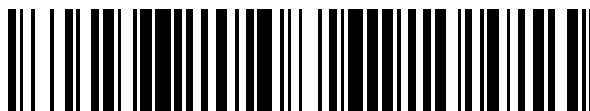


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 688**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)
C13K 1/02 (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01)
D21C 1/04 (2006.01)
D21C 3/04 (2006.01)
C13K 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.08.2013 PCT/DK2013/050256**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14019589**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2013 E 13747782 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2880172**

54 Título: **Métodos de procesamiento de la biomasa lignocelulósica mediante autohidrólisis en una sola etapa e hidrólisis enzimática con derivación c5 e hidrólisis posterior**

30 Prioridad:

01.08.2012 DK 201270461
01.08.2012 US 201261678130 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.10.2018

73 Titular/es:

INBICON A/S (100.0%)
Kraftværksvej 53, Skærbæk
7000 Fredericia, DK

72 Inventor/es:

LARSEN, JAN;
NIELSEN POULSEN, NIELS;
JEPPESEN, MARTIN DAN y
MOGENSEN, KIT KELLEBJERG

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 687 688 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

Métodos de procesamiento de la biomasa lignocelulósica mediante autohidrólisis en una sola etapa e hidrólisis enzimática con derivación c5 e hidrolisis posterior

5

Campo de la invención

La invención se refiere, en general, a métodos de procesamiento de biomasa lignocelulósica hasta azúcares fermentables y, en particular, a métodos que se basan en pretratamiento hidrotérmico.

10

Antecedentes de la invención

La dependencia histórica del petróleo y otros combustibles fósiles se ha asociado con aumentos dramáticos y alarmantes en los niveles atmosféricos de gases de efecto invernadero. Se están realizando esfuerzos internacionales para mitigar la acumulación de gases de efecto invernadero, respaldados por directivas políticas formales en muchos países. Un enfoque central de estos esfuerzos de mitigación ha sido el desarrollo de procesos y tecnologías para la utilización de la biomasa vegetal renovable para reemplazar al petróleo como fuente de precursores para combustibles y otros productos químicos. El crecimiento anual de la biomasa derivada de las plantas en la tierra se estima en aproximadamente 1×10^{11} toneladas métricas por año de peso en seco. Véase Lieth y Whittaker (1975). La utilización de la biomasa es, por lo tanto, un objetivo final en el desarrollo de la economía sostenible.

15

20

El etanol combustible producido a partir de azúcar y de materiales vegetales a base de almidón, tales como cultivos de caña de azúcar, tubérculos y cereales, ya se utiliza ampliamente, con una producción mundial que actualmente supera los 73.000 millones de litros por año. El etanol siempre ha sido considerado una alternativa aceptable a los combustibles fósiles, siendo fácilmente utilizable como un aditivo en las mezclas de combustible o incluso directamente como combustible para automóviles personales. Sin embargo, el uso de etanol producido por estas tecnologías de bioetanol de "primera generación" en realidad no logra una reducción drástica en la emisión de gases de efecto invernadero. El ahorro neto es solo aproximadamente el 13% en comparación con el petróleo, cuando se contabilizan todos los aportes de combustibles fósiles con respecto a la producción final de etanol. Véase Farrell et al. (2006). Además, se han planteado objeciones tanto económicas como morales al mercado de bioetanol de "primera generación". Esto efectivamente coloca la demanda de cultivos como alimento humano en competencia directa con la demanda de automóviles personales. Y, de hecho, la demanda de etanol como combustible se ha asociado con el aumento de los precios de los cereales que han resultado problemáticos para los países pobres importadores de granos.

25

30

35

Ha surgido un gran interés en el desarrollo de sistemas de conversión de biomasa que no consumen cultivos alimenticios, la denominada biorrefinería de "segunda generación", mediante la cual se puede producir bioetanol y otros productos a partir de biomasa lignocelulósica, tal como los desechos de cultivos (cañas, corozos de maíz, huesos de frutas, tallos, cáscaras, bagazo, etc.), pastos, pajas, astillas de madera, papel usado y similares. En la tecnología de "segunda generación", los azúcares fermentables de 6 átomos de carbono (C6) derivados principalmente de celulosa y azúcares fermentables de 5 átomos de carbono (C5) derivados de hemicelulosa se liberan de cadenas poliméricas de polisacáridos de biomasa mediante hidrólisis enzimática o, en algunos casos, mediante hidrólisis química pura. Los azúcares fermentables obtenidos de la conversión de la biomasa en una biorrefinería de "segunda generación" pueden usarse para producir etanol combustible o, alternativamente, otros combustibles tales como butanol o monómeros de ácido láctico para usar en la síntesis de bioplásticos u otros muchos productos.

40

45

El rendimiento total de ambos azúcares C5 y C6 es una consideración central en la comercialización del procesamiento de biomasa lignocelulósica. En el caso de la producción de etanol, y también la producción de lactato u otros productos químicos, puede ser ventajoso combinar tanto corrientes de proceso de azúcar C5 como C6 en una solución de azúcar. Ya están disponibles los organismos fermentadores modificados que pueden consumir de manera eficiente tanto azúcares C5 como C6 en la producción de etanol. Véase, por ejemplo, Madhavan et al. (2012); Dumon et al. (2012); Hu et al. (2011); Kuhad et al. (2011); Ghosh et al. (2011); Kurian et al. (2010); Jojima et al. (2010); Sánchez et al. (2010); Bettiga et al. (2009); Matsushika et al. (2009).

50

55

Debido a las limitaciones de su estructura física, la biomasa lignocelulósica no se puede convertir efectivamente en azúcares fermentables mediante hidrólisis enzimática sin algún proceso de pretratamiento. Se ha informado una amplia variedad de diferentes esquemas de pretratamiento, cada uno de los cuales ofrece diferentes ventajas y desventajas. Para una revisión, véase Agbor et al. (2011); Girio et al. (2010); Alvira et al. (2010); Taherzadeh y Karimi (2008). Desde una perspectiva ambiental y de "capacidad de renovación", los pretratamientos hidrotérmicos son especialmente atractivos. Estos utilizan vapor presurizado/agua caliente líquida a temperaturas del orden de 160-230°C para fundir suavemente la lignina hidrófoba que está intrincadamente asociada a cadenas de celulosa, para solubilizar un componente principal de la hemicelulosa, rica en azúcares C5 y para romper las cadenas de celulosa a fin de mejorar la accesibilidad para la unión de enzimas productivas. Los pretratamientos hidrotérmicos se pueden integrar convenientemente con las plantas de generación de energía eléctrica existentes alimentadas con

60

65

carbón y biomasa para utilizar de manera eficiente el vapor de la turbina y la capacidad de producción de energía "excedente".

En el caso de procesos hidrotérmicos, es bien conocido en la técnica, y se ha discutido ampliamente, que el pretratamiento debe optimizarse entre propósitos conflictivos. Por un lado, el pretratamiento idealmente debería preservar el contenido de azúcar de hemicelulosa, a fin de maximizar el rendimiento final de azúcares derivados de hemicelulosa monomérica. Sin embargo, al mismo tiempo, el pretratamiento debe exponer suficientemente y acondicionar previamente las cadenas de celulosa a la susceptibilidad de la hidrólisis enzimática de manera que puedan obtenerse rendimientos razonables de azúcares derivados de la celulosa monomérica con un consumo enzimático mínimo. El consumo de enzimas también es una consideración central en la comercialización del procesamiento de biomasa, que se tambalea al borde de la "rentabilidad económica" en el contexto de las "economías de mercado globales", como se definen actualmente. A pesar de las mejoras dramáticas en los últimos años, el alto costo de las preparaciones de enzimas disponibles en el mercado sigue siendo uno de los costos operativos más altos en la conversión de biomasa.

A medida que aumentan las temperaturas de pretratamiento hidrotérmico y los tiempos de residencia en el reactor, se pierde irremediamente una mayor proporción de azúcares C5 derivados de hemicelulosa debido a la transformación química en otras sustancias, incluido furfural y productos de reacciones de condensación. Sin embargo, se requieren temperaturas y tiempos de residencia más altos para acondicionar adecuadamente las fibras de celulosa para una hidrólisis enzimática eficiente hasta glucosa monomérica de 6 carbonos.

En la técnica anterior, un parámetro de "severidad" de pretratamiento hidrotérmico que se usa a menudo es "R₀", que típicamente se denomina valor logarítmico. R₀ refleja una medida compuesta de la temperatura de pretratamiento y el tiempo de residencia en el reactor de acuerdo con la ecuación: $R_0 = t \cdot \text{EXP}[(T-100)/14,75]$ en la que t es el tiempo de residencia en minutos y T es la temperatura de reacción en grados centígrados. Se ha desarrollado una medida alternativa de la severidad del pretratamiento, el "número de xilano", que proporciona una correlación lineal negativa con el log de R₀ clásico, incluso a niveles muy bajos de "severidad". A diferencia de R₀, que es una descripción puramente empírica de las condiciones de pretratamiento, el número de xilano es un parámetro físico funcionalmente significativo. El número de xilano proporciona una medida del grado de pretratamiento que permite la comparación de materias primas de biomasa divergentes, en términos de recuperaciones de C5, independientemente de la severidad de R₀ a la que han estado sometidas.

Si la severidad del pretratamiento hidrotérmico se expresa en términos de "número de xilano" o "R₀", la optimización de las condiciones de pretratamiento para cualquier materia prima de biomasa dada requiere inherentemente algún compromiso entre las demandas de rendimientos elevados de azúcar C5 monomérico a partir de hemicelulosa (baja severidad) y las demandas de rendimientos elevados de azúcar C6 monomérico a partir de celulosa (alta severidad).

Los azúcares C5 derivados de hemicelulosa solubilizados durante el pretratamiento hidrotérmico incluyen típicamente una gran fracción de xilooligómeros, que inhiben fuertemente la catálisis de la enzima celulasa. Véase Shi et al. (2011); Quing y Wyman (2011); Quing et al. (2010). También se sabe que otros subproductos solubles de pretratamiento, que incluyen ácido acético y compuestos fenólicos derivados de lignina solubilizada, inhiben la catálisis de la enzima celulasa. Véase Kothari y Lee (2011); Ximenes et al. (2010). La presencia de niveles efectivos de inhibidores de enzimas aumenta el consumo de enzimas requerido para lograr un determinado grado de hidrólisis. En consecuencia, la "rentabilidad económica" de la conversión de biomasa a escala comercial favorece la minimización de la inhibición de la celulasa por compuestos solubles derivados del pretratamiento.

Se han informado una variedad de diferentes estrategias de pretratamiento hidrotérmico para maximizar los rendimientos de azúcares tanto de hemicelulosa como de celulosa y para minimizar la inhibición de xilooligómeros de la catálisis por celulasa. En algunos casos, se añaden ácidos o bases exógenos para catalizar la degradación de hemicelulosa (ácido, pH < 3,5) o la solubilización de la lignina (base, pH > 9,0). En otros casos, el pretratamiento hidrotérmico se realiza utilizando solo ácido acético muy suave derivado de la lignocelulosa misma (pH 3,5-9,0). Los pretratamientos hidrotérmicos bajo estas condiciones de pH suave se han denominado procesos de "autohidrólisis", ya que el ácido acético liberado a partir de los ésteres de hemicelulosa misma cataliza además la hidrólisis de hemicelulosa.

Los pretratamientos hidrotérmicos catalizados por ácido, conocidos como tratamientos de "ácido diluido" o "impregnación ácida", típicamente proporcionan altos rendimientos de azúcares C5, dado que la solubilización comparable de hemicelulosa puede producirse a temperaturas más bajas en presencia de un catalizador ácido. Los rendimientos totales de azúcar C5 después del pretratamiento con ácido diluido seguido de hidrólisis enzimática son típicamente del orden del 75% o superior de lo que teóricamente podría liberarse de cualquier materia prima dada de biomasa. Véase, por ejemplo, Baboukani et al. (2012); Won et al. (2012); Lu et al. (2009); Jeong et al. (2010); Lee et al. (2008); Sassner et al. (2008); Thomsen et al. (2006); Chung et al. (2005).

