 De acuerdo con el presente invento, la producción de unas enzimas para hidrólisis es integrada dentro del proceso, preferiblemente en estrecha proximidad con relación al procedimiento de hidrólisis. Subsiguientemente, la suspensión espesa de fermentación entera, que contiene unos sistemas de enzimas solubles y una biomasa fúngica, se usa para hidrolizar a unas cargas de alimentación lignocelulósicas a la forma de azúcares componentes. La producción integrada de dichos sistemas de enzimas usando una porción de las cargas de alimentación para el tratamiento previo como un medio de fermentación, proporciona una óptima flexibilidad en las cargas de alimentación y en las opciones de tratamiento previo.

55 En un aspecto clave del invento se encontró, de modo sorprendente, que el hecho de elaborar de manera física o mecánica o química a la biomasa microbiana, en particular cizallar mecánicamente a la biomasa fúngica antes de una hidrólisis con enzimas, dará como resultado una cinética de hidrólisis más rápida y superiores rendimientos de azúcares monoméricos (p.ej. glucosa) en comparación con el hecho de usar el material sobrenadante o el caldo de

fermentación sin elaborar a la biomasa microbiana o el hecho de usar solamente unos componentes solubles de enzimas para hidrólisis, que están contenidos en el material sobrenadante clarificado del caldo de fermentación.

**Descripción detallada del invento**

5 El presente invento cubre un procedimiento mejorado para la degradación de una biomasa, tal como una biomasa lignocelulósica. La biomasa que se somete al procedimiento de acuerdo con el invento puede ser cualquier biomasa como se describirá seguidamente. Se incluye en este concepto una biomasa que comprende grandes partículas o trozos cortos y gruesos, tales como residuos de madera, rastrojos de maíz, bagazo de caña de azúcar, paja de cereales, y de esta manera el descolado mecánico se puede llevar a cabo opcionalmente antes del procedimiento real del presente invento.

10 Alternativamente, la mayoría de las partículas de una biomasa, tal como el 90 % o más de las partículas, son suficientemente pequeñas para poder ser tratadas en una suspensión (suspensión espesa), es decir tienen un diámetro no mayor que 2 cm, preferentemente no mayor que 0,5 cm, más preferiblemente no mayor que 2 mm, de manera tal que no se requiere un descolado mecánico. Sin embargo, en el caso de que se lleve a cabo un descolado mecánico, éste se lleva a cabo de la siguiente manera:

**[Descolado mecánico]**

De acuerdo con una forma preferida de realización del invento, cualquier biomasa lignocelulósica será sometida a un descolado grosero utilizando un aparato tal como un molino de martillos o de bolas o una trituradora o cualquier tipo de, o unas combinaciones de dichos aparatos que sean apropiados para cortar en trozos un residuo de biomasa, en donde el 90 % o más de las partículas en la masa tienen un diámetro no mayor que 2 mm, dando como resultado una biomasa con un pequeño tamaño de partículas.

**[Tratamiento previo]**

La meta del tratamiento previo es una desestabilización y/o una hidrólisis parcial de las estructuras poliméricas de la biomasa (en forma de partículas pequeñas). La biomasa, que ha de ser sometida al tratamiento previo, está típicamente seca, es decir, no está suspendida en una fase líquida. Esta biomasa es luego transferida a un recipiente de reacción usando cualquier sistema de transporte que sea conocido en la técnica, tal como por ejemplo una cinta transportadora o un dispositivo transportador del tipo de un tornillo sinfín. La biomasa en forma de partículas pequeñas es transferida a un recipiente resistente a la presión y luego es sometida a un tratamiento previo.

30 El producto de la etapa de tratamiento previo es denominado sinónimamente "suspensión espesa" o "biomasa tratada previamente" o " biomasa lignocelulósica tratada previamente" o "suspensión espesa de biomasa tratada previamente".

El tratamiento previo puede ser un tratamiento previo químico, es decir, un tratamiento con un ácido o con una base. Preferiblemente, él se puede llevar a cabo en la presencia de un catalizador de carácter ácido, que en un ejemplo no limitativo se puede seleccionar a partir de una gama de elección de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>, HCl, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y SO<sub>2</sub>. En una forma de realización particularmente preferida, el ácido constituye el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El catalizador de carácter ácido se puede aplicar en unas concentraciones de 0-10 % p/p s.s. de una carga de alimentación. En una forma de realización más preferida del invento, la concentración del ácido es ajustada a 0,1-3 % p/p s.s. de una carga de alimentación.

40 El tratamiento previo puede ser alternativamente un tratamiento térmico, tal como una exposición a unas temperaturas de más que 80 °C. Sin embargo, es sumamente preferido que se combinen un tratamiento químico y un tratamiento térmico. En una forma de realización del invento que es incluso más preferida, el tratamiento previo hidrotérmico o bien se puede llevar a cabo a o por encima de la presión atmosférica. El tratamiento previo en la presencia de un catalizador de carácter ácido puede consistir también en el empleo de vapor de agua presurizado caliente que produce unas temperaturas comprendidas entre 120 y 250 °C. En estas condiciones, la biomasa puede ser tratada previamente durante un período de tiempo comprendido entre 0,1 y 60 min antes de realizar una elaboración adicional de la biomasa y una etapa de neutralización opcional, que puede consistir en el empleo de cal o de cualquier otra base, de manera tal que el medio de reacción tenga un pH de 3,5 - 6.

50 En otro aspecto del invento, el descolado y el tratamiento previo se pueden llevar a cabo simultáneamente. En este caso, la biomasa preferentemente seca es transportada al recipiente de tratamiento previo y al mismo tiempo es puesta en contacto con agua. El tratamiento previo hidrotérmico puede ser conectado mecánicamente con la etapa de descolado de la biomasa, de manera tal que ese tratamiento previo se puede llevar a cabo en un modo de funcionamiento o bien discontinuo (por tandas) o continuo. Como un ejemplo no limitativo para un modo de tratamiento previo continuo, el tratamiento previo se podría llevar a cabo en un recipiente cerrado resistente a la presión, que está acoplado con un mecanismo transportador del tipo de un tornillo sinfín.

En otra forma preferida de realización del invento, el tratamiento previo hidrotérmico se lleva a cabo en un modo de explosión causada por vapor de agua, en el que la biomasa es sometida a una inyección de vapor de agua caliente por encima de la presión atmosférica. La presión inducida por el vapor de agua será preferentemente de 1-30 atm (a 120-250 °C), a la que dicha biomasa será expuesta durante 0,1-60 min. Después de esto, la presión es liberada  
 5 repentinamente desde el recipiente de reacción, transfiriendo de esta manera la biomasa previamente tratada a un recipiente colector secundario. Un ejemplo no limitativo de un recipiente de reacción para llevar a cabo el tratamiento de explosión por vapor de agua puede ser un reactor del tipo de cañón de vapor de agua (de Autoclave Engineers, Erie, Pa) que consiste en un reactor provisto de una camisa de vapor de agua, que consiste en un tubo de Hastelloy cerrado por dos válvulas de bola. Unos calentadores eléctricos asociados son colocados sobre todas las superficies  
 10 expuestas, no provistas de camisa, del reactor y son controlados a la temperatura del punto de ajuste del tratamiento previo. Una inyección directa de vapor de agua se usa también para llevar rápidamente a la biomasa hasta la temperatura del tratamiento previo. La presión del vapor de agua se ajusta y controla de manera que se mantenga la deseada temperatura del tratamiento previo. Todos los materiales del tratamiento previo salen a través de un troquel reemplazable situado en el fondo del reactor y son recogidos en un saco de nylon soportado dentro de un depósito de evaporación súbita, de paredes gruesas, provisto de camisa y refrigerado.

Se prefiere que el período de tiempo y la temperatura de la elaboración se seleccionen de una manera tal que unas cantidades máximas de los constituyentes de la biomasa se hidrolicen a la forma de sus monómeros componentes de una manera sumamente eficiente y económica, sin la producción de cantidades significativas de unos productos de degradación tales como furfural.

20 Corrientemente, la fracción de lignina de las cargas de alimentación previamente tratadas estará dentro del intervalo de 10-70 % en peso de lignina/peso de las sustancias secas de una carga de alimentación previamente tratada. El contenido de lignina de la carga de alimentación previamente tratada se puede medir de acuerdo con unos métodos conocidos por los expertos en la especialidad, tales como por ejemplo, pero sin limitarse a, los que se describen en:

[http://www.nrel.gov/biomass/analytical\\_procedures.html](http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html).

25 Después de ejecutar dichas opciones de tratamiento previo, el contenido de materiales sólidos secos de la suspensión espesa resultante de biomasa serán de alrededor de 10-50 % p/p s.s. de la carga de alimentación. La meta principal de una estrategia de tratamiento previo seleccionada es seleccionar el método más eficiente en cuanto a energía y costos que prepare a la biomasa lignocelulósica de una manera tal que se solubilice la mayor parte de la fracción de pentosas y las fibras de celulosa sean accesibles para unos sistemas de enzimas utilizados  
 30 en los procesos de hidrólisis realizados corriente abajo. La transferencia de la biomasa a las operaciones unitarias específicas se ejecutará por bombeo o solamente mediante un flujo por gravedad.

#### **[Procedimiento central del presente invento]**

El presente invento proporciona un procedimiento para degradar una biomasa lignocelulósica previamente tratada, que comprende las etapas de

35 c) cultivación de un microorganismo que es capaz de producir por lo menos una enzima que tiene una actividad celulolítica y/o hemicelulolítica en un medio de crecimiento, obteniéndose de esta manera una suspensión rica en microorganismos que comprende dicha por lo menos una enzima;  
 d) elaboración del microorganismo y/o de la suspensión rica en microorganismos de la etapa c) por

40 (i) un tratamiento mecánico que comprende el sometimiento a una entrada de energía volumétrica de 1-500 kW/m<sup>3</sup> durante un período de tiempo de 0,1-60 min;  
 y/o  
 (ii) un tratamiento mecánico que se selecciona entre un tratamiento con un mezclador, un  
 45 tratamiento con un homogeneizador y un tratamiento con un molino;  
 y/o  
 (iii) un tratamiento mecánico que implica bombear la suspensión espesa de fermentación que contiene microorganismos desde el recipiente de fermentación hasta el recipiente de hidrólisis;

e) sometimiento conjunto de la biomasa lignocelulósica previamente tratada y del producto de la etapa d), a la acción de un reactor para la hidrólisis de la biomasa con el fin de obtener unos azúcares solubles.

50 Se prefiere que, en este procedimiento, la biomasa lignocelulósica previamente tratada se haya obtenido a partir de una biomasa lignocelulósica por un tratamiento físico-químico, tal como el tratamiento previo que más arriba se ha descrito.