Los pretratamientos hidrotérmicos de autohidrólisis, por el contrario, típicamente proporcionan rendimientos mucho más bajos de azúcares C5, ya que se requiere pretratamiento a temperatura más alta en ausencia de catalizador ácido. Con excepción del pretratamiento de autohidrólisis llevado a cabo con un bajo contenido de materia seca

comercialmente poco realista, los tratamientos de autohidrólisis típicamente proporcionan rendimientos de azúcar C5 < 40% de la recuperación teórica. Véase, por ejemplo, Diaz et al. (2010); Dogaris et al. (2009). Se han informado rendimientos de C5 de la autohidrólisis de hasta el 53% en los casos en que se usaron tiempos de reacciones comercialmente poco realistas y dosis extremadamente altas de enzimas. Pero incluso estos altos rendimientos de C5 permanecen muy por debajo de los niveles que se obtienen rutinariamente usando pretratamiento con ácido diluido. Véase, por ejemplo, Lee et al. (2009); Ohgren et al. (2007).

Como consecuencia de menores rendimientos de C5 obtenidos con autohidrólisis, la mayoría de los informes relativos al pretratamiento hidrotérmico en sistemas comerciales de conversión de biomasa se han centrado en procesos con ácido diluido. Los rendimientos de azúcar C5 derivados de hemicelulosa del orden del 85% se han logrado mediante el uso de los llamados pretratamientos con ácido diluido de "dos etapas". En pretratamientos en dos etapas, se usa una temperatura inicial más baja para solubilizar hemicelulosa, después de lo cual se separa la fracción líquida rica en C5. En la segunda etapa, se usa una temperatura más alta para acondicionar las cadenas de celulosa. Véase, por ejemplo, Mesa et al. (2011); Kim et al. (2011); Chen et al. (2010); Jin et al. (2010); Monavari et al. (2009); Soderstrom et al. (2005); Soderstrom et al. (2004); Soderstrom et al. (2003); Kim et al. (2001); Lee et al. (1997); Papatheofanous et al. (1995). Un elaborado sistema de pretratamiento de ácido diluido de "dos etapas" informado por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL) de los EE.UU. afirma haber alcanzado rendimientos de C5 del orden del 90% utilizando como materia prima el rastrojo de maíz. Véase Humbird et al. (2011).

Se evita la inhibición de xilooligómeros de la catálisis por celulasa en sistemas ácidos diluidos debido a que la hidrólisis de xilooligómeros a xilosa monomérica es catalizada por el ácido añadido. La hidrólisis catalizada por ácido de xilooligómeros también se produce dentro de una corriente de proceso separada de esa corriente en la que los sólidos residuales están sujetos a hidrólisis enzimática.

A pesar de los menores rendimientos de C5 que proporciona, la autohidrólisis continúa ofreciendo ventajas competitivas frente a los pretratamientos con ácido diluido a escala comercial.

Lo más notable entre las ventajas de los procesos de autohidrólisis es que la lignina residual no hidrolizada ha mejorado enormemente el valor de mercado en comparación con la lignina recuperada a partir de procesos de ácido diluido. Primero, el ácido sulfúrico típicamente usado en el pretratamiento con ácido diluido imparte un contenido de azufre residual. Esto hace que la lignina resultante no sea atractiva para las centrales eléctricas comerciales que, de otro modo, tendrían tendencia a consumir gránulos de combustible de lignina sin azufre obtenidos de la autohidrólisis como una alternativa "verde" al carbón. En segundo lugar, la sulfonación de lignina que se produce durante los pretratamientos hidrotérmicos catalizados por ácido sulfúrico la hace comparativamente hidrofílica, aumentando así su capacidad mecánica de retención de agua. Esta hidrofiliencia aumenta el costo de secado de la lignina para uso comercial y también la hace poco apta para el almacenamiento en el exterior, dada su propensión a absorber humedad. Los llamados "modelos tecnoeconómicos" del proceso de NREL para la conversión de biomasa lignocelulósica, con pretratamiento con ácido diluido, ni siquiera dan cuenta de la lignina como un producto vendible, solo como una fuente interna de combustible para el vapor de proceso. Véase Humbird et al. (2011). Por el contrario, la "rentabilidad económica" de los esquemas de procesos que dependen de la autohidrólisis incluye una contribución significativa de la venta robusta de gránulos de lignina limpios y secos. Esto es especialmente significativo porque las materias primas de biomasa lignocelulósica blanda típicas comprenden una gran proporción de lignina, entre 10 y 40% del contenido de materia seca. Por lo tanto, incluso cuando los rendimientos de azúcar del proceso de los sistemas de autohidrólisis pueden disminuir en relación con los sistemas ácidos diluidos, la "rentabilidad" global puede seguir siendo equivalente o incluso mejor.

Los procesos de autohidrólisis también evitan otras desventajas bien conocidas del ácido diluido. El requerimiento de ácido sulfúrico diverge de una orientación filosófica que favorece el procesamiento "verde", introduce un costo operativo sustancial para el ácido como entrada de proceso, y crea una necesidad de sistemas elaborados de tratamiento de aguas residuales y también de costosos equipos anticorrosivos.

La autohidrólisis también es ventajosamente escalable a escenarios de procesamiento modestos. El proceso de ácido diluido descrito por NREL es tan complejo y elaborado que no puede establecerse de manera realista en una escala menor, solo en una escala gigantesca del orden de 100 toneladas de materia prima de biomasa por hora. Tal escala solo es apropiada en escenarios hipercentralizados de procesamiento de biomasa. Véase Humbird et al., (2011). El procesamiento hipercentralizado de la biomasa del rastrojo de maíz puede ser apropiado en los Estados Unidos, que tiene una abundancia de maíz genéticamente modificado cultivado en hiperproducción químicamente mejorada. Pero tal sistema es menos relevante en otras partes del mundo. Tal sistema es inapropiado para modestos escenarios de procesamiento de biomasa, por ejemplo, procesamiento en el sitio en campos de cultivo de caña de azúcar o aceite de palma o de sorgo, o procesamiento regional de paja de trigo, que típicamente produce mucha menos biomasa por hectárea que el maíz, incluso con ingeniería genética y mejoras químicas.

Los sistemas de autohidrólisis, en contraste con el ácido diluido, son legítimamente "verdes", fácilmente escalables, y no están sujetos a requisitos para sistemas elaborados de tratamiento de aguas residuales. Por consiguiente, es

ventajoso proporcionar sistemas de autohidrólisis mejorados, incluso cuando éstos pueden no ser obviamente ventajosos con respecto a los sistemas de ácido diluido en términos de rendimientos de azúcar solamente.

El problema de los pobres rendimientos de monómeros C5 con autohidrólisis ha impulsado en general a los proveedores comerciales de tecnología de procesamiento de biomasa lignocelulósica a buscar otros enfoques. Algunos sistemas de pretratamiento de "dos etapas", diseñados para proporcionar rendimientos mejorados de C5, se han informado con pretratamientos de autohidrólisis. Véase los documentos WO2010/113129; US2010/0279361; WO 2009/108773; US2009/0308383; US 8.057.639; US20130029406. En estos esquemas de pretratamiento de "dos etapas", parte de la fracción líquida rica en C5 se elimina mediante separación sólido/líquido después de un pretratamiento a temperatura más baja, seguido por un pretratamiento posterior a mayor temperatura de la fracción sólida. La mayoría de estas solicitudes de patente publicadas no informaron resultados experimentales reales. En su descripción de pretratamiento autohidrolítico de dos etapas en el documento WO2010/113129, Chemtex Italia informa un total de 26 ejemplos experimentales usando paja de trigo con una recuperación media de azúcar C5 del 52%. Estos valores de recuperación de C5 no distinguen entre la recuperación misma de C5 y los rendimientos de azúcar monomérica, que es el sustrato realmente consumido en la fermentación del etanol y otros productos útiles.

La introducción de una segunda etapa de pretratamiento en un esquema para procesar biomasa lignocelulósica introduce complejidades y costes adicionales. Por consiguiente, es ventajoso lograr sustancialmente las ventajas del pretratamiento en dos etapas usando un sistema simple de autohidrólisis en una sola etapa.

Hemos descubierto que, cuando el pretratamiento de autohidrólisis en una sola etapa se lleva a una severidad muy baja, pueden obtenerse rendimientos finales de monómero C5 inesperadamente altos del 60% de rendimiento teórico y superiores después de la hidrólisis enzimática, al mismo tiempo que se alcanzan rendimientos de glucosa razonables. Cuando las materias primas de biomasa se tratan previamente con un número de xilano del 10% o superior, una gran cantidad del contenido de xilano original permanece dentro de la fracción sólida. Contrariamente a las expectativas, este contenido de xilano residual muy elevado puede hidrolizarse enzimáticamente a xilosa monomérica, con alta recuperación, sacrificando solo un porcentaje muy pequeño de conversión de celulosa en glucosa.

En estos niveles de severidad muy bajos, la producción de subproductos solubles que afectan la actividad celulosa o los organismos fermentadores se mantiene tan baja que el material previamente tratado se puede usar directamente en la hidrólisis enzimática y la fermentación posterior, normalmente sin necesidad de ningún lavado u otra etapa de detoxificación.

La inhibición de la catálisis por celulosa mediante xilooligómeros o por otros productos solubles en la fracción líquida se puede evitar fácilmente en el proceso. Una etapa de separación sólido/líquido después del pretratamiento genera una fracción líquida y una fracción sólida. La fracción líquida rica en C5 se mantiene por separado en "derivación" de la fracción sólida durante la hidrólisis enzimática. Después de la hidrólisis enzimática de la fracción sólida, se añade fracción líquida al hidrolizado y se somete a una hidrólisis posterior mediante las enzimas xilanasas activas restantes. Los xilooligómeros dentro de la fracción líquida se hidrolizan de este modo hasta xilosa monomérica solo después de que la actividad celulosa ya no sea necesaria. El hidrolizado combinado resultante y el hidrolizado posterior que comprende tanto azúcares monoméricos C5 como C6 derivados tanto de celulosa como de hemicelulosa se pueden fermentar directamente hasta etanol mediante levadura modificada.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un método de procesamiento de biomasa lignocelulósica que comprende:

- Proporcionar materia prima de biomasa lignocelulósica blanda,
- Pretratar la materia prima a pH dentro del intervalo de 3,5 a 9,0 en un pretratamiento hidrotérmico presurizado de una sola etapa con un contenido de MS de por lo menos 35% a temperaturas entre 160 y 200°C para tiempos de residencia de menos de 60 minutos, de modo que la biomasa pretratada se caracteriza por tener un número de xilano del 10% o superior,
- Separar la biomasa pretratada en una fracción sólida y una fracción líquida,
- Hidrolizar la fracción sólida con o sin adición de contenido suplementario de agua al 15% de MS o más durante un tiempo entre 24 y 150 horas usando hidrólisis enzimática catalizada por una mezcla de enzimas que comprende endoglucanasa, exoglucanasa, B-glucosidasa, endoxilanasas, xilosidasas y actividad acetil xilanol esterasa, y
- Mezclar posteriormente la fracción líquida separada y la fracción sólida hidrolizada después de haber obtenido por lo menos un 50% de conversión de celulosa en glucosa y realizando después una hidrólisis durante un período de por lo menos 6 horas, por lo que los xilooligómeros en la fracción líquida se degradan a xilosa monomérica por la acción de la actividad enzimática restante dentro de la fracción sólida hidrolizada.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el número de xilano como una función del factor de severidad de pretratamiento para materias primas de biomasa lignocelulósica blanda sujetas a pretratamiento de autohidrólisis.

La Figura 2 muestra la recuperación de C5 en forma soluble e insoluble en función del número de xilano para materias primas de biomasa lignocelulósica blanda sometidas a pretratamiento de autohidrólisis.

La Figura 3 muestra la recuperación total de C5 en función del número de xilano para materias primas de biomasa lignocelulósica blanda sujetas a pretratamiento de autohidrólisis.

La Figura 4 muestra la producción de ácido acético, furfural y 5-HMF en función del número de xilano para materias primas de biomasa lignocelulósica blanda sometidas a pretratamiento de autohidrólisis.

La Figura 5 muestra el efecto de la eliminación de sólidos disueltos en la conversión de celulosa para materias primas de biomasa lignocelulósica blanda sometidas a un pretratamiento de autohidrólisis de muy baja severidad.

La Figura 6 muestra la caracterización por HPLC de la fracción líquida a partir de materias primas de biomasa lignocelulósica blanda sometidas a un pretratamiento de autohidrólisis de muy baja severidad.

La Figura 7 muestra la recuperación de azúcar C5 en función del tiempo en el que la fracción sólida está sujeta a la hidrólisis enzimática seguida de la introducción de la fracción líquida para la hidrólisis posterior.

La Figura 8 muestra el perfil de fermentación de la fermentación de etanol por una cepa de levadura modificada utilizando paja de trigo que fue pretratada por autohidrólisis de muy baja severidad, hidrolizada enzimáticamente y utilizada como fracción líquida y sólida combinada sin destoxificación para eliminar los inhibidores de la fermentación.

La Figura 9 muestra un esquema de proceso para una realización.

Descripción detallada de la invención

En algunas realizaciones, la descripción proporciona métodos de procesamiento de biomasa lignocelulósica que comprende:

- Proporcionar materia prima de biomasa lignocelulósica blanda,
- Pretratar la materia prima a pH dentro del intervalo de 3,5 a 9,0 en un pretratamiento hidrotérmico presurizado de una etapa a una severidad muy baja de manera que la biomasa pretratada se caracterice por tener un número de xilano del 10% o superior,
- Separar la biomasa pretratada en una fracción sólida y una fracción líquida,
- Hidrolizar la fracción sólida con o sin adición de contenido suplementario de agua usando hidrólisis enzimática catalizada por una mezcla de enzimas que comprende actividades de endoglucanasa, exoglucanasa, B-glucosidasa, endoxilanasas, xilosidasas y acetil xilano esterasa, y
- Mezclar posteriormente la fracción líquida separada y la fracción sólida hidrolizada, mediante lo cual los xilooligómeros en la fracción líquida se degradan hasta xilosa monomérica por la acción de actividades enzimáticas que permanecen dentro de la fracción sólida hidrolizada.

Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

"Aproximadamente" tal como se usa en la presente memoria con referencia a un número o intervalo cuantitativo se refiere a +/- 10% en términos relativos del número o intervalo al que se hace referencia.

"Autohidrólisis" se refiere a un proceso de pretratamiento en el que el ácido acético liberado por hidrólisis de hemicelulosa durante el pretratamiento cataliza adicionalmente la hidrólisis de hemicelulosa, y se aplica a cualquier pretratamiento hidrotérmico de biomasa lignocelulósica realizado a pH entre 3,5 y 9,0.

"Preparación de celulosa disponible comercialmente optimizada para conversión de biomasa lignocelulósica" se refiere a una mezcla comercialmente disponible de actividades enzimáticas que es suficiente para permitir hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica pretratada y que comprende endocelulasa (endoglucanasa), exocelulasa (exoglucanasa), endoxilanasas, actividades de acetil xilano esterasa, xilosidasas y B-glucosidasa. El término "optimizado para conversión de biomasa lignocelulósica" se refiere a un proceso de desarrollo de productos en el que se han seleccionado y/o modificado mezclas de enzimas para el propósito específico de mejorar los

rendimientos de hidrólisis y/o reducir el consumo de enzimas en hidrólisis de biomasa lignocelulósica pretratada hasta azúcares fermentables.

5 La realización del pretratamiento "a" un nivel de materia seca se refiere al contenido de materia seca de la materia prima al comienzo del pretratamiento hidrotérmico presurizado. El pretratamiento se realiza "a" un pH en el que el pH del contenido acuoso de la biomasa es ese pH al inicio del pretratamiento hidrotérmico presurizado.

10 "Materia seca", que también aparece como MS, se refiere a sólidos totales, tanto solubles como insolubles, y significa efectivamente "contenido no acuoso". El contenido de materia seca se mide por secado a 105°C hasta que se alcanza un peso constante.

La "estructura de fibra" se mantiene en la medida en que el tamaño medio de los fragmentos de fibra después del pretratamiento es > 750 µm.

15 "Pretratamiento hidrotérmico" se refiere al uso de agua, ya sea como líquido caliente, vapor o vapor presurizado que comprende líquido o vapor a alta temperatura o ambos, para "cocinar" biomasa, a temperaturas de 120°C o más, ya sea con o sin adición de ácidos u otros productos químicos.

20 El "pretratamiento hidrotérmico presurizado de una etapa" se refiere a un pretratamiento en el que la biomasa está sometida a pretratamiento hidrotérmico presurizado en un único reactor configurado para calentar biomasa en una sola pasada y en la que no se aplica pretratamiento hidrotérmico presurizado adicional después de una etapa de separación sólido/líquido para eliminar la fracción líquida de la materia prima sujeta al pretratamiento hidrotérmico presurizado.

25 La "separación sólido/líquido" se refiere a un proceso mecánico activo por el cual el líquido se separa del sólido mediante la aplicación de fuerza a través del prensado, fuerza centrífuga u otra fuerza.

"Biomasa lignocelulósica blanda" se refiere a biomasa vegetal distinta de la madera que contiene celulosa, hemicelulosa y lignina.

30 "Fracción sólida" y "Fracción líquida" se refieren al fraccionamiento de biomasa pretratada en la separación sólido/líquido. El líquido separado se denomina colectivamente "fracción líquida". La fracción residual que comprende un contenido sólido insoluble considerable se denomina "fracción sólida". Una "fracción sólida" tendrá un contenido de materia seca y típicamente también comprenderá un residuo considerable de "fracción líquida".

35 "Rendimiento teórico" se refiere a la masa molar equivalente de azúcares monoméricos puros obtenidos a partir de celulosa polimérica, o a partir de estructuras de hemicelulosa poliméricas, en la que los azúcares monoméricos constituyentes también pueden estar esterificados o sustituidos de otro modo. Los "rendimientos de monómero C5" como porcentaje del rendimiento teórico se determinan de la siguiente manera: antes del pretratamiento, la materia prima de biomasa se analiza para determinar los carbohidratos utilizando el método de hidrólisis con ácido fuerte de Sluiter et al. (2008) usando una columna de HPLC y un sistema de elución en el que la galactosa y la manosa eluyen junto con la xilosa. Ejemplos de tales sistemas incluyen una columna REZEX^{MR} Monossacharide H+ de Phenomenex y una columna AMINEX HPX 87C^{MR} de Biorad. Durante la hidrólisis ácida fuerte, se eliminan ésteres y sustituciones sensibles al ácido. Excepto que se especifique lo contrario, la cantidad total de "xilosa" + arabinosa, determinada en la biomasa no pretratada, se toma como 100% de recuperación teórica de monómero C5, que se puede denominar colectivamente "recuperación de monómero C5". Las determinaciones de azúcar monómero se realizan usando la caracterización por HPLC basada en curvas estándar con estándares externos purificados. La recuperación real del monómero C5 se determina mediante la caracterización por HPLC de muestras para la medición directa de monómeros C5, que luego se expresan como un porcentaje del rendimiento teórico.

50 "Número de xilano" se refiere a una caracterización de la biomasa pretratada determinada de la siguiente manera: la biomasa pretratada está sujeta a separación sólido/líquido para proporcionar una fracción sólida con aproximadamente 30% de sólidos totales y una fracción líquida. Esta fracción sólida se lava luego parcialmente mezclando con agua a 70°C en la relación de sólidos totales (MS) a agua de 1:3 peso:peso. La fracción sólida lavada de esta manera se prensa hasta aproximadamente 30% de sólidos totales. El contenido de xilano de la fracción sólida lavada de esta manera se determina usando el método de A. Sluiter, et al., "Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass", Procedimiento Analítico de Laboratorio (LAP) del Laboratorio Nacional de Energía Renovable de los Estados Unidos (NREL) con fecha de publicación 25 de abril de 2008, como se describe en el Informe técnico NREL/TP-510-42618, revisado en abril de 2008. Se usa una columna de HPLC y un sistema de elución en el que la galactosa y la manosa eluyen conjuntamente con xilosa. Ejemplos de tales sistemas incluyen una columna REZEX^{MR} Monossacharide H+ de Phenomenex y una columna AMINEX HPX 87C^{MR} de Biorad. Esta medida del contenido de xilano como se describe incluirá alguna contribución del material soluble de la fracción líquida residual que no se elimina por lavado de la fracción sólida en estas condiciones. Por consiguiente, el "número de xilano" proporciona una medición de la "combinación ponderada" del contenido de xilano residual dentro de sólidos insolubles y del contenido de xilosa soluble y de xilooligómero dentro de la "fracción líquida".

Se puede usar cualquier biomasa lignocelulósica blanda adecuada, incluyendo biomasa tales como por lo menos paja de trigo, rastrojo de maíz, mazorcas de maíz, racimos vacíos de frutas, paja de arroz, paja de avena, paja de cebada, paja de canola, paja de centeno, sorgo, sorgo dulce, rastrojo de soja, pasto varilla, pasto Bermuda y otros pastos, bagazo, pulpa de remolacha, fibra de maíz o cualquier combinación de los mismos. La biomasa lignocelulósica puede comprender otros materiales lignocelulósicos tales como papel, papel periódico, cartón u otros desechos municipales u de oficina. La biomasa lignocelulósica puede usarse como una mezcla de materiales que se originan a partir de diferentes materias primas, puede ser fresca, parcialmente seca, completamente seca o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, los métodos de la invención se ponen en práctica usando por lo menos aproximadamente 10 kg de materia prima de biomasa, o por lo menos 100 kg, o por lo menos 500 kg.

La biomasa lignocelulósica comprende fibrillas de celulosa cristalina intercaladas dentro de una matriz de hemicelulosa flojamente organizada y selladas dentro de un ambiente rico en lignina hidrófoba. Mientras que la celulosa misma comprende polímeros largos de cadena lineal de D-glucosa, la hemicelulosa es una mezcla heterogénea de carbohidratos de cadena corta y ramificada que incluyen monómeros de todas las aldopentosas de 5 carbonos (azúcares C5) así como algunos azúcares de 6 carbonos (C6) incluyendo glucosa y manosa. La lignina es un polímero altamente heterogéneo, que carece de cualquier estructura primaria particular, y que comprende monómeros fenilpropanoides hidrófobos.

La biomasa lignocelulósica adecuada comprende típicamente celulosa en cantidades entre 20 y 50% de masa seca antes del pretratamiento, lignina en cantidades entre 10 y 40% de masa seca antes del pretratamiento, y hemicelulosa en cantidades entre 15 y 40%.

En algunas realizaciones, las materias primas de biomasa pueden someterse a reducción de tamaño de partícula y/u otro procesamiento mecánico tal como molienda, trituración, corte u otros procesos antes del pretratamiento hidrotérmico. En algunas realizaciones, las materias primas de biomasa pueden lavarse y/o lixiviarse de sales valiosas antes del pretratamiento presurizado, como se describe en Knudsen et al. (1998). En algunas realizaciones, las materias primas pueden empaparse antes del pretratamiento presurizado a temperaturas de hasta 99°C.