En una forma de realización del invento, que es particularmente preferida, el medio de crecimiento de la etapa c) comprende una biomasa lignocelulósica, que preferiblemente ha sido tratada previamente. Diversas actividades

enzimáticas, tales como - pero sin limitarse a - unas actividades celulolíticas y hemicelulolíticas, forman conjuntamente un sistema de enzimas, es decir que los sistemas de enzimas son unas mezclas de más de una actividad enzimática. Más de una estas actividades puede estar contenida, en algunos casos, dentro de la misma molécula de un polipéptido, pero es más típico que un sistema de enzimas comprenda una mezcla de varios, tal como más de dos, esto es más de tres, polipéptidos enzimáticos diferentes, en donde cada uno de éstos tiene por lo menos una actividad deseada, de manera tal que las actividades combinadas formen el sistema de enzimas.

Los procedimientos y los sistemas que se han descrito por este invento se distinguen de las enseñanzas de la técnica anterior. El presente invento proporciona una producción integrada de enzimas, en la que subsiguientemente una biomasa previamente tratada y la suspensión espesa de microorganismos que se ha obtenido en la etapa d) se utilizan para la hidrólisis de dicha biomasa. Se podría mostrar, de manera sorprendente, que la presencia del material sobrenadante del tratamiento previo no afecta a los procesos enzimáticos de hidrólisis o fermentación que se realizan corriente abajo. Además, se mostró de manera sorprendente que el uso de la suspensión espesa de fermentación entera, que comprende un micelio y un material sobrenadante procedentes de la producción de enzimas, manifestaba un rendimiento superior en la hidrólisis de una biomasa en comparación con el sólo material sobrenadante de fermentación obtenido a partir de dicha producción de enzimas, o en comparación con unas preparaciones enzimáticas comerciales comparables. Además, se podría demostrar que el hecho de elaborar por medios físicos y/o mecánicos y/o químicos el microorganismo de acuerdo con la etapa d) proporciona una activación óptima de unos sistemas de enzimas para hidrólisis extra e intracelulares que actúan sinérgicamente en unas operaciones de hidrólisis realizadas corriente abajo para dar como resultado una degradación óptima de unas cargas de alimentación lignocelulósicas a la forma de componentes de azúcares monoméricos, tales como glucosa y xilosa.

#### [Producción de enzimas (etapa c)]

La producción de enzimas de acuerdo con la etapa (c) es caracterizada de la siguiente manera: una suspensión espesa de una biomasa lignocelulósica previamente tratada se inocula, en una primera etapa, con un microorganismo, que puede ser un microorganismo del tipo de una bacteria, una arquea, una levadura o un hongo, que es capaz de producir unas actividades enzimáticas celulolíticas y hemicelulolíticas. Una actividad celulolítica es una actividad capaz de degradar, por ejemplo hidrolizar, a una celulosa, de manera tal que sea capaz de hidrolizar a algunos o a todos los enlaces glucosídicos allí presentes. Una actividad hemicelulolítica es una actividad capaz de degradar, por ejemplo hidrolizar, a una hemicelulosa de manera tal que sea capaz de hidrolizar a algunos o a todos los enlaces glucosídicos allí presentes. Una hemicelulosa incluye unos bloques de construcción tales como los de xilano, glucuronoxilano, arabinoxilano, glucomanano y xiloglucano.

En un ejemplo no limitativo, dichas actividades enzimáticas comprenden las de exo- y endocelulasas (esto es, las de celobiohidrolasa (CBH) I, II, endoglucanasa (EG) I-IV, beta-glucosidasa (BGL)), las de exo- y endohemicelulasas (esto es, las de xilanasa, xilosidasa, xilobiasa, arabinasa, arabinofucosidasa, mananasa, manosidasa, galactasa y galactosidasa) y las de estererasas (Howard y colaboradores, 2003, Lynd y colaboradores, 2002). Por lo tanto, el invento comprende una forma preferida de realización en la que la por lo menos una enzima con actividad celulolítica y/o hemicelulolítica tiene una o más actividades seleccionadas entre el conjunto que se compone de: las de celobiohidrolasa del tipo I o del tipo II (CBH I o CBH II), de endoglucanasa del tipo I, II, III o IV (EGI, EGII, EGIII, EGIV), de beta-glucosidasa (BGL), de esterasa, de exo-hemicelulasa y de endo-hemicelulasa. Es incluso más preferido que la exo hemicelulasa y la endo-hemicelulasa se seleccionen preferentemente entre xilanasa, xilosidasa, xilobiasa, arabinasa, arabinofucosidasa, mananasa, manosidasa, galactasa y galactosidasa.

Unos ejemplos no limitativos de bacterias que producen dichas actividades enzimáticas y que por lo tanto se pueden usar preferente de acuerdo con el presente invento, comprenden *Actinobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Burkholdria* sp., *Clostridia* sp., *Caldicellulosiruptor* sp., *Cellvibrio* sp., *Halobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Paenibacillus* sp., *Xanthomonas* sp. y *Thermobifida* sp. (Howard y colaboradores, 2003, Maki y colaboradores 2009).

Unos ejemplos no limitativos de arqueas que producen dichas actividades enzimáticas y que por lo tanto se pueden usar preferentemente de acuerdo con el presente invento comprenden *Pyrochoccus* sp., *Sulphobolus* sp., *Staphylothermus* sp. y *Thermococcus* sp., (Maki y colaboradores, 2009).

Los hongos son generalmente los microorganismos más preferidos para el presente invento. El procedimiento de acuerdo con este invento se puede llevar a cabo preferentemente de tal manera que el microorganismo sea un hongo, que se selecciona preferentemente entre el conjunto que se compone de: *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Talaromyces* sp. Unos ejemplos no limitativos de hongos que producen dichas actividades enzimáticas y que por lo tanto se pueden usar preferentemente de acuerdo con el presente invento, comprenden *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp., *Chrysosporium* sp., *Fusarium* sp., *Humicola* sp., *Orpinomyces* sp., *Pencillium* sp., *Phanerochaete* sp., *Piromyces* sp., *Talaromyces* sp., *Trametes* sp. y *Trichoderma* sp. o sus respectivos holomorfos (Howard y colaboradores, 2003). Es especialmente preferido un hongo que se selecciona entre *Trichoderma* sp. y *Talaromyces* sp.

La elección del organismo que produce enzimas se puede determinar por la composición de hidratos de carbono de la suspensión espesa de una carga de alimentación previamente tratada, por la cantidad de las actividades enzimáticas que se han producido por los organismos particulares y por las características biofísicas que abarcan unos parámetros tales como la estabilidad de la temperatura, la selectividad para un sustrato, la actividad específica y la tolerancia a inhibidores.

Para la inducción de la producción de enzimas, dichos micro-organismos serán incubados a una conveniente temperatura de crecimiento, que puede variar típicamente entre 14 y 102 °C, preferiblemente entre 28 y 102 °C, dependiendo del microorganismo que se use. El período de tiempo de incubación hasta el comienzo de la producción de enzimas puede variar significativamente con el tipo del microorganismo (Lynd y colaboradores, 2002) y con la carga de alimentación previamente tratada, pero se puede ensayar con unos métodos descritos por Xiao y colaboradores (2004b) or Bobey y Ederer (1981).

En un aspecto preferido del presente invento, la producción de enzimas se ejecuta con una cepa hiperproductora de celulasa del hongo filamentosos *Trichoderma reesei* (anamorfo: *Hypocrea jecornia*). Un ejemplo no limitativo de dicho organismo es la cepa Rut-C30 de *Trichoderma reesei* (Lynd y colaboradores, 2002, Szijarto y colaboradores, 2004). Todavía en otro aspecto preferido del invento, los sistemas de enzimas fúngicas se producen en una biomasa previamente tratada como la única fuente de carbono significativa. Esto se realiza de manera preferible con unos hongos tales como el *Trichoderma reesei*. Los cultivos iniciadores de *Trichoderma reesei* se pueden dejar crecer en una suspensión espesa de una carga de alimentación previamente tratada hasta que comience la producción de esporas, lo cual puede ser cuantificado usando unos métodos tales como unas mediciones espectrofotométricas a DO<sub>600</sub> nm. Luego el hongo se deja crecer durante 3 - 7 días mediando mezcladura constante a 50-250 rpm y en unas condiciones controladas de pH, temperatura así como de oxígeno. A lo largo de la fermentación es crítico el hecho de que el hongo es incubado a 30 °C y a un pH de ~5 para proporcionar una cantidad máxima de enzima y de biomasa. En el día 5 se ejecuta típicamente la producción máxima de biomasa y de enzima, siendo posible un tratamiento ulterior.

El medio de crecimiento comprende típicamente una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, opcionalmente unas vitaminas y unos minerales trazas. La fuente de carbono es suministrada a razón de 1-30 % p/v, más preferiblemente de 1-10 % p/v e incluso más preferiblemente de 1-8 % p/v al medio de cultivación. Las fuentes de carbono pueden comprender una biomasa lignocelulósica natural o previamente tratada, tal como una que está constituida a base de madera, paja de cereal, bagazo, hierba de pasto y celulosa, y una pasta papelera en bruto obtenida a partir de la producción de pasta papelera y de papel. Unas fuentes de carbono alternativas pueden comprender una celulosa purificada, una pasta papelera, un suero de leche, unas melazas o unos azúcares tales como glucosa y lactosa. Se puede usar una combinación de fuentes de carbono, en la que una fuente de carbono es el producto de la etapa b) o un equivalente del mismo, mientras que está presente otra fuente de carbono, tal como la que se ha descrito anteriormente en este párrafo. La fuente de nitrógeno es suministrada a razón de 0,1-10 % p/v, más preferiblemente de 0,1-8 % p/v e incluso más preferiblemente de 0,1-4 % p/v al medio de cultivación. Las fuentes de nitrógeno comprenden un expulsor de soja, un líquido de maceración de maíz, un extracto de levadura, una harina verde (hierba molida), un salvado de trigo, un grano agotado de destilería y unas sales de amonio inorgánicas. Las vitaminas y los minerales trazas se pueden suministrar a razón de 0-5 % p/v, más preferiblemente de 0,001-1 % p/v, al medio de cultivación. Los minerales trazas suministrados al medio de cultivación pueden comprender unas sales de Fe, Mn, Zn y Co, mientras que las vitaminas añadidas al medio de cultivación pueden comprender unos complejos de vitamina B, biotina o una coalbumina.

Las composiciones exactas de los medios de cultivación y las condiciones físicas exactas para obtener un crecimiento efectivo de los productores de la enzima celulasa son conocidas por los expertos en la especialidad. La selección final del medio de cultivación dependerá del microorganismo que se use.

En una forma preferida de realización del invento, tanto la biomasa de microorganismo(s) como el medio de fermentación agotado que contiene una biomasa lignocelulósica residual y la mayoría de las actividades enzimáticas celulares y hemicelulasas, se usarán en la etapa de elaboración de biomasa realizada corriente abajo.

En el presente invento se encontró de manera sorprendente que unas proporciones significativas de las actividades de celulosas y hemicelulasas son retenidas en la biomasa de una carga de alimentación previamente tratada residual y en la biomasa fúngica producida.

De manera incluso más interesante, se podría demostrar que la hidrólisis de una biomasa era más eficiente cuando se empleaba la suspensión de fermentación entera que contenía enzimas (el material sobrenadante y el micelio / la biomasa) en comparación con un experimentos de hidrólisis que emplean solamente un material sobrenadante de fermentación que contiene enzimas o unas preparaciones de enzimas comerciales.