En algunas realizaciones, la materia prima se empapa primero en una solución acuosa antes del pretratamiento hidrotérmico. En algunas realizaciones, puede ser ventajoso remojar la materia prima en un líquido que contiene ácido acético obtenido a partir de una etapa posterior en los pretratamientos, como se describe en el documento US 8.123.864. Es ventajoso realizar el tratamiento con el mayor contenido posible de materia seca, como se describe en el documento US 12/935.587. La realización del pretratamiento con alto contenido de materia seca evita el gasto de energía del proceso al calentar agua innecesaria. Sin embargo, se requiere algo de contenido de agua para lograr rendimientos de azúcar eventualmente óptimos a partir de la hidrólisis enzimática. Típicamente, es ventajoso pretratar materias primas de biomasa en o cerca de su capacidad inherente de retención de agua. Este es el nivel de contenido de agua que una materia prima determinada alcanzará después de sumergirla en un exceso de agua seguido de presión hasta los límites mecánicos de una prensa de tornillo comercial común, típicamente entre 30 y 45% de MS. En algunas realizaciones, el pretratamiento hidrotérmico se realiza a un contenido de MS de por lo menos 35%. Un experto en la materia entenderá fácilmente que el contenido de MS puede disminuir durante el pretratamiento hidrotérmico ya que se agrega algo de contenido de agua durante el calentamiento. En algunas realizaciones, las materias primas se tratan previamente a un contenido de MS de por lo menos 20%, o por lo menos 25%, o por lo menos 30%, o por lo menos 40%, o 40% o menos, o 35% o menos, o 30% o menos.

En algunas realizaciones, el remojo/empapamiento con una solución acuosa puede servir para ajustar el pH antes del pretratamiento en el intervalo de entre 3,5 y 9,0, que es típicamente ventajoso para la autohidrólisis. Se entenderá fácilmente que el pH puede cambiar durante el pretratamiento, típicamente a niveles más ácidos a medida que se libera ácido acético a partir de hemicelulosa solubilizada.

En algunas realizaciones, el pretratamiento hidrotérmico se realiza sin oxígeno suplementario según se requiera para los pretratamientos de oxidación en húmedo, o sin la adición de disolvente orgánico como se requiere para el pretratamiento con disolvente orgánico, o sin el uso de calentamiento por microondas como se requiere para pretratamientos con microondas. En algunas realizaciones, el pretratamiento hidrotérmico se realiza a temperaturas de 140°C o más, o a 150°C o más, o a 160°C o más, o entre 160 y 200°C, o entre 170 y 190°C, o a 180°C o menos, o a 170°C o menos.

En algunas realizaciones, puede eliminarse algo de contenido de C5 mediante una etapa de remojo antes del pretratamiento presurizado. En algunas realizaciones, el reactor individual puede configurarse para calentar biomasa a una temperatura objetivo única. Alternativamente, el reactor individual puede configurarse para efectuar un gradiente de temperatura dentro del reactor de manera que la biomasa se expone, durante una sola etapa, a más de una región de temperatura. En algunas realizaciones, puede ser ventajoso eliminar parcialmente algunos componentes de biomasa solubilizados del interior del reactor presurizado durante el transcurso del pretratamiento.

Los reactores de pretratamiento hidrotérmico adecuados incluyen típicamente la mayoría de los reactores de reducción a pasta conocidos en la industria de la pasta y el papel. En algunas realizaciones, el pretratamiento

hidrotérmico se administra mediante vapor dentro de un reactor presurizado a 10 bar o inferior, o a 12 bar o inferior, o a 4 bar o superior, u 8 bar o superior, o entre 8 y 18 bar, o entre 18 y 20 bar. En algunas realizaciones, el reactor de pretratamiento está configurado para un flujo de entrada continuo de materia prima.

5 En algunas realizaciones, la biomasa humedecida se transporta a través del reactor, bajo presión, durante un cierto tiempo o "tiempo de residencia". El tiempo de residencia se mantiene ventajosamente breve para facilitar un mayor rendimiento de biomasa. Sin embargo, la severidad del pretratamiento obtenida está determinada tanto por la temperatura como también por el tiempo de residencia. La temperatura durante el pretratamiento hidrotérmico se mantiene ventajosamente más baja, no solo porque los métodos de la invención pretenden obtener una severidad
10 de pretratamiento muy baja, sino también porque se pueden conseguir temperaturas más bajas usando presiones de vapor más bajas. En la medida en que la temperatura de pretratamiento puede estar a niveles de 180°C o inferiores y, en consecuencia, las presiones de vapor saturado se mantienen a 10 bar o inferiores, se experimenta una menor tendencia a la corrosión y se pueden usar accesorios de presión de grado mucho más bajo y composiciones de acero, lo que reduce los costos de capital de la planta. En algunas realizaciones, el reactor está configurado para
15 calentar biomasa a una única temperatura objetivo entre 160 y 200°C, o entre 170 y 190°C. Los tiempos de residencia en algunas realizaciones son inferiores a 60, o inferiores a 30, o inferiores a 20, o inferiores a 15, o inferiores a 14, o inferiores a 13, o inferiores a 12, o inferiores a 10, o inferiores a 8, o inferiores a 5 minutos.

20 Las materias primas de biomasa pueden cargarse desde la presión atmosférica a un reactor presurizado por una variedad de medios. En algunas realizaciones, se puede usar un sistema de "bomba de partículas" de tipo exclusiva para cargar materias primas de biomasa, tal como el sistema descrito en el documento US 13/062.522. En algunas realizaciones, puede ser ventajoso cargar un reactor de pretratamiento usando un alimentador llamado "tapón de rosca".

25 La biomasa pretratada puede descargarse de un reactor presurizado por una variedad de medios. En algunas realizaciones, la biomasa pretratada se descarga de tal manera que se preserve la estructura de fibra del material. Preservar la estructura de fibra de la biomasa pretratada es ventajoso porque permite presionar la fracción sólida del material previamente tratado durante la separación sólido/líquido a niveles comparativamente altos de materia seca utilizando equipos ordinarios de prensa de tornillo, y evitando así el gasto adicional y la complejidad de los sistemas
30 de prensa de filtro de membrana.

La estructura de la fibra se puede mantener removiendo la materia prima del reactor presurizado de una manera que no sea explosiva. En algunas realizaciones, puede llevarse a cabo la remoción no explosiva y la estructura de la fibra se mantiene de ese modo usando un sistema de tipo exclusiva, tal como el descrito en el documento US
35 13/043.486. En algunas realizaciones, puede llevarse a cabo la remoción no explosiva y la estructura de la fibra se mantiene de ese modo usando un sistema de remoción de hidrociclones, tal como los descritos en el documento US 12/996.392.

40 En algunas realizaciones, la biomasa pretratada se puede remover de un reactor de pretratamiento presurizado usando "explosión de vapor", que implica la liberación explosiva del material previamente tratado. La biomasa pretratada explotada al vapor no retiene su estructura de fibra y requiere sistemas de separación sólido/líquido más elaborados para lograr un contenido de materia seca comparable al que se puede lograr utilizando sistemas de prensa de tornillo ordinarios con biomasa pretratada que conserva su estructura de fibra.

45 La materia prima de biomasa se trata previamente con una severidad muy baja, de manera que la biomasa pretratada se caracteriza por tener un número de xilano de 10% o superior. En algunas realizaciones, la biomasa se trata previamente con un número de xilano de 11% o superior, o 12% o superior, o 13% o superior, o 14% o superior, o 15% o superior, o 16% o superior, o 17% o superior. El parámetro "número de xilano" se refiere a una medición compuesta que refleja una combinación ponderada del contenido residual de xilano que permanece en los
50 sólidos insolubles y también la concentración de xilosa y xilooligómeros solubles dentro de la fracción líquida. A una severidad R_0 inferior, el número de xilano es mayor. Por lo tanto, el número más alto de xilano se refiere a la severidad de pretratamiento más baja. El número de xilano proporciona una correlación lineal negativa con la medición de severidad convencional $\log R_0$ incluso de muy baja severidad, donde el contenido residual de xilano en sólidos insolubles es del 10% o superior.

55 El número de xilano es particularmente útil como una medida de la severidad del pretratamiento en el sentido de que las diferentes materias primas de biomasa pretratadas que tienen un número de xilano equivalente exhiben una recuperación equivalente de monómero C5. Por el contrario, la severidad R_0 convencional es simplemente una descripción empírica de las condiciones de pretratamiento, que no proporciona una base racional para las
60 comparaciones entre diferentes materias primas de biomasa. Por ejemplo, la autohidrólisis de una sola etapa para severidad $\log R_0 = 3,75$ proporciona bagazo de caña de azúcar pretratado y rastrojo de maíz que tiene un número de xilano de entre 6-7%, mientras que con cepas de paja de trigo típicas, el número de xilano resultante de materia prima pretratada es de aproximadamente 10%.

65 Es ventajoso que las materias primas de biomasa se traten previamente con una severidad muy baja en donde el número de xilano de la materia prima pretratada sea del 10% o superior. Este nivel de severidad muy bajo

5 corresponde a un proceso en el que se minimiza el contenido de hemicelulosa total de la materia prima antes del pretratamiento que se solubiliza o se pierde irremediablemente durante el pretratamiento. Con un número de xilano del 10% y superior, con variedades típicas de paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, bagazo de sorgo dulce, rastrojo de maíz y racimos de fruta vacíos (de palma aceitera), por lo menos 60% del contenido original de C5 de la materia prima puede ser recuperado después del pretratamiento de autohidrólisis en una sola etapa, donde se tienen en cuenta tanto el xilano en la fracción sólida como también la xilosa y los xilooligómeros solubles en la fracción líquida.

10 Hemos descubierto inesperadamente que pueden obtenerse rendimientos finales altos de monómero C5 de por lo menos 55% teórico, o por lo menos 60%, o por lo menos 65%, sin pérdida apreciable de los rendimientos de monómero C6 después de la hidrólisis enzimática de materias primas pretratadas a muy baja severidad por autohidrólisis en una sola etapa. A niveles de severidad muy bajos, una gran fracción del contenido de hemicelulosa de la materia prima permanece dentro de la fracción sólida después del pretratamiento, donde posteriormente puede hidrolizarse hasta monómeros C5 con alta recuperación usando hidrólisis enzimática.

15 Debe observarse que los informes relativos a la "recuperación de xilosa" a menudo se expresan en términos que no son comparables a las recuperaciones de xilosa que se informan aquí. Por ejemplo, Ohgren et al. (2007) y Lee et al. (2009) reportan altas recuperaciones de xilosa. Pero estos valores se refieren solo a la recuperación de xilosa de biomasa pretratada, no expresada como un porcentaje del contenido de hemicelulosa original de la materia prima antes del pretratamiento. O, por ejemplo, el documento WO2010/113129 se refiere a la recuperación de hemicelulosa como un porcentaje del contenido de hemicelulosa de la materia prima antes del pretratamiento, pero no especifica el rendimiento de monómero, que invariablemente es menor que la recuperación de hemicelulosa total.

20 Otra característica sorprendente de la biomasa que se ha tratado previamente mediante autohidrólisis de etapa única a niveles de severidad muy bajos es que las concentraciones de subproductos de pretratamiento que sirven como inhibidores de organismos fermentadores se mantienen a niveles muy bajos. Como consecuencia, típicamente es posible usar biomasa hidrolizada obtenida por métodos de la invención directamente en fermentaciones, sin necesidad de ningún lavado u otra etapa de destoxificación.

25 Como es bien sabido en la técnica, el pretratamiento hidrotérmico de autohidrólisis produce típicamente una diversidad de subproductos solubles que actúan como "inhibidores de la fermentación", ya que estos inhiben el crecimiento y/o el metabolismo de organismos fermentadores. Diferentes inhibidores de la fermentación se producen en diferentes cantidades, dependiendo de las propiedades de la materia prima lignocelulósica y de la severidad del pretratamiento. Véase Klinke et al. (2004). Al menos tres categorías de inhibidores de la fermentación se forman típicamente durante el pretratamiento de autohidrólisis: (1) furanos, principalmente 2-furfural y 5-HMF (5-hidroximetilfurfural) que son productos de degradación de mono u oligosacáridos; (2) fenoles monoméricos, que son productos de degradación de la estructura de lignina; y (3) ácidos orgánicos pequeños, principalmente ácido acético, que se originan a partir de grupos acetilo en hemicelulosas, y lignina. Se ha demostrado que la mezcla de diferentes inhibidores actúa sinérgicamente en la fermentación de bioetanol usando cepas de levadura, véase, por ejemplo, Palmquist et al. (1999), y, también, usando *Escherichia coli* etanólica, véase, por ejemplo, Zaldivar et al. (1999). En algunas realizaciones, puede ser ventajoso someter la biomasa pretratada a evaporación ultrarrápida, usando métodos bien conocidos en la técnica, para reducir los niveles de inhibidores volátiles, más notablemente furfural. Usando autohidrólisis con cepas típicas de materias primas de biomasa tales como paja de trigo, bagazo de sorgo dulce, bagazo de caña de azúcar, rastrojo de maíz y racimos de fruta vacíos previamente tratados con xilano al 10% o superior, en nuestra experiencia solo los niveles de ácido acético y furfural son potencialmente inhibitorios de organismos fermentativos. Cuando las materias primas de biomasa se tratan previamente con 35% de MS o superior a un número de xilano del 10% o superior, y donde la fracción sólida se hidroliza enzimáticamente hasta 25% o menos de MS, con agua añadida para ajustar la MS pero sin etapas de lavado, los niveles de furfural en el hidrolizado típicamente puede mantenerse por debajo de 3 g/kg y los niveles de ácido acético por debajo de 9 g/kg. Estos niveles son típicamente aceptables para fermentaciones de levadura usando cepas especializadas. Durante la hidrólisis enzimática, se libera algo de ácido acético adicional por la degradación de la hemicelulosa en la fracción sólida. En algunas realizaciones, puede ser ventajoso eliminar algo del contenido de ácido acético de la fracción líquida y/o la fracción sólida hidrolizada usando electrodiálisis u otros métodos conocidos en la técnica.

30 Se pueden pretratar diferentes materias primas usando autohidrólisis en una sola etapa a un número de xilano del 10% o superior mediante una variedad de diferentes combinaciones de tiempos de residencia en el reactor y temperaturas. Un experto en la técnica determinará fácilmente mediante experimentación de rutina un procedimiento de pretratamiento apropiado para aplicar con cualquier materia prima dada, usando cualquier reactor dado, y con cualquier sistema dado de carga y descarga del reactor de biomasa. Cuando las materias primas se tratan previamente usando un reactor continuo, cargado mediante un sistema de exclusiva o un alimentador de tornillo y descargado por un sistema de exclusiva de "bomba de partículas" o un sistema de hidrociclón, la severidad muy baja del 10% o superior del número de xilano puede lograrse utilizando cepas típicas de paja de trigo o racimos de fruta vacíos a una temperatura de 180°C y un tiempo de residencia en el reactor de 24 minutos. Para cepas típicas de rastrojo de maíz, bagazo de caña de azúcar y bagazo de sorgo dulce, típicamente se puede lograr una severidad muy baja del 10% o superior del número de xilano usando una temperatura de 180°C y un tiempo de residencia en el reactor de 12 minutos o usando una temperatura de 175°C y un tiempo de residencia en el reactor de 17 minutos.

Un experto en la técnica entenderá fácilmente que los tiempos de residencia y las temperaturas pueden ajustarse para alcanzar niveles comparables de severidad R_o.

Después del pretratamiento, la biomasa pretratada se separa en una fracción sólida y una fracción líquida mediante una etapa de separación sólido/líquido. Se entenderá fácilmente que la "fracción sólida" y la "fracción líquida" pueden subdividirse o procesarse adicionalmente. En algunas realizaciones, la biomasa se puede remover de un reactor de pretratamiento al mismo tiempo que la separación sólido/líquido. En algunas realizaciones, la biomasa pretratada está sujeta a una etapa de separación sólido/líquido después de que ha sido descargada del reactor, típicamente usando un sistema de prensa de tornillo simple y de bajo costo, para generar una fracción sólida y una fracción líquida. Las actividades enzimáticas de la celulosa se inhiben por la fracción líquida, más notablemente debido al contenido de xilooligómeros, pero posiblemente también debido al contenido de fenol y/u otros compuestos aún no identificados. Por consiguiente, es ventajoso lograr los niveles más altos practicables de contenido de materia seca en la fracción sólida o, alternativamente, eliminar la cantidad más alta practicable de sólidos disueltos de la fracción sólida. En algunas realizaciones, la separación sólido/líquido consigue una fracción sólida que tiene un contenido de MS de por lo menos 40%, o por lo menos 45%, o por lo menos 50%, o por lo menos 55%. La separación sólido/líquido usando sistemas ordinarios de prensa de tornillo puede alcanzar típicamente niveles de MS de hasta el 50% en la fracción sólida, siempre que la materia prima de biomasa haya sido pretratada de tal manera que se mantenga la estructura de la fibra. En algunas realizaciones, puede ser ventajoso incurrir en mayores gastos de capital en la planta con el fin de lograr una separación sólido/líquido más efectiva, por ejemplo, usando un sistema de prensa de filtro de membrana. En algunas realizaciones, los sólidos disueltos se pueden remover de una fracción sólida mediante lavado en serie y prensado o mediante técnicas de lavado por desplazamiento conocidas en la técnica de procesamiento de pulpa y papel. En algunas realizaciones, ya sea por separación sólido/líquido directamente, o por alguna combinación de lavado y separación sólido/líquido, el contenido de sólidos disueltos de la fracción sólida se reduce en por lo menos 50%, o por lo menos 55%, o por lo menos 60%, o por lo menos 65%, o por lo menos 70%, o por lo menos 75%.

La hidrólisis enzimática de materias primas pretratadas con número de xilano del 10% o superior puede realizarse típicamente con un consumo de enzima comercialmente razonable, sin necesidad de etapas específicas de lavado o destoxificación, donde la fracción sólida se prensa hasta por lo menos 40% de MS o donde el contenido de sólidos disueltos de la fracción sólida se reduce por lo menos en un 50%.

La fracción líquida obtenida de la separación sólido/líquido se mantiene separada de la fracción sólida durante la hidrólisis enzimática de la fracción sólida. Llamamos a esta separación temporal "derivación de C5". La fracción líquida obtenida de materias primas de biomasa lignocelulósica blanda tales como cepas típicas de paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, bagazo de sorgo dulce, rastrojo de maíz y racimos de fruta vacíos previamente tratados mediante autohidrólisis de etapa única con número de xilano del 10% o superior típicamente comprenden un pequeño componente de monómeros C6 (1x), principalmente glucosa con algunos otros azúcares; un componente más grande de oligómeros C6 solubles (aproximadamente 2x-7x); un componente más grande de monómeros C5 (aproximadamente 4x-8x), principalmente xilosa con algo de arabinosa y otros azúcares; y un componente mucho más grande de xilooligómeros solubles (aproximadamente 18x-30x). Los xilooligómeros solubles incluyen típicamente xilohexosa, xilopentosa, xilotetraosa, xilotriosa y xilobiosa con algunos oligómeros de cadena superior.

La fracción sólida se somete a hidrólisis enzimática usando una mezcla de actividades enzimáticas. Como entenderá fácilmente un experto en la técnica, la composición de mezclas de enzimas adecuadas para poner en práctica los métodos de la invención puede variar dentro de límites comparativamente amplios. Las preparaciones enzimáticas adecuadas incluyen preparaciones de celulosa comercialmente disponibles optimizadas para la conversión de biomasa lignocelulósica. La selección y modificación de mezclas de enzimas durante la optimización puede incluir técnicas de ingeniería genética, por ejemplo tales como las descritas por Zhang et al. (2006) o por otros métodos conocidos en la técnica. Las preparaciones de celulosa comercialmente disponibles optimizadas para la conversión de biomasa lignocelulósica son típicamente identificadas por el fabricante y/o proveedor como tales. Estos son típicamente distintos de las preparaciones de celulosa comercialmente disponibles para uso general u optimizados para su uso en la producción de piensos, alimentos, detergentes textiles o en la industria del papel. En algunas realizaciones, se usa una preparación de celulosa comercialmente disponible optimizada para la conversión de biomasa lignocelulósica proporcionada por GENENCOR^{MR} y que comprende exoglucanasas, endoglucanasas, endoxilanasas, xilosidasas, acetil xilano esterasas y beta glucosidasas aisladas de fermentaciones de *Trichoderma reesei* genéticamente modificado, tales como por ejemplo, la preparación comercial de celulosa comercializada bajo la marca comercial ACCELLERASE TRIO^{MR}. En algunas realizaciones, se usa una preparación de celulosa comercialmente disponible optimizada para la conversión de biomasa lignocelulósica proporcionada por NOVOZYMES^{MR} y que comprende exoglucanasas, endoglucanasas, endoxilanasas, xilosidasas, acetil-xilano-esterasas y beta-glucosidasas, tales como, por ejemplo, las preparaciones comerciales de celulosa vendidas bajo cualquiera de las marcas registradas CELLIC CTEC2^{MR} o CELLIC CTEC3^{MR}.

Las actividades enzimáticas representadas en tres preparaciones de celulosa comercialmente disponibles optimizadas para la conversión de biomasa lignocelulósica se analizaron en detalle. Cada una de estas tres preparaciones, ACCELLERASE TRIO^{MR} de GENENCOR^{MR} y CELLIC CTEC2^{MR} y CELLIC CTEC3^{MR} de NOVOZYMES^{MR}, demostró ser efectiva a niveles de dosis de enzimas dentro del intervalo sugerido por los

5 fabricantes, al proporcionar hidrolizado combinado de paja de trigo C5/C6 preparado según los métodos de la invención en los que los rendimientos de monómero C5 eran por lo menos del 60% y los rendimientos de conversión de C6 de celulosa eran por lo menos del 60%. Para cada una de estas preparaciones de celulosa comerciales, los niveles de doce actividades enzimáticas diferentes se caracterizaron y expresaron por gramo de proteína. Los detalles experimentales se proporcionan en el Ejemplo 8. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Mediciones seleccionadas de actividad en preparaciones de celulasa comerciales optimizadas para la conversión de biomasa lignocelulósica.