Esto se puede ejecutar opcionalmente disociando en dos corrientes a la suspensión espesa de biomasa, que es obtenible mediante el tratamiento previo, de manera tal que una parte sea sometida a la etapa c), mientras que otra

parte sea sometida directamente a la etapa e). Los investigadores han encontrado sorprendentemente que una parte de la biomasa previamente tratada puede ser sometida a la acción del medio de crecimiento del microorganismo. Se entiende que el microorganismo es, por lo tanto, capaz de producir unas enzimas apropiadas para la degradación de la biomasa previamente tratada. Por lo tanto, el presente invento crea también, dentro de una forma preferida de realización un procedimiento para degradar a una biomasa celulósica que comprende las etapas de:

a) un tratamiento previo físico-químico de una biomasa lignocelulósica para obtener una suspensión espesa previamente tratada;

b) separación de la suspensión espesa previamente tratada de la etapa a) en dos partes, la parte A y la parte B;

c) incorporación de la parte A en un medio de crecimiento en bruto para proporcionar un medio de crecimiento final, y cultivación de por lo menos un microorganismo capaz de producir por lo menos una enzima que tiene una actividad celulolítica y/o hemicelulolítica, obteniéndose de esta manera una suspensión rica en microorganismos que comprende dicha por lo menos una enzima;

d) elaboración del microorganismo y/o de la suspensión rica en microorganismos de la etapa c), en que dicha elaboración comprende un tratamiento mecánico que es uno o más de los siguientes:

(i) un tratamiento mecánico que comprende el sometimiento a una entrada de energía volumétrica de 1-500 kW/m<sup>3</sup>, durante un período de tiempo de 0,1-60 min;

y/o

(ii) un tratamiento mecánico que se selecciona entre un tratamiento con un mezclador, un tratamiento con un homogeneizador y un tratamiento con un molino;

y/o

(iii) un tratamiento mecánico que implica bombear la suspensión espesa de fermentación que contiene microorganismos desde el recipiente de fermentación al recipiente de hidrólisis;

e) sometimiento conjunto de la parte B y del producto de la etapa d) a la acción de un reactor para la hidrólisis de biomazas con el fin de obtener unos azúcares solubles.

Un esquema de flujos del procedimiento se presenta en la Figura 1.

En una forma preferida de realización de este procedimiento, la parte A es la parte minoritaria de la suspensión espesa previamente tratada que se ha obtenido en la etapa A, de manera preferible de 1 a 20 % (en peso de materiales sólidos secos), más preferiblemente de 1 a 5 % (en peso de materiales sólidos secos) y de manera sumamente preferible de 1 a 5 % (en peso de materiales sólidos secos). Los materiales sólidos son unas partículas rígidas, es decir unas partículas que no son solubilizadas en la fase líquida en las condiciones del procedimiento que se usan.

#### **[Elaboración del microorganismo (etapa (d))]**

Se encontró de modo sorprendente que la elaboración por medios físicos y/o mecánicos y/o químicos de la suspensión espesa de sedimentación en la etapa d) antes de la etapa de hidrólisis e) y el sometimiento del producto elaborado a la etapa e) aumentarán la cinética de hidrólisis de la biomasa y conducirán a unos rendimientos más altos de azúcares solubles (Figura 2). Como un rendimiento más alto de azúcar soluble se entiende en el presente contexto que el rendimiento, que se puede obtener después de 72 h en las condiciones que se describirán en el Ejemplo 4, es más alto cuando el producto de la etapa c) es sometido a la etapa d) que cuando se omite la etapa d). La técnica anterior (Rao y colaboradores, 1985) no es capaz de divulgar dicho tratamiento. Unos experimentos testigos, en los que una preparación de celulosa comercial (Celluclast, de Novozymes, Dinamarca) / BGL (Novo 188, de Novozymes, Dinamarca) se trató mecánicamente antes de la hidrólisis de lignocelulosas no da como resultado un aumento de la cinética de hidrólisis de lignocelulosas o un rendimiento más alto de azúcares solubles.

En una forma de realización, el microorganismo obtenido por la etapa de cultivación c) es aislado después de esta etapa de cultivación, tal como por ejemplo por centrifugación o por otros procesos bien conocidos en la especialidad. En esta forma de realización, el microorganismo aislado es sometido a la etapa d). Sin embargo en una forma de realización alternativa y más preferida del invento, la suspensión entera que contiene microorganismos, es decir el producto de cultivación de (c) que comprende el microorganismo y el medio de crecimiento, es elaborado física y/o mecánica y/o químicamente antes de una hidrólisis de la biomasa. La utilización de la suspensión entera, que contiene microorganismos, y no solamente la del material sobrenadante de la suspensión que contiene microorganismos para realizar una hidrólisis de la biomasa permite una dosificación más eficiente de la enzima en operaciones de hidrólisis de la biomasa realizadas corriente abajo, como los investigadores de este invento han encontrado de modo sorprendente. El tratamiento puede ser físico, químico o una combinación de éstos tipos.

En una práctica preferida del invento, la suspensión que contiene microorganismos es sometida a una agitación con unas velocidades aumentadas del rotor en el recipiente de fermentación. En todavía otra práctica preferida del

invento, la suspensión que contiene microorganismos es bombeada y cizallada en un tubo de transferencia que contiene un ultrathorax. Una cualquiera de estas formas de realización puede ser particularmente útil si el microorganismo es un hongo, de manera tal que el tratamiento comprende un tratamiento del micelio fúngico.

5 El tratamiento mecánico se puede llevar a cabo de la siguiente manera: Él puede comprender el sometiendo del microorganismo o de la suspensión de microorganismos a una entrada de energía volumétrica (también denominada "entrada de energía") de 1 - 500 kW/m<sup>3</sup>, más preferiblemente de 1 - 200 kW/m<sup>3</sup>, incluso más preferiblemente de 1 - 100 kW/m<sup>3</sup>, preferiblemente durante un período de tiempo de 0,1 - 60 min, más preferiblemente de 1 - 30 min, e incluso más preferiblemente de 1 - 10 min.

10 El tratamiento mecánico se puede seleccionar entre un tratamiento con un mezclador, un tratamiento con un homogeneizador y un tratamiento con un molino. Dicho tratamiento mecánico puede añadir un esfuerzo de cizalladura mecánica o una fuerza de trituración al microorganismo y puede romper o destruir a las membranas celulares y/o a las paredes celulares; o al micelio fúngico o unas partes del mismo. Más de uno de dichos tratamientos se puede combinar con cada uno de los otros. La ruptura o destrucción de las estructuras celulares, tales como las membranas celulares y/o las paredes celulares, o del micelio fúngico o de partes del mismo, se puede ensayar por unos métodos bien conocidos por la persona experta en la especialidad, tal como un microscopio.

En una práctica preferida de este invento, la suspensión que contiene microorganismos es sometida a tratamiento, es decir es cizallada aumentando la velocidad del elemento impulsor al final del ciclo de producción de enzimas por fermentación.

20 La efectividad del proceso mecánico es controlada por el gradiente relativo de energía aplicado a la biomasa de microorganismos en un recipiente de reacción.

25 Alternativamente, el esfuerzo de cizalladura, que conduce a un aumento en la actividad de la enzima para hidrólisis, puede ser inducido bombeando la suspensión espesa de fermentación que contiene microorganismos desde la fermentación hasta el recipiente de hidrólisis. La suspensión que contiene microorganismos puede ser bombeada y sometida a cizalladura en un tubo de transferencia. El microorganismo puede ser cizallado de esta manera. En términos de velocidades de cizalladura, la suspensión que contiene microorganismos es sometida a 1.600 - 50.000 l/s, más preferiblemente a 1.600 - 27.000 l/s, e incluso más preferiblemente a 1.600 - 10.000 l/s. Este tratamiento es apropiado para inducir un aumento en la actividad de la enzima para hidrólisis. Este tratamiento se puede realizar preferiblemente durante un período de tiempo de 0,01 a 100 s.

30 Alternativamente, la suspensión que contiene microorganismos puede ser sometida a una homogenización a alta presión o a un tratamiento ultrasónico o a otros dispositivos conocidos por una persona experta en la especialidad para inducir un alto esfuerzo de cizalladura, tales como un Ultraturax. En una práctica preferida del invento, la suspensión que contiene microorganismos es sometida a una agitación a velocidades aumentadas del rotor en el recipiente de fermentación. En todavía otra práctica preferida del invento, la suspensión que contiene microorganismos es bombeada en tubo de transferencia. El microorganismo puede ser cizallado de esta manera. En términos de velocidades de cizalladura, la suspensión que contiene microorganismos es sometida a 1.600 - 50.000 l/s, más preferiblemente a 1.600 - 27.000 l/s, e incluso más preferiblemente a 1.600 - 10.000 l/s para inducir un aumento en la actividad de la enzima para hidrólisis durante un período de tiempo de 0,01 a 100 s.

40 El lector entenderá que el invento comprende cualquier combinación específica de los valores que aquí se divulgan. Por ejemplo, ha de entenderse que cualquier tasa de cizalladura específica o intervalo de tasa de cizalladura que aquí se describe, es divulgada específicamente en combinación con cualquier período de tiempo específico para llevar a cabo dicho tratamiento (en min o s) que aquí se divulgue. También cualquier entrada de energía volumétrica o intervalo de entrada de energía volumétrica que aquí se divulga ha de entenderse como divulgado específicamente en combinación con cualquier período de tiempo (en min o s) específico para aplicar dicha entrada que aquí se divulga. También son una parte constituyente del invento aquellas formas de realización en las que el producto de la entrada de energía volumétrica (en kW/m<sup>3</sup>) por el tiempo (en min) es equivalente a cualquier producto de estos parámetros que se divulgue aquí. También son una parte constituyente del invento aquellas formas de realización en las que el producto de la tasa de cizalladura (en 1/s) por el tiempo (en s) es equivalente a cualquier de estos parámetros que se divulgue aquí. En una forma particular de realización del invento las metodologías de lisis mecánica y química son combinadas, lo cual aumenta la efectividad de cualquiera de los métodos.

55 En una práctica particular del invento, el microorganismo o la suspensión que contiene microorganismos se mezcla con un agente tensioactivo, de manera sumamente preferiblemente Triton X-100 en unas concentraciones de 0,01-2 % p/p s.s. de micelio, más preferiblemente de 0,01-1 % p/p s.s. de micelio, e incluso más preferiblemente de 0,01-0,5 % p/p s.s. de micelio. Subsiguientemente, la mezcla de microorganismos y del agente tensioactivo es sometida preferentemente a un proceso de cizalladura que más arriba se ha descrito, que por ejemplo es particularmente útil si el microorganismo es un hongo, de manera tal que su micelio puede ser cizallado. (Los agentes tensioactivos o detergentes no constituyen una clase particularmente limitada de compuestos usualmente

orgánicos que típicamente contienen tanto unos grupos hidrófobos como unos grupos hidrófilos, y por lo tanto tienen un carácter anfífilo).