	CTEC 3	Actividad de ACTrio	CTEC2	Sustrato	Definición de la unidad (formación)
CBHI	454 ± 2,5 U/g	171 ± 0,4 U/g	381 ± 21 U/g	MeUmb-3-celobiosido	1 μmol de equivalente de MeUmd /min
CBH II*	No medible	No medible	Not medible		
Endo-1,4-β-glucanasa	466 ± 31 U/g	149 ± 21 U/g	173 ± 15 U/g	Avicel PH-101	1 μmol de equivalente de glucosa/min
β-glucosidasa	3350 ± 75 U/g	891 ± 60 U/g	2447 ± 70 U/g	Celobiosa	2 mmol de equivalente de glucosa/min (Conversión de 1 μmol de celobiosa/min)
Endo-1,4-β-xilanasas	278 ± 10 U/g	799 ± 55 U/g	306 ± 41 U/g	WEAX (medio vise.)	1 μmol de equivalente de glucosa/min
β-xilosidasa	279 ± 7,0 U/g	431 ± 22 U/g	87 ± 0,2 U/g	WEAX (medio vise.)	1 mmol de xilosa/min
β-L-arabinofuranosidasa	20 ± 1,0 U/g	9,4 ± 0,4 U/g	12 ± 0,1 U/g	WEAX (medio vise.)	1 mmol de arabinosa/min
Lacasa	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Siringaldazina	-
Amiloglucosidasa (AMG)	18 ± 3,6 U/g	29 ± 0,1 U/g	18 ± 1,5 U/g	Almidón de maíz (soluble)	1 mmol de glucosa/min
o-amilasa	2,7 ± 0,1 U/g	3,4 ± 0,5 U/g	4,7 ± 1,4 U/g	Almidón de maíz (soluble)	1 mmol de equivalente de glucosa/min
Acetil xilano esterasa	3,8·10 ⁻³ ± 9·10 ⁻⁵ U/g	3,1·10 ⁻⁴ ± 1·10 ⁻⁴ U/g	4,2·10 ⁻³ ± 4,2·10 ⁻⁴ U/g	Acetato de pNP	1 mmol de equivalente de pNP/min
Ácido ferúlico esterasa	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Ferulato de metilo	-

En algunas realizaciones, pueden usarse preparaciones enzimáticas que tienen proporciones relativas similares a las exhibidas por las preparaciones comerciales descritas en la Tabla 1 entre cualquiera de las actividades de endoglucanasa, exoglucanasa, B-glucosidasa, endoxilanasas, xilosidasa y/o acetil xilano esterasa.

5 Las mezclas de enzimas que son eficaces para hidrolizar biomasa lignocelulósica se pueden obtener
alternativamente por métodos bien conocidos en la técnica de una variedad de microorganismos, que incluyen
bacterias aerobias y anaeróbicas, hongos de podredumbre blanca, hongos de podredumbre blanda y hongos
10 anaeróbicos. Véase, por ejemplo, Singhania et al., (2010). Los organismos que producen celulasas normalmente
secretan una mezcla de diferentes enzimas en proporciones apropiadas para que sean adecuadas para la hidrólisis
de sustratos lignocelulósicos. Las fuentes preferidas de preparaciones de celulasa útiles para la conversión de
biomasa lignocelulósica incluyen hongos tales como especies de *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola*,
Aspergillus y *Phanerochaete*.

15 Se ha estudiado ampliamente una especie de hongo en particular, *Trichoderma reesei*. *Trichoderma reesei* de tipo
silvestre secreta una mezcla de enzimas que comprende dos exocelulasas (celobiohidrolasas) con especificidades
respectivas por los extremos reductores y no reductores de las cadenas de celulosa, por lo menos cinco
endocelulasas diferentes que tienen diferentes sitios de reconocimiento de celulosa, dos B-glucosidasas y una
variedad de endoxilanasas y exoxilosidasas. Véase Rouvinen, J., et al., (1990); Divne, C., et al., (1994); Martínez, D.,
20 et al., (2008) Las preparaciones de celulasa comerciales típicamente también incluyen actividades de alfa-
arabinofuranosidasa y acetil xilano esterasa. Véase, por ejemplo, Vinzant, T., et al., (2001).

25 Se ha demostrado previamente que una mezcla optimizada de actividades enzimáticas en proporciones relativas
que difieren de las proporciones presentadas en mezclas secretadas naturalmente por organismos de tipo silvestre
produce mayores rendimientos de azúcar. Véase Rosgaard et al. (2007). De hecho, se ha sugerido que las
optimizaciones de las mezclas de enzimas que incluyen hasta 16 proteínas enzimáticas diferentes se pueden
determinar ventajosamente por separado para cualquier materia prima de biomasa dada sujeta a cualquier
30 pretratamiento dado. Véase Billard, H., et al. (2012); Banerjee, G., et al. (2010). Sin embargo, como una practicidad
comercial, los proveedores de enzimas comerciales típicamente buscan producir el número más pequeño posible de
mezclas de enzimas diferentes, para que se puedan obtener economías de escala en la producción a gran escala.

35 En algunas realizaciones, puede ser ventajoso suplementar una preparación de celulasa comercialmente disponible
optimizada para la conversión de biomasa lignocelulósica con una o más actividades enzimáticas adicionales o
suplementarias. En algunas realizaciones, puede ser ventajoso simplemente aumentar la proporción relativa de una
o más enzimas componentes presentes en la preparación comercial. En algunas realizaciones, puede ser ventajoso
introducir actividades adicionales especializadas. Por ejemplo, en la práctica de métodos de la invención que usan
cualquier materia prima de biomasa dada, pueden identificarse enlaces de carbohidratos no hidrolizados particulares
que podrían hidrolizarse ventajosamente mediante el uso de una o más actividades enzimáticas complementarias.
Tales enlaces no hidrolizados se pueden identificar a través de la caracterización de carbohidratos oligoméricos,
usando métodos bien conocidos en la técnica, en hidrolizados solubles o en residuos no hidrolizados insolubles. Los
40 enlaces no hidrolizados también se pueden identificar a través de un perfilado completo de polímeros de
micromatrices, usando anticuerpos monoclonales dirigidos contra enlaces específicos de carbohidratos, como se
describe por Nguema-Ona et al. (2012). En algunas realizaciones, puede ser ventajoso suplementar una preparación
de celulasa comercialmente disponible optimizada para la conversión de biomasa lignocelulósica usando una o más
de endoxilanasas, B-glucosidasa, mananasa, glucuronidasa, xilano esterasa, amilasa, xilosidasa, glucouranil
45 esterasa o arabinofuranosidasa adicionales.

50 En algunas realizaciones, alternativamente, puede ser ventajoso producir enzimas en el sitio en una instalación de
procesamiento de biomasa lignocelulósica, como se describe por Humbird et al. (2011). En algunas realizaciones,
una preparación de celulasa comercialmente disponible optimizada para la conversión de biomasa lignocelulósica
puede producirse en el sitio, con o sin complementación personalizada de actividades enzimáticas específicas
apropiadas para una materia prima de biomasa particular.

55 En algunas realizaciones, ya sea que se utilice o no a preparaciones de celulasa que se pueden obtener
comercialmente optimizados para la conversión de biomasa lignocelulósica, y ya sea que las enzimas se produzcan
en el mismo sitio en una planta de procesamiento de biomasa o no, las ventajas de la invención se puede obtener
usando materias primas de biomasa lignocelulósica blandas sometidas a un pretratamiento por autohidrólisis con
intensidad muy baja hasta números de xilano del 10% o mayores, usando una mezcla de enzimas que comprende
los
siguiente: (1) actividades exocelulasa (celobiohidrolasa) (EC 3.2.1.91), que opcionalmente incluye por lo menos dos
60 enzimas con especificidades por los extremos reductores y no reductores de las cadenas de celulosa, (2) actividad
endocelulasa (EC 3.2.1.4); (3) actividad 1,3-glucosidasa (EC 3.2.1.21); (4) actividad B-1,4-endoxilanasas (EC 3.2.1.8);
(5) actividad acetil xilano esterasa (EC 3.1.1.72); y opcionalmente (6) actividad B-1,3-xilosidasa (EC 3.2.1.72); y
opcionalmente (7) actividad de B-1,4-xilosidasa (EC 3.2.1.37); y opcionalmente (8) actividad de alfa 1,3 y/o alfa 1,5-
arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.23). En algunas realizaciones, la mezcla de enzimas se caracteriza adicionalmente
65 por presentar las siguientes proporciones relativas entre actividades enzimáticas: la actividad celulasa de 1 FPU está
asociada con actividad endoglucanasa de por lo menos 30 U de CMC y con actividad beta glucosidasa de al menos

28 U de pNPG y con actividad endoxilanasas de por lo menos 50 U de ABX. Una persona con experiencia en la técnica comprenderá fácilmente que U de CMC se refiere a unidades de carboximetilcelulosa, donde una U de CMC de actividad libera 1 μmol de azúcares reductores (expresados como equivalentes de glucosa) en un minuto bajo las condiciones específicas del ensayo de 50°C y pH 4,8; dicha U de pNPG se refiere a unidades de pNPG, donde una U de pNPG de actividad libera 1 μmol de nitrofenol por minuto del para-nitrofenil-B-D-glucopiranosido a 50°C y pH 4,8; y que U de ABX se refiere a unidades de xilanasas de abedul, donde una U de ABX de actividad libera 1 μmol de equivalentes de azúcar reductor xilosa en un minuto a 50°C y pH 5,3. Un experto en la técnica podrá comprender fácilmente que FPU se refiere a "unidades de papel de filtro", y proporciona una medida de la actividad total de la celulasa incluida en cualquier mezcla de diferentes enzimas celulasa. Como se usa en la presente descripción, FPU se refiere a unidades de papel de filtro determinadas por el método de Adney, B. y Baker, J., Laboratory Analytical Procedure #006, "Measurement of Cellulase Activity", 12 de agosto de 1996, Laboratorio Nacional de Energías Renovables de los Estados Unidos (NREL).

En algunas realizaciones la mezcla de enzimas también puede incluir una o más de cualesquiera de: manosidasas (EC 3.2.1.25), α -D-galactosidasas (EC 3.2.1.22), α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), α -D-glucuronidasas (EC 3.2.1.139), cinamoil esterasas (EC 3.1.1.-), o feruloil esterasas (EC 3.1.1.73).

Un experto en la técnica podrá determinar fácilmente, mediante experimentación rutinaria, cual es el nivel de dosis apropiado de cualquier preparado de enzima determinada que se debe aplicar, y la duración apropiada para la hidrólisis enzimática. Generalmente es ventajoso mantener menores niveles de dosis de enzima, de manera tal de minimizar los costos de las enzimas. En algunas realizaciones, puede ser ventajoso usar una alta dosis de enzima. Al llevar a la práctica los métodos de la invención, un experto en la técnica puede determinar una optimización económica de la dosis de enzima tomando en consideración factores relevantes que incluyen los costos locales de la biomasa, los precios de mercado para las corrientes de producto, costos de capital totales de la planta y los esquemas de amortización, y otros factores. En las realizaciones donde se utiliza un preparado de celulasa que se puede obtener comercialmente, optimizado para la conversión de biomasa lignocelulósica, se puede utilizar un intervalo general de dosis provisto por los fabricantes para determinar el intervalo general dentro del cual se debe realizar la optimización. En algunas realizaciones, la duración de la hidrólisis es de por lo menos 48 horas, o por lo menos 64 horas, o por lo menos 72 horas, o por lo menos 96 horas, o un tiempo de entre 24 y 150 horas.

Como se sabe bien en la técnica, la catálisis por celulasa es más eficiente donde la hidrólisis se realiza con un bajo contenido de materia seca. Una mayor concentración de sólidos inhibe eficazmente la catálisis por celulasa, aunque las razones precisas de este efecto bien conocido no se comprenden por completo. Véase por ejemplo Kristensen et al. (2009).

En algunas realizaciones, puede ser ventajoso realizar la hidrólisis con un contenido muy alto de MS > 20%, independientemente de algún incremento resultante del consumo de enzima. Generalmente es ventajoso realizar la hidrólisis con el mayor nivel posible de materia seca, tanto para minimizar el consumo de agua como los requerimientos de tratamiento de aguas residuales. Adicionalmente, en los sistemas de fermentación también es ventajoso usar las mayores concentraciones de azúcar que sean prácticas. Las mayores concentraciones de azúcar se producen cuando se realiza la hidrólisis con los mayores niveles de materia seca. Un experto en la técnica podrá determinar fácilmente, mediante experimentación rutinaria, un nivel de MS con el que realizar la hidrólisis enzimática que es apropiada para lograr unas metas determinadas del proceso, para cualquier materia prima de biomasa y preparación enzimática. En algunas realizaciones, la hidrólisis enzimática de la fracción sólida se puede realizar con un 15% de MS o mayor, o un 16% de MS o mayor, o un 17% de MS o mayor, o un 18% de MS o mayor o un 19% de MS o mayor, o un 20% de MS o mayor, o un 21% de MS o mayor, o un 22% de MS o mayor, o un 23% de MS o mayor, o un 25% de MS o mayor, o un 30% de MS o mayor, o un 35% de MS o mayor.