5 En otra práctica preferida del invento, el microorganismo o la suspensión que contiene microorganismos se mezcla con un disolvente orgánico, que comprende ya sea aminas, o bien éteres o alcoholes, tales como el etanol en unas concentraciones de 1-30 % p/v, más preferiblemente de 1-20 % p/v, e incluso más preferiblemente de 1-5 % p/v. Subsiguientemente, el microorganismo o la mezcla de agentes tensioactivos se somete a un proceso de cizalladura de elaboración, más arriba descrito, que es por ejemplo particularmente útil si el microorganismo es un hongo, de manera tal que su micelio pueda ser cizallado.

10 La entrada de energía específica dentro de la suspensión espesa se puede ejecutar ya sea aumentando la velocidad del elemento impulsor del recipiente de fermentación, bombeando la suspensión espesa de fermentación desde la raíz hasta el recipiente diana y homogeneizando a alta presión en un específico recipiente de reacción. La adición de unos agentes químicos, tales como unas sales, unos disolventes orgánicos, unas enzimas y unos agentes tensioactivos, reduce de manera significativa la entrada de energía necesaria para obtener una satisfactoria lisis de los micelios y la liberación de componentes de enzimas intracelulares.

15 En otro aspecto del invento, el tratamiento mecánico se ejecuta mediante una lisis química, que se puede ejecutar por medio de la adición de unas sales inorgánicas (osmolisis), unas enzimas, unos disolventes orgánicos y/o unos agentes tensioactivos. En un aspecto particular del invento, la lisis de células del micelio se induce por adición de 0,01-10 M, más preferiblemente de 0,01-5 M, e incluso más preferiblemente de 0,1-1 M, de unas sales inorgánicas tales como NaCl, KCl, u otros agentes de esfuerzo químico tales como  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ ,  $\text{CH}_6\text{ClN}_3$ .

20 En otro aspecto particular del invento, el reactivo para la lisis química puede comprender un agente tensioactivo cargado o no cargado eléctricamente (Biotechnol Lett. (1980) 2, páginas 43-48), tal como Tween-80 (no cargado), Triton X-100 (no cargado), SDS (cargado negativamente) o CTAB (cargado positivamente), que se emplean en unas concentraciones de 0,1-3 % p/p s.s. de una biomasa microbiana, más preferiblemente 0,1-1 % p/p s.s. de un micelio e incluso más preferiblemente a 0,5-1 % p/p s.s. de biomasa microbiana, respectivamente.

25 En otro aspecto del invento, el reactivo para la lisis química puede comprender una enzima o un sistema de enzimas tales como quitinasa (Plant Pathol. (200) 49, páginas 573-589), que se aplican en unas concentraciones de 0,01-10 % p/p s.s. de una biomasa microbiana, más preferiblemente de 0,01-1 % p/p s.s. de un micelio e incluso más preferiblemente a unas concentraciones de 0,01-01% p/p s.s. de un micelio respectivamente, seguidos por una incubación a 20-70 °C durante 0,1 - 72 h, respectivamente.

30 En una práctica particular del invento, las metodologías de lisis mecánica y química son combinadas, lo que se cree que aumenta la efectividad de cualquiera de los métodos.

35 En una práctica particular del invento, el microorganismo es mezclado con un agente tensioactivo, de manera sumamente preferible Triton X-100, en unas concentraciones de 0,01-5 % p/p s.s. de biomasa de microorganismos, más preferiblemente de 0,01-1 % p/p s.s. de biomasa con microorganismos. Subsiguientemente la mezcla de microorganismos y del agente tensioactivo es sometida a una entrada de energía volumétrica de 1 - 500 kW/m<sup>3</sup>, más preferiblemente de 1 - 200 kW/m<sup>3</sup> durante 0,1 - 60 min para conseguir un tratamiento efectivo.

40 En otra práctica preferida del invento, la biomasa con microorganismos se mezcla con un disolvente orgánico que comprende ya sea unas aminas, o bien unos éteres o alcoholes, tales como el etanol en unas concentraciones de 5-40 % p/v, más preferiblemente de 20-40 % p/v e incluso más preferiblemente de 30-35 % p/v. Subsiguientemente, la mezcla de microorganismos y un disolvente orgánico es sometida a una entrada de energía volumétrica de 1 - 500 kW/m<sup>3</sup>, más preferiblemente de 1 - 200 kW/m<sup>3</sup> durante 0,1 - 60 min para conseguir un tratamiento efectivo.

45 La entrada de energía específica dentro de la suspensión espesa se puede ejecutar ya sea aumentando la velocidad del elemento impulsor del recipiente de fermentación, bombeando la suspensión espesa de fermentación desde la raíz hasta el recipiente diana y por una homogeneización a alta presión en un recipiente de reacción específico. La adición de unos agentes químicos tales como unas sales, unos disolventes orgánicos, unas enzimas y unos agentes tensioactivos reduce significativamente la entrada de energía necesaria para obtener una satisfactoria lisis de los micelios y una liberación de componentes intracelulares de las enzimas.

50 Se ha encontrado, inesperadamente, que la liberación de actividades enzimáticas intracelulares a partir de un organismo productor de enzimas puede aumentar el rendimiento de hidrólisis del sistema de enzimas empleado de manera tal que se pueden emplear unos más bajos regímenes de dosificación de celulasa y de beta-glucosidasa.

Los datos de acuerdo con este invento muestran de manera sorprendente que una biomasa miceliana cizallada o elaborada física o mecánica o químicamente de otro modo distinto antes de la hidrólisis, liberará tanta cantidad de beta-glucosidasa (BGL) como la que en caso contrario tendría que ser suministrada extrínsecamente para obtener el

mismo rendimiento de hidrólisis. La cizalladura y la adición extrínseca de actividades de BGI tiene un efecto aditivo que proporciona unos más altos rendimientos de azúcares y una cinética de sacarificación aumentada.

5 La liberación de actividades enzimáticas unidas a un micelio permite también una reducción en la dosificación de la enzima celulasa sin comprometer a la cinética de hidrólisis ni a los rendimientos de azúcares solubles procedentes de una biomasa lignocelulósica. En resumen, las enseñanzas que aquí se divulgan demuestran que la utilización de una carga de alimentación previamente tratada como el único medio de crecimiento permite la producción de unos sistemas de enzimas que están muy bien adaptados para descomponer a este material lignocelulósico específico. Por lo tanto, la producción de enzimas in situ, tal como se divulga en este invento, permite la máxima flexibilidad en la elección de unas cargas de alimentación lignocelulósicas y de unas opciones de tratamiento previo. Además, la  
10 utilización de la entera suspensión espesa de fermentación agotada para unas operaciones de hidrólisis de la biomasa realizadas corriente abajo permite un régimen de dosificación más eficiente, que aumenta el rendimiento de productos y las eficiencias en cuanto a costos de las enzimas.

15 Los regímenes de dosificación de enzimas en unas operaciones de hidrólisis pueden ser reducidos también por la liberación de actividades enzimáticas intracelulares a partir de organismos productores de enzimas, reforzando el rendimiento de sistemas de enzimas extracelulares.

Si se usa un hongo para la producción de enzimas, la meta de la etapa de elaboración d) es la rotura de la totalidad o de algunas partes del hongo tales como el micelio fúngico.

#### **[Hidrólisis de una biomasa (etapa e)]**

20 Para ejecutar una descomposición de una biomasa lignocelulósica previamente tratada en unos azúcares hexosas (p.ej. glucosa) y pentosas (p.ej. xilosa) monoméricos fermentables, la suspensión espesa de fermentación agotada (el material sobrenadante y el micelio) procedente de la producción integrada de enzimas, se añade conjuntamente con una biomasa previamente tratada a un reactor para la hidrólisis de la biomasa. Tal como se conoce corrientemente, las hexosas son unos monosacáridos con seis átomos de carbono y las pentosas son unos monosacáridos con cinco átomos de carbono.

25 En un ejemplo no limitativo una suspensión espesa de biomasa previamente tratada, que tiene un contenido de materiales sólidos hasta de 30 %, preferiblemente de 15 - 30 % (p/p) puede preferiblemente ser hidrolizada en un modo discontinuo.

30 Es evidente para los expertos en la especialidad que la dosificación del sistema de enzimas para hidrólisis, la temperatura de incubación, el período de tiempo de permanencia, los regímenes de alimentación opcionales para la hidrólisis de la biomasa y la eficiencia de hidrólisis están inherentemente vinculados con el sistema particular de enzimas y de la carga de alimentación que se empleen.

En una forma particular de realización del invento, la hidrólisis de la suspensión espesa de biomasa tratada previamente se ejecutará mediante unos sistemas de enzimas producidos por dicho hongo filamentoso *Trichoderma reesei*.

35 En este caso, la suspensión espesa de una carga de alimentación previamente tratada se mezcla con una suspensión espesa de fermentación agotada y opcionalmente cizallada, que contiene los sistemas de enzimas hidrolíticas. El preferido régimen de dosificación para cargas de alimentación lignocelulósicas en estas condiciones varía entre 0,1-1 % peso de las enzimas/peso de la carga de alimentación o 1-20 FPU/g de celulosa contenida en la carga de alimentación (Zu y colaboradores, 2009).

40 La hidrólisis de una biomasa previamente tratada se ejecuta a unas temperaturas comprendidas entre 45 - 55 °C con unos períodos de tiempo de permanencia comprendidos entre 18 y 72 h. En una forma de realización particularmente preferida de este invento, una hidrólisis discontinua de una paja de cereal previamente tratada se ejecuta con unas dosificaciones de enzimas de 0,25-0,8 % peso de enzimas/s.s de la carga de alimentación previamente tratada con o sin una suplementación adicional con beta-glucosidasa y a una temperatura de 50-53 °C  
45 en el transcurso de 72 h.

Sorprendentemente, incluso con unos bajos regímenes de dosificación de enzimas se podrían obtener unos rendimientos de hidrólisis por encima de 50 % p/p con respecto a los azúcares totales contenidos en dicha carga de alimentación. Estos altos rendimientos de azúcares con unos bajos regímenes de dosificación de enzimas se podrían conseguir debido a la producción integrada de unos sistemas de enzimas eficientes, tal como se ha descrito con anterioridad.  
50

Está opcionalmente comprendido en este invento el hecho de que la beta-glucosidasa es añadida en la etapa e) del procedimiento.

Preferiblemente, la reacción de hidrólisis está caracterizada porque los azúcares solubles obtenidos en la etapa e) comprenden unos azúcares de C5 y/o C6 monoméricos, preferiblemente glucosa y/o xilosa.

5 En una forma de realización preferida de este invento, el material hidrolizado de una biomasa, que contiene un material sobrenadante rico en azúcares y unos residuos sólidos ricos en lignina, será sometido a un proceso de separación de sólido/líquido, que se puede ejecutar por ejemplo por centrifugación, filtración o simple decantación por gravedad. Se entiende que unos azúcares solubles son todos los azúcares que predominantemente se pueden encontrar en la fase líquida si se lleva a cabo una separación del tipo sólido/líquido, como es conocido por una persona experta en la especialidad.

#### [Fermentación de materiales hidrolizados de una biomasa]

10 Un opcional aspecto adicional de este invento es la fermentación del material hidrolizado de una biomasa que se ha obtenido en la etapa e). Por lo tanto, el invento comprende también el procedimiento más arriba descrito, que está caracterizado además porque la fase rica en azúcares es elaborada ulteriormente. En una forma particular de realización, la fase líquida rica en azúcares es elaborada ulteriormente para dar etanol. Unos microorganismos pueden ser empleados dentro del sentido de este invento para convertir en etanol a unos materiales hidrolizados de biomasa que contienen pentosas y hexosas.

15 Es preferido que, en esta etapa, se use una fase líquida rica en azúcares, obtenible a partir de la etapa e) que comprenda un alto contenido de azúcares fermentables, que preferentemente es el del orden de 15-50 % p/v. El contenido de azúcares es en este contexto el contenido de todas las pentosas y hexosas. En una forma preferida de realización del invento, este material hidrolizado de una biomasa tiene un contenido de azúcares de 16-25 % p/v. En una forma de realización más preferida del invento, el material hidrolizado de una biomasa también contiene unos nutrientes adicionales (esto es unas proteínas, unas sales y unos azúcares) que se han arrastrado a partir de unos procesos integrados de producción de enzimas.

20 La fermentación del material hidrolizado de una biomasa para dar etanol se puede ejecutar con unas cepas microbianas que muestran una robustez del procedimiento, una alta tolerancia para agentes inhibidores y etanol, unos rendimientos confiables de productos en unas concentraciones altas y bajas de azúcares. Unos ejemplos no limitativos de dichos microorganismos, que pueden convertir a los azúcares en etanol, incluyen la levadura de panaderos *S. cerevisiae*, *Pichia stipitis*, *Hansenula polymorpha*, *Clostridium acetobutylicum*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, *Zymomonas mobilis*, *E. coli*, *Klebsiella oxytoca* y *Fusarium oxysporum*.

25 Los criterios de selección para las opciones del procedimiento y la elección del organismo son una robustez del procedimiento, una tolerancia para productos/agentes inhibidores/temperaturas y unos rendimientos de etanol consecuentemente altos (Fischer y colaboradores, 2008; Matsushika y colaboradores, 2009).

Las fermentaciones etanólicas se pueden conducir a unas temperaturas comprendidas entre 28 y 70 °C durante 10 - 48 h dependiendo del valor óptimo de la temperatura y de la eficiencia de fermentación del microorganismo utilizado (Matsushika y colaboradores, 2009).

30 Las enseñanzas de la técnica anterior indican que los límites de conversión teóricos para la conversión de hexosas en etanol pueden ser de 51 % p/p (es decir 1 g de glucosa por 0,51 g de etanol) para unas levaduras (Matsushika y colaboradores, 2009).

En las divulgaciones que aquí se describen, se encontró de manera sorprendente que el tratamiento previo no influye sobre el rendimiento de la hidrólisis de una biomasa o de las operaciones de fermentación.

40 Las fermentaciones de hexosas con unas cepas de levadura se pueden realizar a unas temperaturas de 28 - 35 °C, a un pH de 4 - 6 y se pueden completar en 10 - 48 h. Como un resultado de la fermentación se obtiene una suspensión espesa que contiene una biomasa de levadura y aproximadamente 0,5 - 25 % p/v de etanol, dependiendo de la concentración inicial de azúcares del material hidrolizado de la biomasa y de la eficiencia de conversión para azúcares de los tipos de pentosas y hexosas,

#### 45 [Recuperación de etanol]

La recuperación de etanol a partir de unos líquidos de fermentación se puede ejecutar por medio de diversos métodos conocidos por los expertos en la especialidad. Uno de dichos procesos es un procedimiento convencional de destilación y rectificación que confía en un equipo empleado en las industrias de la cervecera y químicas, tal como unas columnas de destilación. Estas tecnologías están bien consagradas en la industria y unos aparatos alternativos son de por sí conocidos (Leland, 2008, Cardona y Sanchez, 2007). En una forma alternativa de realización del invento, el etanol se recupera mediante una tecnología de separación por arrastre, siendo ejemplos

no limitativos de dicha tecnología una separación por arrastre en vacío, una separación por arrastre con un gas o una evaporación por atomización.

5 Las prácticas del presente invento pueden dar como resultado un producto de etanol al 90-100 % v/v. Este producto se puede mezclar opcionalmente con unos aditivos o elaborar alternativamente para formular un producto que será enviado al consumidor final.

**Definición de términos:**

En el presente invento se usan un cierto número de términos, que se definen seguidamente.

10 Los términos "biomasa" y "biomasa lignocelulósica" se refieren a cualquier material celulósico o lignocelulósico e incluyen unos materiales que comprenden una celulosa y opcionalmente comprenden además una hemicelulosa, una lignina, un almidón, así como unos polisacáridos, oligosacáridos y/o monosacáridos. Una biomasa puede comprender también unos componentes adicionales, tales como una proteína, unos lípidos, unas ceras, unos compuestos fenólicos y unos esteroides. Una biomasa se puede derivar generalmente de una única fuente, o comprende una mezcla que se deriva de más de una sola fuente; por ejemplo, una biomasa podría comprender una 15 mezcla de granzas de trigo y de paja de trigo o una mezcla de hierba y hojas. Unos ejemplos no limitativos de una biomasa son plantas cultivadas bioenergéticas, residuos agrícolas, residuos sólidos municipales, residuos sólidos industriales, un lodo procedente de la fabricación de papel, residuos de corrales, así como residuos madereros y forestales. Unos ejemplos no limitativos específicos de una biomasa pura incluyen granzas de avena, carozos de maíz, residuos de plantas cultivadas tales como cáscaras de maíz, hojas y tallos de maíz, plantas herbáceas, trigo, paja de trigo, cebada, paja de cebada, heno, paja de arroz, hierba de pasto, papel residual, bagazo de caña de 20 azúcar, sorgo, soja componentes obtenidos a partir de la molienda de granos, árboles, ramas, raíces, hojas, virutas de madera, aserrín de madera, arbustos y matorrales, hortalizas y legumbres, frutas, flores y estiércol animal.

El término "desencolado mecánico" se refiere a cualquier método mecánico para reducir el tamaño de las partículas de una biomasa. Ejemplos no limitativos de aplicaciones de desencolado son una molienda con molinos de martillos o una trituración.

25 El término "biomasa previamente tratada" significa una biomasa que ha sido sometida a un tratamiento físico-químico antes de una sacarificación. Unos tratamientos tales como unos tratamientos previos se describen adicionalmente en el presente texto.

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

30 El término "celulósico" se refiere a una composición que comprende una celulosa.

El término "sacarificación" o "hidrolisis de una biomasa" se refiere a la producción de azúcares fermentables a partir de unos polisacáridos.

35 El término "azúcar fermentable" se refiere a unos oligosacáridos y monosacáridos que pueden ser usados como una fuente de carbono por un microorganismo en un proceso de fermentación para producir unos productos tales como el etanol.

El término "material hidrolizado" se refiere al producto de una sacarificación, que contiene los azúcares producidos en el proceso de sacarificación, la biomasa no hidrolizada remanente y las enzimas usadas para la hidrólisis de la biomasa.

El término "suspensión espesa" se refiere a una mezcla de un material insoluble y un líquido.

40 El término "suspensión espesa miscible" se refiere a una suspensión espesa que se vuelve sustancialmente homogénea bajo la acción del sistema de agitación a la que ella es sometida. El término "miscibilidad" se refiere a esta propiedad de una suspensión espesa.

45 El término "suspensión espesa entremezclada a fondo" se refiere a un estado en el que los componentes de la suspensión espesa están distribuidos de una manera sustancialmente uniforme (homogénea) a todo lo largo de la suspensión espesa.

Por el concepto de "peso en seco" o "p.s." de una biomasa se entiende el peso de una biomasa desde la que se ha retirado la totalidad, o esencialmente la totalidad, del agua. El peso en seco se mide típicamente de acuerdo con la norma E1756-01 de la Sociedad Americana Para Ensayos y Materiales (ASTM acrónimo de American Society for

Testing and Materials) (Standard Test Method for Determination of Total Solids in Biomass = método de ensayo clásico para la determinación del contenido total de materiales sólidos en una biomasa) o la norma T-412 om-02 de la norma de la Asociación técnica de la industria de pasta papelera y de papel, Inc. (TAPPI acrónimo de Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Inc.) (Moisture in Pulp, Paper and Paperboard = humedad en pasta papelera, papel y cartón).

El término "peso en seco" (d.w.) o "sustancia seca" (s.s.) se refiere a la cantidad total de peso en seco de una biomasa que se ha añadido a un reactor de un sistema discontinuo o de sistema discontinuo alimentado, calculado en el momento de la adición, como un tanto por ciento del peso total de la composición que está reaccionando en el reactor al final del experimento.

El término "enzimas para la sacarificación" o "enzimas hidrolizantes" se puede recibir a un sistema de enzimas para la sacarificación, que se compone de una o más enzimas (en donde se prefiere más de una), que se usan para hidrolizar a la biomasa polimérica liberando de esta manera unos oligosacáridos y/o unos monosacáridos dentro de un material hidrolizado. Un sistema de enzimas para la sacarificación comprende una o más enzimas seleccionadas del conjunto de las "glucosidasas" que hidroliza(n) a los enlaces de éter de unos di-, oligo- y polisacáridos y que se encuentran en la clasificación de enzimas EC 3.2.1.x del grupo general de las "hidrolasas" (EC 3.). Adicionalmente, pueden estar presentes otras enzimas que pueden pertenecer o no a este grupo. Las glucosidasas útiles en el presente método pueden ser categorizadas por el componente de biomasa que ellas hidrolizan. Las glucosidasas que son útiles en el presente método incluyen unas glucosidasas que hidrolizan a las celulosas (por ejemplo, unas celulasas, endoglucanasas, exoglucanasas, celobiohidrolasas, beta-glucosidasas), unas glucosidasas que hidrolizan a las hemicelulosas, denominadas hemicelulasas, (por ejemplo, xilanasas, endoxilanasas, exoxilanasas, beta-xilosidasas, arabinoxilanasas, manasas, galactasas, pectinasas, glucuronidasas), y unas glucosidasas que hidrolizan a los almidones (por ejemplo, amilasas,  $\alpha$ -amilasas,  $\beta$ -amilasas, glucoamilasas,  $\alpha$ -glucosidasas, isoamilasas). Por lo demás, puede ser útil añadir otras actividades al sistema de enzimas de sacarificación, tales como las de peptidasas (EC 3.4.x.i), lipasas (EC 3.1.1.x y 3.1.4.x), ligninasas (EC 1.11.1.x), y feruloil esterases (EC 3.1.1.73) para llegar a liberar a los polisacáridos con respecto de otros componentes de la biomasa. Es bien conocido en la especialidad que unos microorganismos que producen enzimas que hidrolizan a polisacáridos exhiben con frecuencia una actividad, tal como una degradación de celulosas, que es catalizada por varias enzimas o por un grupo de enzimas que tienen diferentes especificidades para substratos. Así, una "celulasa" procedente de un microorganismo puede comprender un grupo de enzimas, todas o algunas de las cuales pueden contribuir con una actividad degradadora de celulosas. Unas preparaciones de enzimas comerciales o no comerciales, tales como una celulasa, pueden comprender numerosas enzimas que dependen del esquema de purificación que se ha utilizado para obtener la enzima. Así, las enzimas para sacarificación, que se usan en el presente método, comprenden por lo menos una "celulasa", y esta actividad puede ser catalizada por más de una enzima. Opcionalmente, las enzimas para sacarificación que se usan en el presente método pueden comprender por lo menos una hemicelulasa, dependiendo generalmente del tipo de biomasa previamente tratada que se usa en el presente procedimiento. Por ejemplo, típicamente no se necesita una hemicelulasa cuando una biomasa sacarificante es tratada previamente con un ácido y es incluida típicamente cuando una biomasa sacarificante es tratada previamente en unas condiciones neutras o básicas. Se pueden obtener comercialmente unas enzimas para sacarificación tales como la celulasa Spezyme® CP (de Genencor International, Rochester, N.Y.) y la xilanasas Multifect® (de Genencor). Además, unas enzimas para sacarificación se pueden producir por medios biológicos, incluyendo el uso de unos microorganismos recombinantes. Se pueden desarrollar unas enzimas de sacarificación, que se pueden usar en el presente procedimiento.