En algunas realizaciones, la fracción sólida se recupera de una separación sólido/líquido con un 40% de MS o mayor, pero se agrega un contenido adicional de agua de manera tal que se pueda realizar la hidrólisis enzimática con menores niveles de MS. Se comprenderá fácilmente que el contenido de agua se puede agregar en la forma de agua fresca, condensada u otras soluciones de proceso con o sin aditivos tales como polietilenglicol (PEG) de cualquier peso molecular o tensioactivos, sales, productos químicos para ajustar el pH tales como amoníaco, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, o hidróxido de sodio, agentes bactericidas o antifúngicos, u otros materiales.

Luego de haber hidrolizado enzimáticamente la fracción sólida hasta un grado de conversión deseado, la fracción líquida, que se ha mantenido en derivación de C5, se mezcla con la mezcla hidrolizada para la hidrólisis posterior. En algunas realizaciones, se puede agregar toda la fracción líquida recuperada de una sola vez, mientras que en otras formas de realización, se puede eliminar algún componente de la fracción líquida y/o la fracción líquida se puede agregar de manera incremental. En algunas realizaciones, antes de mezclarla con la fracción líquida, la fracción sólida se hidroliza hasta una conversión de celulosa de por lo menos un 50%, o por lo menos un 55%, o por lo menos un 60%, lo que significa que se obtiene por lo menos el rendimiento teórico de monómeros de glucosa que se especifica. Típicamente, una porción sustancial de los xilooligómeros presentes en la fracción líquida se puede hidrolizar a xilosa monomérica por acción de xilanasas y otras enzimas que permanecen activas dentro de la mezcla hidrolizada. En algunas realizaciones, la hidrólisis posterior se realiza durante por lo menos 6 horas, o durante un

tiempo de entre 15 y 50 horas, o durante por lo menos 24 horas. En algunas realizaciones, por lo menos un 60%, o por lo menos 65%, o por lo menos 70%, o por lo menos 75%, o por lo menos 80%, o por lo menos 85%, o por lo menos 90% en masa de xilooligómeros presentes en la fracción líquida se hidrolizan a xilosa monomérica durante la hidrólisis posterior por acción de la xilanasa y otras enzimas que permanecen activas dentro de la mezcla hidrolizada. En algunas realizaciones, la fracción líquida se mezcla directamente con el hidrolizado, sin adición adicional de aditivos químicos. En algunas realizaciones, se pueden separar algunos componentes de la fracción líquida tales como ácido acético, furfural o fenoles provenientes de la fracción líquida antes de mezclar con el hidrolizado.

En algunas realizaciones, la hidrólisis enzimática de la fracción sólida y/o la posterior hidrólisis de la fracción líquida se puede llevar a cabo como un proceso simultáneo de sacarificación y fermentación (SSF). Como es bien sabido en la técnica, cuando SSF puede realizarse a la misma temperatura que la óptima para la hidrólisis enzimática, el consumo de enzimas puede minimizarse porque un organismo fermentativo introducido durante la hidrólisis enzimática consume monómeros de glucosa y xilosa y por lo tanto reduce la inhibición del producto de reacciones catalizadas por enzimas. En algunas realizaciones, la hidrólisis posterior solo se lleva a cabo después de que la fracción de fibra se ha hidrolizado, sin adición de organismo fermentador, hasta una conversión de celulosa de por lo menos 60%.

Cuando las materias primas de biomasa tales como cepas típicas de paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, bagazo de sorgo dulce, rastrojo de maíz o racimos de fruta vacíos son pretratadas con 35% o superior de MS por autohidrólisis de una sola etapa a un número de xilano del 10% o mayor, donde se obtiene una fracción sólida de la biomasa pretratada que tiene por lo menos 40% de MS o por lo menos 50% de eliminación de sólidos disueltos, donde la fracción sólida es subsecuentemente sometida a hidrólisis enzimática con MS entre 15 y 27% usando una preparación de celulasa optimizada comercialmente para conversión de biomasa de lignocelulósica, donde se lleva a cabo hidrólisis enzimática durante por lo menos 48 horas, donde se agrega fracción líquida a la fracción sólida hidrolizada después de obtener por lo menos 50% de conversión de glucosa, y donde la fracción líquida añadida está sujeta a hidrólisis posterior durante un período de por lo menos 6 horas, normalmente es posible alcanzar concentraciones de monómero C5 en el hidrolizado C5/C6 combinado que corresponde a los rendimientos de monómero C5 de 60% o superior del rendimiento teórico máximo de xilosa.

En algunas realizaciones, el hidrolizado combinado de C5/C6 puede fermentarse directamente hasta etanol usando una o más cepas de levadura modificadas.

La Figura 9 muestra un esquema de proceso para una realización. Como se muestra, la biomasa lignocelulósica blanda se empapa, lava o humedece con 35% o superior de MS. La biomasa se trata previamente a pH dentro del intervalo de 3,5 a 9,0 usando vapor presurizado en autohidrólisis de una sola etapa con una severidad caracterizada por un número de xilano del 10% o superior. La biomasa pretratada se somete a separación sólido/líquido produciendo una fracción líquida y una fracción sólida que tiene un contenido de MS del 40% o superior. La fracción sólida se ajusta a un contenido de MS apropiado y luego se somete a hidrólisis enzimática con un contenido de MS del 15% o superior hasta un grado de conversión de celulosa del 60% o superior. La fracción líquida separada se mezcla subsecuentemente con la fracción sólida hidrolizada y se somete a una hidrólisis posterior, por lo que una cantidad sustancial de xilooligómeros presentes en la fracción líquida se hidroliza hasta xilosa monomérica. Después del final de la hidrólisis y la posterior hidrólisis como se describe, el rendimiento del monómero C5 es típicamente por lo menos del 60% mientras que la conversión de celulosa es similarmente por lo menos del 60%.

Ejemplos:

Ejemplo 1. Caracterización del "número de xilano" de la fracción sólida como medida de la severidad del pretratamiento.

Se empaparon paja de trigo (WS), rastrojo de maíz (CS), bagazo de caña de azúcar dulce (SCB) y racimos de fruta vacía (EFB) con 0-10 g de ácido acético/kg de biomasa de materia seca, pH > 4,0, antes del pretratamiento con 35-50% de materia seca. Aproximadamente 60 kg de MS/h de biomasa se trataron previamente a temperaturas de 170-200°C con un tiempo de residencia de 12-18 minutos. La biomasa se cargó en el reactor usando un sistema de exclusas y el material previamente tratado se descargó usando un sistema de exclusas. La presión dentro del reactor de pretratamiento presurizado correspondió a la presión de vapor saturado a la temperatura utilizada. La biomasa pretratada se sometió a separación sólido/líquido usando una prensa de tornillo, produciendo una fracción líquida y una fracción sólida que tenía aproximadamente 30% de materia seca. La fracción sólida se lavó con aproximadamente 3 kg de agua/kg de biomasa seca y se prensó hasta aproximadamente 30% de materia seca nuevamente. Los detalles sobre el reactor y el proceso de pretratamiento se describen adicionalmente en Petersen et al. (2009).

Las materias primas crudas se analizaron para carbohidratos de acuerdo con los métodos descritos en Sluiter et al. (2005) y Sluiter et al. (2008) usando un sistema de HPLC Dionex Ultimate 3000 equipado con una columna Rezex de monosacáridos H+ de Phenomenex. Las muestras de fracción líquida y fracción sólida se recogieron después de tres horas de pretratamiento continuo y las muestras se recogieron tres veces durante tres horas para asegurar que se obtenía una muestra del pretratamiento en estado estacionario. Las fracciones sólidas se analizaron para

carbohidratos de acuerdo con los métodos descritos en Sluiter et al. (2008) con un sistema de HPLC Ultimate 3000 de Dionex equipado con una columna Rezex de monosacáridos H⁺. Las fracciones líquidas se analizaron para carbohidratos y productos de degradación de acuerdo con los métodos descritos en Sluiter et al. (2006) con un sistema de HPLC Ultimate 3000 de Dionex equipado con una columna Rezex de monosacáridos H⁺. Los productos de degradación en la fracción sólida se analizaron mediante la suspensión de la fracción sólida en agua con ácido sulfúrico 5 mM en una proporción de 1:4 y después se analizaron de acuerdo con los métodos descritos en Sluiter et al. (2006) con un sistema de HPLC Ultimate 3000 de Dionex equipado con una columna Rezex de monosacáridos H⁺. El contenido de materia seca y la cantidad de sólidos suspendidos se analizaron de acuerdo con los métodos descritos en Weiss et al. (2009). Los balances de masa se establecieron como se describe en Petersen et al. (2009) y se determinaron las recuperaciones de celulosa y hemicelulosa. Se cuantificó también la cantidad de azúcares que se degradaron a 5-HMF o furfural y la cantidad de acetato liberado de hemicelulosa durante el pretratamiento por kg de materia seca de biomasa, aunque no se tiene en cuenta la pérdida de furfural debido al destello.

La severidad de un proceso de pretratamiento se describe comúnmente por un factor de severidad, desarrollado por primera vez por Overend et al. (1987). El factor de severidad se expresa típicamente como un valor logarítmico tal que $\log(R_o) = t \cdot k_{sp} ((T - T_{ref}) / 14,75)$, donde R_o es el factor de severidad, t es el tiempo de residencia en minutos, T es la temperatura y T_{ref} es la temperatura de referencia, típicamente 100°C. El factor de severidad se basa en la cinética de solubilización de hemicelulosa según lo descrito por Belkececi et al. (1991), Jacobsen y Wyman (2000) o Lloyd et al. (2003). La severidad de un pretratamiento se relaciona así con el contenido de hemicelulosa residual que permanece en la fracción sólida después del pretratamiento.

Las fracciones sólidas preparadas y lavadas como se describe se analizaron para determinar el contenido de C5 de acuerdo con los métodos descritos por Sluiter et al. (2008) con un sistema de HPLC Dionex Ultimate 3000 equipado con una columna Rezex de monosacáridos H⁺ de Phenomenex. El contenido de xilano en la fracción sólida producida y lavada como se describió anteriormente depende linealmente del factor de severidad para biomasa lignocelulósicas blandas tales como, por ejemplo, paja de trigo, rastrojo de maíz de EFB cuando se trata previamente mediante autohidrólisis hidrotérmica. La definición de severidad como el contenido de xilano en una fracción sólida preparada y lavada como se describió anteriormente es transferible entre las configuraciones de pretratamiento. El número de xilano es el contenido de xilano medido en las fracciones sólidas lavadas, que incluye alguna contribución del material soluble. La dependencia del número de xilano en la severidad de pretratamiento $\log(R_o)$ se muestra en la Figura 1 para paja de trigo, rastrojo de maíz, bagazo de caña de azúcar y racimos de fruta vacíos del procesamiento de aceite de palma.

Como se muestra, existe una clara correlación lineal negativa entre el número de xilano y la severidad del pretratamiento para cada una de las materias primas de biomasa ensayadas previamente tratadas mediante autohidrólisis en una sola etapa.

Ejemplo 2. Recuperación de C5 en función de la severidad del pretratamiento.

Las materias primas de biomasa se trataron previamente y las muestras se caracterizaron como se describe en el ejemplo 1. La Figura 2 muestra las recuperaciones de C5 (xilosa + arabinosa) en función del número de xilano para experimentos en los que se trató previamente paja de trigo por autohidrólisis. Las recuperaciones de C5 se muestran como sólidos insolubles en agua (WIS), sólidos solubles en agua (WSS) y recuperación total. Como se muestra, la recuperación de C5 como sólidos insolubles en agua aumenta a medida que aumenta el número de xilano. A medida que el número de xilano aumenta más del 10%, la recuperación de C5 como sólidos solubles en agua disminuye mientras que la recuperación de C5 como sólidos insolubles en agua continúan aumentando.