El acrónimo SSF representa una sacarificación y una fermentación simultáneas, y es el acrónimo de "simultaneous saccharification and fermentation".

#### 45 Ejemplos

Se usan los siguientes términos:

"HPLC" es el acrónimo de High Performance Liquid Chromatography, cromatografía de fase líquida de alto rendimiento, "C" es Centígrados, "kPa" es kiloPascuales, "m" es metro, "mm" es milímetro, "kW" es kilovatio, " $\mu$ m" es micrómetro, " $\mu$ l" es microlitro, "ml" es mililitro, "l" es litro, "min" es minuto, "mM" es milimolar, "cm" es centímetro, "g" es gramo, "kg" es kilogramo, "p" es peso, "h" es horas, "temp" o "T" es temperatura, "theoret" es teórico, "pretreat" es pre-tratamiento, "DWB" es peso en seco de una biomasa, "ASME" es el acrónimo de American Society of Mechanical Engineers = Sociedad Americana de Ingenieros Mecánicos, "s.s." es el acrónimo de stainless steel = acero inoxidable, "in" es pulgada, "PSD" es el acrónimo de particle size distribution = distribución de tamaños de partículas, "d-50" es el diámetro de partículas en que un 50 % del volumen acumulado de las partículas está por debajo de este tamaño, "d-95" se refiere a un diámetro de partículas en que un 95 % del volumen acumulado de las partículas está por debajo de este tamaño, "rpm" es el acrónimo de revoluciones por minuto.

El ácido sulfúrico, el hidróxido de amonio, el ácido acético, la acetamida, el extracto de levadura, la glucosa, la xilosa, el sorbitol, el  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , el ácido fosfórico y el ácido cítrico se obtuvieron a partir de Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo.).

- 5 La composición de una biomasa es medida por uno cualquiera de los métodos clásicos bien conocidos en la especialidad, tal como el método ASTM E1758-01 "método normalizado para la determinación de hidratos de carbono por medio de una HPLC".

#### **Ejemplo 1: Medición de azúcares monoméricos**

Para determinar el progreso de la hidrólisis de una paja, se toman muestras a intervalos de tiempo apropiados y el contenido de azúcares solubles se determina por medio de una HPLC.

- 10 Los azúcares solubles (tales como glucosa, celobiosa, xilosa, xilobiosa, galactosa, arabinosa y manosa) en un líquido de sacarificación se midieron por medio de una HPLC (de Agilent Technologies, Palo Alto, Calif.).

- 15 Los monosacáridos se midieron directamente en el material hidrolizado. La materia insoluble se retiró a partir del material hidrolizado por medio de una centrifuga. El pH del líquido separado se ajustó, si fuese necesario, con ácido sulfúrico. El líquido separado se diluyó, si fuese necesario, y luego se filtró haciéndolo pasar a través de un filtro con jeringa de 0,2  $\mu\text{m}$  directamente dentro de un vial para una HPLC.

- 20 Para el análisis de los azúcares disueltos totales, 10 ml de una muestra diluida se colocaron en un vial puesto a presión y se añadieron 349  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 75 %. El vial se tapó colocó dentro del autoclave durante una hora para hidrolizar todos los azúcares a la forma de monosacáridos. Las muestras se enfriaron y su pH se ajustó mediante carbonato de sodio hasta el valor de pH necesario, luego las muestras se filtraron dentro de los viales para HPLC y se analizaron mediante una HPLC. Después de la tanda, las concentraciones en la muestra se determinaron a partir de unas curvas patrón para cada uno de los compuestos.

#### **Ejemplo 2: Tratamiento físico-químico previo de una paja de trigo**

- 25 Una paja de trigo se molió a un tamaño de partículas de menos que 2 cm. Subsiguientemente, la paja molida se mezcló con agua y se añadió  $\text{H}_2\text{SO}_4$  como un catalizador para tratamiento previo seguido por un tratamiento hidrotérmico bajo una alta presión.

La suspensión resultante de una carga de alimentación previamente tratada se usó entonces para la producción de una enzima para hidrólisis y para el proceso de sacarificación en unas operaciones realizadas corriente abajo.

#### **Ejemplo 3: Producción de unas enzimas para hidrólisis usando una carga de alimentación previamente tratada**

- 30 Las enzimas para hidrólisis (p.ej., celulasas y hemicelulasas), destinadas a la conversión de un material lignocelulósico en unos azúcares componentes, se produjeron en unos cultivos sumergidos del hongo filamentoso *Trichoderma reesei*.

- 35 En una etapa de cultivación primaria, unos cultivos de siembra se dejaron crecer en un matraz con sacudimiento con una capacidad de 2 l que había sido llenado con 400 ml de un caldo de cultivo que había sido suplementado con 2 % p/v de una biomasa tratada previamente (véase el Ejemplo 2) y con 0,5 % v/v de un líquido de maceración de maíz. El medio se inoculó con una preparación de esporas fúngicas, que tenía una Densidad Óptica (DO) a 600 nm de 10. Los cultivos en el matraz de sacudimiento se dejaron crecer durante 48 h a 30 °C y a un pH de 5 mediando una agitación constante de 250 rpm.

- 40 El aumento de la escala del cultivo de siembra se realizó en unos biorreactores con un volumen de trabajo de 5 l. La composición del medio de cultivación era idéntica que en la disposición primaria de cultivo de siembra. Cada biorreactor fu inoculado con 10 % v/v del cultivo de siembra primario. El cultivo se dejó crecer a 30 °C (pH 5) durante 48 h con una agitación constante de 350 rpm.

- 45 La producción principal de las enzimas se llevó a cabo en un biorreactor que tenía una capacidad de 150 l con un volumen de trabajo de 100 l. El medio de cultivación era idéntico a los cultivos de siembra anteriores. Sin embargo, para la producción de unas enzimas para hidrólisis se añadieron 8 % p/v de una biomasa previamente tratada y 2 % v/v de un líquido de maceración de maíz. El caldo de cultivo se inoculó con 5 % v/v del cultivo de siembra secundario. El hongo productor de enzimas, *Trichoderma reesei*, se dejó luego crecer a 30 °C mediando una agitación constante a 350 rpm. El crecimiento comenzó durante 5 días a un  $\text{pO}_2$  constante de 25 % con el fin de asegurar una producción óptima de enzimas en condiciones aerobias. Después de las condiciones de cultivación

durante 5 días, se cosechó la suspensión espesa de fermentación que contenía la enzima entera, la cual contenía residuos de la biomasa previamente tratada, del caldo (medio) de fermentación agotado y del micelio fúngico.

La concentración total de enzimas (proteínas) solubles en el caldo de fermentación (material sobrenadante) se determinó por el método de Bradford con una albúmina de suero bovino como un patrón de referencia (Bradford, M., 1976).

En unos experimentos de hidrólisis realizados corriente abajo se utilizó o bien el material sobrenadante que contenía enzimas o la suspensión espesa de fermentación total (material sobrenadante + biomasa previamente tratada + micelio fúngico).

#### Ejemplo 4: Hidrólisis de paja

Una paja de trigo previamente tratada se hidrolizó o bien con unos sistemas de celulasas que contenían (i) el material sobrenadante que se ha descrito en el Ejemplo 3, (ii) la suspensión fúngica completa (el micelio fúngico + la biomasa + el material sobrenadante) o (iii) la suspensión fúngica completa en la cual el micelio fúngico había sido sometido a cizalladura antes de la hidrólisis de la paja. Los experimentos de hidrólisis se realizaron también opcionalmente en la presencia de una beta-glucosidasa (BGL) añadida externamente.

Las reacciones de hidrólisis se realizaron en un volumen de reacción de 1 l con 20 % p/p s.s. de una paja previamente tratada a 50 °C durante 72 h en un medio que se había ajustado a un pH de 5. El régimen de dosificación de la enzima para hidrólisis fue de 0,5 % p de celulasa/p de paja previamente tratada. La dosificación de la enzima fue referenciada a la concentración total de proteínas en el caldo de fermentación agotado tal como se determinó en el Ejemplo 2. Opcionalmente, las reacciones se realizaron con una actividad adicional de BGL (de Novo 188, de Novozymes, Dinamarca). La actividad de BGL se añadió dosificadamente a razón de 2 Unidades de Celobiosa (CBU)/mg de celulasa. Las CBU's se determinaron tal como ha sido descrito por Prior y colaboradores (2008).

Las reacciones de sacarificación se llevaron a cabo en un sistema de biorreactores mediando agitación constante (a 50 rpm) para asegurar iguales condiciones de reacción. En unos experimentos particulares, una suspensión espesa de fermentación que contenía unas enzimas para hidrólisis se sometió a cizalladura mediante un aumento de la velocidad del elemento impulsor (L5M, de Silverson Machines Ltd.) hasta 8.000 rpm durante 30 min antes del proceso de hidrólisis de lignocelulosa realizado corriente abajo. Para determinar la cinética de hidrólisis y los rendimientos de glucosa, se tomaron muestras a las 3, 7, 24 y 48 h. La liberación aparente de glucosa se midió mediante una metodología de HPLC como más arriba se ha descrito. Los resultados de las diferentes disposiciones de hidrólisis se muestran en la Fig. 2.

Los datos que aparecen en la Fig. 2 indican que la cizalladura de una biomasa fúngica antes de la hidrólisis aumenta la cinética de hidrólisis y los rendimientos de glucosa terminales, si la suspensión fúngica de *Trichoderma* que contiene enzimas (véase el Ejemplo 3) se usa para la hidrólisis de una paja tratada previamente en ausencia de una suplementación con BGL, .

Unos experimentos de hidrólisis de una paja previamente tratada realizados solamente con un caldo de fermentación (material sobrenadante) suplementado con BGL mostraron una cinética de hidrólisis y unos rendimientos de glucosa terminales que eran similares a los de unas reacciones realizadas con una suspensión espesa de fermentación cizallada completa en ausencia de BGL.

La reacción de hidrólisis con una suspensión espesa de fermentación completa cizallada (es decir el micelio fúngico, la biomasa y el material sobrenadante) que adicionalmente se había suplementado con BGL, mostró una cinética de hidrólisis y un rendimiento de azúcares más favorables en comparación con todos los otros procedimientos de hidrólisis que se examinaron. Este sorprendente efecto puede ser debido a la liberación de unas actividades enzimáticas intracelulares y/o unidas superficialmente con el microorganismo, las cuales actúan sinérgicamente con unos sistemas de celulasas solubles en el caldo de fermentación.

#### 45 Descripción de las Figuras:

Fig. 1: Proceso de conversión de una biomasa en etanol que incluye el arrastre del micelio a partir de una producción de enzimas in situ, L = lignina, P = pentosa, H = hexosa. La Fig. 1 es un diagrama de bloques que generalmente ilustra el proceso de refinación biológica que se usó para convertir una lignocelulosa en etanol a través de una secuencia de fermentación de acuerdo con el presente invento.

50 Fig. 2: Liberación de glucosa a partir de una paja previamente tratada. Condiciones de hidrólisis: 20 % p/p s.s. de una biomasa previamente tratada. Dosificación de una enzima celulasa: 0, 5 % p de enzima soluble/p de biomasa previamente tratada. Dosificación de BGL opcional: 2 CBU/mg de la enzima celulasa. Toma de muestras a las 3, 7,

24, 48 y 72 h. La hidrólisis de la biomasa se realizó o bien con un caldo de fermentación que contenía enzimas o con una suspensión espesa de fermentación completa cizallada/no cizallada (un material sobrenadante del caldo + una biomasa + una biomasa fúngica) en la presencia y en la ausencia de una actividad adicional de BGL.

Bibliografía

- 5 Chauve y colaboradores (2010) *Biotechnology for Biofuels* [Biotecnología para biocombustibles] 2010, 3:3
- Bradford, M. (1976), *Anal. Biochem.* 72:248-254
- 10 Prior B.A., Day D.F. (2008) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 146(1-3), páginas 151-64
- Pejo, E.T., Oliva, J.M. y Ballestros, M. (2008) Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: a review [Un enfoque realista para la producción a plena escala de bioetanol a partir de lignocelulosa: una recopilación] *J. Sci& Indust. Research* 67, páginas 874-884
- 15 Howard, R.L., Abotsi, E., van Rensburg, J. Howard, S. (2003) Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. [Biotecnología de la lignocelulosa: éxitos de la bioconversión y la producción de enzimas] *Afri. J. Biotechnol.* 2, páginas 602-619
- 20 Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton y D. Crocker (2008) Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. [Determinación de hidratos de carbono estructurales y de lignina en una biomasa] Laboratory Analytical Procedure (LAP) Technical Report NREL/TP-510-42618, <http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42618.pdf>
- 25 Kumar R, Mago G, Balan V, Wyman CE. (2009a) Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. [Caracterizaciones físicas y químicas de materiales sólidos de rastrojos de maíz y de álamos que resultan de unas tecnologías avanzadas de tratamiento previo] *Bioresour. Technol.* 100(17), páginas 3948-62.
- 30 Kumar R, Wyman CE. (2009b) Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. [Efectos de unas enzimas celulasas y xilanasas sobre la desconstrucción de materiales sólidos procedentes del tratamiento previo de álamos que resulta de unas tecnologías avanzadas] *Biotechnol Prog.* 2009, 25(2), páginas 302-14.
- 35 Kumar R, Wyman CE. (2009c) Effect of additives on the digestibility of corn stover solids following pretreatment by leading technologies. [Efectos de unos aditivos sobre la digestibilidad de materiales sólidos de rastrojos de maíz a continuación de un tratamiento previo unas tecnologías avanzadas]. *Biotechnol Bioeng.* 2009, 15 de abril; 102(6):1544-57.
- 40 Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzapple M, Ladisch MR, Lee YY. (2005) Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. [Datos comparativos de la recuperación de azúcares a partir de una aplicación a la escala de laboratorio de unas tecnologías avanzadas de tratamiento previo a rastrojos de maíz]. *Bioresour. Technol.* 96(18), páginas 2026-32.
- 45 Chandra, R.R., Bura, R., Mabee, W.E., Berlin, A., Pan, X., Saddler, J.N. (2007) Substrate Pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? Tratamiento previo de substratos: ¿La clave para una hidrólisis enzimática efectiva de materiales celulósicos? [*Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 108, páginas 67-93.
- 50 Margeot, A., Han-Hägerdahl, B., Edlund, M., Slade, R., Monot, F. (2009) New improvements for lignocellulosic ethanol. Nuevos perfeccionamientos para etanol lignocelulósico. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, páginas 1-9.
- Chandrakant, P., Bisaria, V. S. (1998) Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. [Bioconversión simultánea de celulosa y de hemicelulosa en etanol] *Crit. Rev. Biotechnol.* 18, páginas 295-331
- 55 Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D.J., Saddler, J.N. (2004a) Effects of sugar inhibition on cellulose and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. [Efectos de la inhibición de azúcares sobre celulosa y beta-glucosidasa durante una hidrólisis enzimática de substratos de madera blanda] *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113-116, páginas 1115-1125
- 60 Hodge, D.B., Karim, M.N., Schell, D.J., McMillan, J.D. (2009) Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis. [Cultivo discontinuo alimentado basado en un modelo para la hidrólisis enzimática de celulosas con alto contenido de materiales sólidos]. *Appl Biochem Biotechnol* 152, páginas 88-107
- 65 Reith, J.H., den Uli, H., van Veen, H., de Laat, W.T.A.M., Niessen, J.J., de Jong, E., Elbersen, H.W., Weusthuis, R., van Dijken, J.P., Raamsdonk, L. (2002) Co-production of bioethanol, electricity, and heat from biomass residues.

- [Coproducción de bioetanol, electricidad y calor a partir de residuos de biomásas] En: Twelfth European Conference and Technology Exhibition on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection [Duodécima Conferencia Europea y Exhibición de Tecnología sobre Biomasa para Energía, Industria y Protección del Clima], Amsterdam, The Netherlands [Países Bajos]
- 5 .
- Palmquist, E., Hahn-Hägerdahl (2000a) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification [Fermentación de materiales hidrolizados lignocelulósicos I: inhibición y desintoxicación]. *Bioresource Technology* 74, páginas 17-24
- 10 Palmquist, E., Hahn-Hägerdahl (2000b) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. [Fermentación de materiales hidrolizados lignocelulósicos: II: inhibidores y mecanismos de inhibición] *Bioresource Technol.* 74, páginas 25-33
- 15 Jing, X., Zhang, X. y Bao, J. (2009) Inhibition Performance of Lignocellulose Degradation Products on Industrial Cellulase Enzymes During Cellulose Hydrolysis. [Rendimiento de inhibición de productos de degradación de enzimas celulasas industriales durante la hidrólisis de celulosa] *Applied Biochemistry and Biotechnology* 159, páginas 696-707
- 20 Xiao, Z., Storms, R. y Tsang, A. (2004b) Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. [Ensayo con papel de filtro basado en microplacas para medir la actividad total de celulasas] *Biotechnology and Bioengineering* 88:832-837
- 25 Bobey, D., Ederer, G.M. (1981) Rapid detection of yeast enzymes by using 4-methylumbelliferyl substrates [Detección rápida de enzimas de levaduras usando unos substratos de 4-metilumbeliferilo] *J.Clin.Microbiol.*, páginas 2, 393-394
- 30 Maki, M., Leung, K.T., Qin, W. (2009) The prospects of cellulose producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. [Las perspectivas de bacterias productoras de celulosa para la bioconversión de una biomasa lignocelulósica] *Int. J. Biol. Sci.* 5, páginas 500-516
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. (2002) Microbial cellulose utilisation: Fundamentals and biotechnology. [Utilización microbiana de celulosa: Fundamentos y biotecnología] *Microbiol. and Molecular. Biology Rev.* 66, páginas 506-577
- 35 Shewale JG. Beta-Glucosidase: its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose. [Beta-glucosidasa: su cometido en la síntesis de celulasas y en la hidrólisis de celulosa] (1982) *Int J Biochem.* 14, páginas 435-43
- 40 Seidle, H.F., Marten, I., Shoseyov, O., Huber, R.E. (2004), Physical and kinetic properties of the family 3 beta-glucosidase from *Aspergillus niger* which is important for cellulose breakdown. [Propiedades físicas y cinéticas de la familia de 3 beta-glucosidasa procedente de *Aspergillus niger* que es importante para la descomposición de celulosa] *The Protein J.* 23, páginas 11-23
- 45 Szijarto, N., Szengyel, Z., Liden, G., Reczey, K. (2004) Dynamics of cellulase production by glucose grown cultures of *trichoderma reesei* RUT-C30 as a response to addition of cellulose [Dinámica de la producción de celulasas por cultivos de *trichoderma reesei* RUT-C30 que han crecido con glucosa como una respuesta a la adición de celulosa] *Appl. Biochem. Biophys.* 115, páginas 115-124
- 50 Kristensen, J.B., Felby, C., Jorgensen, H. (2009) Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose [Factores determinantes del rendimiento en la hidrólisis enzimática de lignocelulosa con alto contenido de materiales sólidos] *Biotech. for Biofuels* 2, páginas 1-22
- 55 Fischer, C.R., Klein-Marcuschamer, D., Stephanopoulos, G. (2008) Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. [Selección y optimización de anfitriones microbianos para la producción de biocombustibles] *Metab. Eng.* 10(6), páginas 295-304.
- 60 Shaw A.J., Podkaminer K.K., Desai S.G., Bardsley J.S., Rogers S.R., Thorne P.G., Hogsett D.A., Lynd L.R. (2008) Metabolic engineering of a thermophilic bacterium to produce ethanol at high yield. [Tratamiento por ingeniería metabólica de una bacteria termófila para producir etanol con alto rendimiento] *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105(37), páginas 13769-74
- 65 Campell, J.A., Hansen, R.W., Wilson, J.R. (1999) Cost effective colorimetric microtitre plate enzymic assays for sucrose, glucose and fructose in sugarcane tissue extracts. [Ensayos enzimáticos en una placa de microtitulación colorimétrica para sacarosa, glucosa y fructosa en extractos tisulares de caña de azúcar] *J. Sci. Food. Agric.* 79, páginas 232-236.
- Matsushika A, Inoue H, Murakami K, Takimura O, Sawayama S. (2009) Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. [Rendimiento de

- producción de bioetanol de cinco cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* que fermentan xilosa industrialmente]. *Bioresour Technol.* Abril de 2009 100(8) :2392-8.
- 5 Nigam JN. (2001) Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of *Pichia stipitis*. [Producción de etanol a partir de un líquido de tratamiento con sulfito de una madera dura usando una cepa adaptada de *Pichia stipitis*]. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 26(3), páginas 145-50.
- 10 Laplace JM, Delgenes JP, Moletta R, Navarro JM. (1992) Alcoholic glucose and xylose fermentations by the coculture process: compatibility and typing of associated strains. [Fermentaciones alcohólicas de glucosa y xilosa por el procedimiento de cocultivación: compatibilidad y tipificación de cepas asociadas] *Can J Microbiol.* 38(7), páginas 654-8
- 15 Tolan, J.S. (2002): logens process for producing ethanol from cellulosic biomass. [Procedimiento logens para producir etanol a partir de una biomasa celulósica.] *Clean Technol. Environ. Policy.* 3, páginas 339-345
- 20 Cardona, C.A., Sanchez, O.J. (2007) Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. [Producción etanólica de combustibles. Tendencias de diseño de procesos y oportunidades de integración] *Bioresource Technol.* 98, páginas 2415-2457
- Jorgensen, H., Vibe-Pedersen, J., Larsen, J., Felby C. (2006) Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. [Licuación de lignocelulosa con altas concentraciones de materiales sólidos]. *Biotechnology and Bioengineering* 96, páginas 862 - 870
- 25 Chadha B.S., Kanwar S.S., Saini H.S., Garcha H.S. (1995) Hybrid process for ethanol production from rice straw. [Procedimiento híbrido para la producción de etanol a partir de paja de arroz] *Acta Microbiol Immunol Hung.* 42(1):53-9.
- 30 Hennessey, S.M. Seapan, M., Elander, R.T., Tucker, M.P. (2006) Process for concentrated biomass saccharification. [Procedimiento para la sacarificación de una biomasa concentrada] documento WO2009/045651A2
- Leland, M.V. (2008) Separation technologies for recovery and dehydration of alcohols from fermentation broth. [Tecnologías de separación para la recuperación y deshidratación de alcoholes a partir de un caldo de fermentación] *Biofuel, Biorpod.Bioref.* 2, páginas 553-588
- 35 Rao, M., Deshpande, V., Seeta, R., Srinivasan, M.C., Mishra, C. (1985) Hydrolysis of sugarcane Bagasse by mycelium biomass from *penicillium funiculosum*. [Hidrólisis de un bagazo de caña de azúcar por una biomasa con micelios procedente de *penicillium funiculosum*] *Biotechnol. Bioengineer* 27, 00. 1070-72
- 40

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para degradar a una biomasa lignocelulósica previamente tratada, que comprende las etapas de:
- 5 c) cultivar un microorganismo que es capaz de producir por lo menos una enzima que tiene una actividad celulolítica y/o hemicelulolítica en un medio de crecimiento, obteniendo de esta manera una suspensión rica en microorganismos, que comprende dicha por lo menos una enzima;
- d) elaborar el microorganismo y/o la suspensión rica en microorganismos de la etapa c), por
- 10 (i) un tratamiento mecánico que comprende el sometimiento a una entrada de energía volumétrica de 1-500 kW/m<sup>3</sup>, durante un período de tiempo de 0,1-60 min;
- y/o
- (ii) un tratamiento mecánico que se selecciona entre un tratamiento con un mezclador, un tratamiento con un homogeneizador y un tratamiento con un molino;
- y/o
- 15 (iii) un tratamiento mecánico que implica bombear la suspensión espesa de fermentación que contiene microorganismos desde el recipiente de fermentación hasta el recipiente de hidrólisis;
- e) someter a una biomasa lignocelulósica previamente tratada conjuntamente con el producto de la etapa d) a la acción de un reactor para la hidrólisis de una biomasa con el fin de obtener unos azúcares solubles.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la biomasa lignocelulósica previamente tratada se ha obtenido a partir de una biomasa lignocelulósica por un tratamiento físico-químico.
- 20 3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en que el medio de crecimiento de la etapa c) comprende una biomasa lignocelulósica, que preferiblemente ha sido tratada previamente.
4. Un procedimiento para degradar una biomasa lignocelulósica, que comprende las etapas de:
- a) un tratamiento físico-químico previo de una biomasa lignocelulósica para obtener una suspensión espesa previamente tratada;
- 25 b) separar la suspensión espesa previamente tratada de la etapa a) en dos partes, la parte A y la parte B;
- c) incorporar la parte A en un medio de crecimiento en bruto para proporcionar un medio de crecimiento final, y cultivar por lo menos un microorganismo capaz de producir por lo menos una enzima que tiene actividad celulolítica y/o hemicelulolítica en el medio de crecimiento final, obteniéndose de esta manera una suspensión rica en microorganismos que comprende dicha por lo menos una enzima;
- 30 d) elaborar el microorganismo y/o a la suspensión rica en microorganismos de la etapa c), en que dicho tratamiento comprende un tratamiento mecánico que es uno o más de los siguientes:
- (i) un tratamiento mecánico que comprende el sometimiento a una entrada de energía volumétrica de 1-500 kW/m<sup>3</sup>, durante un período de tiempo de 0,1-60 min;
- 35 y/o
- (ii) un tratamiento mecánico que se selecciona a partir de un tratamiento con un mezclador, un tratamiento con un homogeneizador y un tratamiento con un molino;
- y/o
- (iii) un tratamiento mecánico que implica bombear la suspensión espesa de fermentación que contiene microorganismos, desde el recipiente de fermentación hasta el recipiente de hidrólisis;
- 40 e) someter conjuntamente a la parte B y al producto de la etapa d) a la acción de un reactor para la hidrólisis de una biomasa con el fin de obtener unos azúcares solubles.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en que el tratamiento mecánico en la etapa d) comprende el sometimiento a una entrada de energía volumétrica de 1-500 kW/m<sup>3</sup> durante un período de tiempo de 1-30 min.
- 45 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, en que el tratamiento mecánico en la etapa d) se selecciona entre un tratamiento con un mezclador, un tratamiento con un homogeneizador y un tratamiento con un molino, en que el tratamiento mecánico puede añadir un esfuerzo de cizalladura mecánica o una fuerza de trituración al microorganismo y puede romper o destruir a las membranas celulares y/o a las estructuras de las paredes celulares.
7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 hasta 6, en que el tratamiento mecánico en la etapa d) implica bombear la suspensión espesa de fermentación que contiene microorganismos desde el
- 50 recipiente de fermentación hasta el recipiente de hidrólisis.

8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en que, cuando la etapa d) implica bombear, la tasa de cizalladura, a la que es sometida la suspensión que contiene microorganismos, está situada en el intervalo de 1.600 - 50.000 1/s.
- 5 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en que el tratamiento se realiza durante un período de tiempo de 0,01 a 100 s.
10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en que el tratamiento comprende un tratamiento con energía ultrasónica.
- 10 11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en que la etapa d) comprende un tratamiento químico, que es un tratamiento con uno o más agentes químicos, que se seleccionan entre el conjunto que se compone de unas sales, unos disolventes orgánicos, unos agentes tensioactivos y unas enzimas.
12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las precedentes reivindicaciones 1 hasta 4, en que la etapa d) comprende un tratamiento mecánico de acuerdo con las reivindicaciones 5 hasta 9 y un tratamiento con uno o más agentes químicos de acuerdo con la reivindicación 11.
- 15 13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las precedentes reivindicaciones 4 hasta 12, en que la parte A es la parte minoritaria de la suspensión espesa previamente tratada que se ha obtenido en la etapa a, de 1 hasta 20 % (en peso de materiales sólidos secos).
- 20 14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en que el microorganismo es un hongo, que se selecciona entre el conjunto que se compone de: *Trichoderma sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* y *Talaromyces sp.*.
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en que el microorganismo es *Trichoderma reesei*.

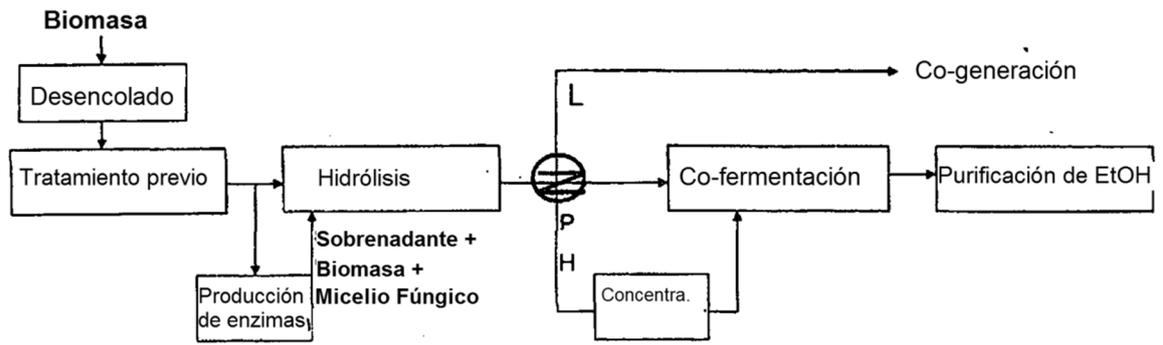


Figura 1

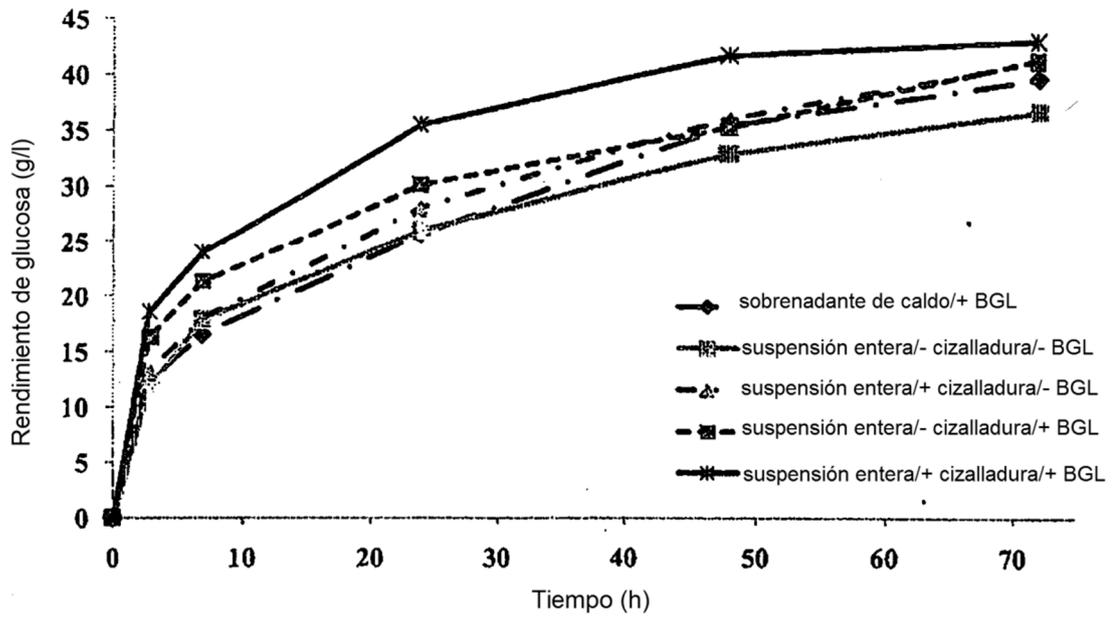


Figura 2