Las cepas típicas de paja de trigo ensayadas contenían aproximadamente 27% de hemicelulosa con base en materia seca antes del pretratamiento. La Figura 3 muestra la recuperación total de C5 después del pretratamiento como una función del número de xilano para paja de trigo, rastrojo de maíz, bagazo de caña de azúcar y EFB previamente tratados por autohidrólisis. Las cepas típicas de rastrojo de maíz, bagazo de caña de azúcar dulce y EFB probado contenían aproximadamente 25%, 19% y 23%, respectivamente, de contenido de C5 con base en materia seca antes del pretratamiento. Como se muestra, para todas las materias primas, la recuperación total de C5 después del pretratamiento depende de la severidad del pretratamiento como se define por el número de xilano. Como se muestra, cuando el 90% del contenido de C5 recuperado después del pretratamiento puede hidrolizarse completamente hasta monómero C5, se puede esperar un rendimiento final del monómero C5 del 60% después de la hidrólisis enzimática donde la severidad del pretratamiento se caracteriza por producir un número de xilano del 10% o superior.

Ejemplo 3. Producción de productos de degradación que inhiben las enzimas y el crecimiento de levadura en función de la severidad del pretratamiento.

Las materias primas de biomasa se trataron previamente y las muestras se caracterizaron como se describe en el ejemplo 1. La figura 4 muestra la dependencia de la liberación de ácido acético y la producción de furfural y 5-hidroxi-metilfural (5-HMF) en función del número de xilano para experimentos donde la paja de trigo se trató previamente con autohidrólisis en una sola etapa. Como se muestra, la producción de estos productos de

degradación, que son bien conocidos por inhibir la levadura fermentativa y que en algunos casos también inhiben las enzimas celulasa, exhibe un aumento exponencial en los números de xilano inferiores al 10%. Con un número de xilano del 10% y superior, los niveles de furfural y ácido acético caen dentro de los intervalos que permiten la fermentación de la biomasa pretratada sin necesidad de etapas de destoxicación. En el caso del ácido acético, los niveles se incrementan aún más durante la hidrólisis enzimática de la biomasa pretratada con número de xilano del 10% y más, aunque típicamente a niveles que son bien tolerados por la levadura modificada para consumir azúcares tanto C5 como C6.

Ejemplo 4. Inhibición de las enzimas celulasa por material que permanece en la fracción sólida en función del % de MS de la fracción sólida.

Se llevaron a cabo experimentos en un reactor de caída libre de 6 cámaras que funciona en principio como el reactor de 6 cámaras descrito y utilizado en el documento WO2006/056838. El reactor de hidrólisis de 6 cámaras se diseñó para realizar experimentos con licuefacción e hidrólisis a concentraciones de sólidos superiores al 20% de MS. El reactor consiste en un tambor colocado horizontalmente dividido en 6 cámaras separadas, cada una de 24 cm de ancho y 50 cm de alto. Un eje giratorio horizontal montado con tres paletas en cada cámara se usa para mezclar/agitar. Un motor de 1,1 kW se usa como accionador y la velocidad de rotación es ajustable dentro del intervalo de 2,5 y 16,5 rpm. La dirección de rotación está programada para cambiar cada segundo minuto entre una dirección en el sentido de las manecillas del reloj y la opuesta. Una camisa calefactora llena de agua en el exterior permite controlar la temperatura hasta 80°C.

Los experimentos usaron paja de trigo, pretratada mediante autohidrólisis en una sola etapa. La biomasa se humedeció hasta una MS de > 35% y se trató previamente a pH > 4,0 mediante vapor con un número de xilano del 10,5%. El pretratamiento se realizó en la planta piloto de Inbicon en Skærbæk, Dinamarca. La biomasa se cargó en el reactor de pretratamiento utilizando un sistema de esclusas y la biomasa pretratada se retiró del reactor usando un sistema de esclusa. La biomasa pretratada estaba, en algunos casos, sujeta a separación sólido/líquido usando una prensa de tornillo, produciendo una fracción líquida y una fracción sólida. La fracción sólida tenía un contenido de MS de aproximadamente el 30%, contenía la mayor parte de la celulosa inicial y la lignina, parte de la hemicelulosa y un total de aproximadamente el 25% de los sólidos disueltos.

Las cámaras del reactor de 6 cámaras se llenaron con biomasa total pretratada que comprendía todos los sólidos disueltos y no disueltos o fracción sólida prensada que comprendía aproximadamente el 25% del total de sólidos disueltos. El contenido de materia seca se ajustó a 19% de MS. La biomasa pretratada se hidrolizó luego a 50°C y pH 5,0 a 5,3 usando 0,08 mL de CTec2^{MR} de Novozymes/g de glucano o 0,2-0,3 mL de Accellerase TRIO^{MR} de Dupont, Genencor/g de glucano. Estos niveles de dosis de estas preparaciones de celulasa comercialmente disponibles optimizadas para conversión de biomasa lignocelulósica estuvieron dentro del intervalo sugerido por los fabricantes. Los experimentos de hidrólisis enzimática se realizaron durante 96 horas a una velocidad de mezcla de 6 rpm.

La Figura 5 muestra la conversión de celulosa después de la hidrólisis enzimática bajo estas condiciones en función del % de sólidos disueltos removidos antes de la hidrólisis enzimática. Como se muestra, la remoción del 75% de sólidos disueltos a estos niveles de dosis de enzimas mejora la conversión de celulosa en un 10-20% en términos absolutos. Por lo tanto, es ventajoso presionar la fracción sólida al contenido de MS por lo menos un 40% o, de lo contrario, reducir el contenido de sólidos disueltos en por lo menos 50% antes de la hidrólisis enzimática, ya que esto proporcionará un rendimiento enzimático mejorado.

Ejemplo 5. Contenido de azúcares e hidrólisis de la fracción líquida de la biomasa pretratada hasta el número de xilano > 10%.

Se trataron previamente paja de trigo, rastrojo y bagazo de caña de azúcar hasta un número de xilano del 11,5% (WS), 12,3% (SCB) y 15,5% (CS) y se sometieron a separación sólido/líquido para producir una fracción líquida y una fracción sólida, como se describe en el ejemplo 5. Las fracciones líquidas se analizaron para carbohidratos y productos de degradación de acuerdo con los métodos descritos en (Sluiter, Hames et al., 2005) usando un sistema de HPLC Dionex Ultimate 3000 equipado con una columna Rezex de monosacáridos. La Tabla 2 muestra el contenido de azúcar de las fracciones líquidas expresado como un porcentaje del contenido de MS dividido en categorías de glucosa/glucano oligomérico y monomérico, xilosa/xilano y arabinosa/arabinano. Como se muestra, mientras que cierto contenido de glucosa está presente tanto en forma monomérica como oligomérica, la mayor parte del contenido de azúcar es xilano oligomérico. El predominio de oligómeros de xilano en la fracción líquida obtenida mediante autohidrólisis se pone de manifiesto en contraste con la fracción líquida obtenida usando pretratamiento con ácido diluido. En la biomasa pretratada mediante pretratamiento hidrotérmico con ácido diluido, la fracción líquida se hidroliza típicamente en constituyentes monoméricos mediante acciones del catalizador ácido.

Tabla 2. Contenido de azúcar de las fracciones líquidas en biomasa pretratada hasta un número de xilano > 10%

	Glucano oligomérico	Glucosa monomérica	Xilano monomérico	Xilosa monomérica	Arabinano oligomérico	Arabinosa monomérica	Otra MS
WS	5,5%	2,1%	40,4%	8,6%	1,1%	4,8%	37%
SCB	8,2%	3,1%	39,1%	8,7%	0,7%	3,1%	37%
SC	6,2%	1,9%	37,0%	5,3%	2,8%	3,9%	43%

5 La fracción líquida de paja de trigo pretratada se caracterizó adicionalmente por análisis de HPLC usando una columna Thermo Scientific Dionex CarboPac^{MR} PA200 usando un sistema cromatográfico modular Dionex ICS-5000. Los analitos se separaron usando condiciones de gradiente de NaOH/NaOAc y se midieron mediante detección amperométrica integrada y pulsada (IPAD) usando un electrodo de oro. La Figura 6 muestra un cromatograma de HPLC en el que el perfil de elución de los patrones de xilobiosa (X₂), xilotriosa (X₃), xilotetraosa (X₄), xilopentosa (X₅) y xilohexosa (X₆) se superpone como el trazo superior sobre el trazo inferior, que representa el perfil de elución de la fracción líquida. Como se muestra, la fracción líquida de la biomasa autohidrolizada contiene una mezcla que comprende una pequeña cantidad de xilosa monomérica y cantidades comparativamente mayores de xilobiosa (X₂), xilotriosa (X₃), xilotetraosa (X₄), xilopentosa (X₅) y xilohexosa (X₆) junto con otros materiales.

10 Ejemplo 6. Hidrólisis enzimática de fracción sólida y adición de fracción líquida después de la hidrólisis de la fibra a partir de biomasa pretratada hasta un número de xilano > 10% y prensada hasta > 40% de MS seguida de hidrólisis posterior.

15 Los experimentos se llevaron a cabo en un reactor de caída libre de 6 cámaras como se describe en el ejemplo 4.

20 Los experimentos usaron paja de trigo, rastrojo de maíz o bagazo de caña de azúcar previamente tratados mediante autohidrólisis en una sola etapa hasta números de xilano que variaban de 11,5 a 15,6%. La biomasa se cortó y humedeció hasta una MS de > 35% y se trató previamente con vapor a 170-190°C durante 12 min. El pretratamiento se realizó en la planta piloto de Inbicon en Skærbæk, Dinamarca. La biomasa pretratada se sometió a separación sólido/líquido usando una prensa de tornillo para producir una fracción sólida que tenía > 40% de MS.

25 Las cámaras del reactor de 6 cámaras se llenaron con aproximadamente 10 kg de biomasa pretratada prensada y se ajustaron por adición de agua hasta 19-22% de MS. La biomasa pretratada se hidrolizó a 50°C y pH 5,0 a 5,3 utilizando ACCELLERASE TRIO^{MR} de GENENCOR-DuPONT. La velocidad de mezclado era de 6 rpm. Los experimentos de hidrólisis se realizaron durante 96 horas y después la fracción líquida prensada de la fracción sólida después del pretratamiento se añadió y la hidrólisis posterior se realizó durante 48 horas a 50°C y pH 5,0 a 5,3.

30 Se tomaron muestras de HPLC diariamente para seguir la conversión de celulosa y hemicelulosa y se analizaron para determinar el contenido de glucosa, xilosa y arabinosa usando un sistema de HPLC Dionex Ultimate 3000 equipado con una columna Rezex de monosacáridos con cuantificación mediante el uso de un patrón externo.

35 La Figura 7 muestra datos de hidrólisis para conversión de hemicelulosa con adición de fracción líquida después de 96 horas de hidrólisis de la fracción sólida usando bagazo de caña de azúcar previamente tratado hasta un número de xilano del 12,3% e hidrolizado usando 0,3 mL de Accellerase Trio^{MR} (Genencor) por g de glucano. Se muestra un perfil de hidrólisis típico. La recuperación del monómero C5 se expresa como un porcentaje del rendimiento teórico del material presente en la reacción de hidrólisis. La mayor parte de la hemicelulosa dentro de la fracción sólida se ha convertido en azúcares monoméricos dentro de las primeras 24 horas en la hidrólisis de la fracción sólida. La adición de la fracción líquida después de 96 horas aumenta el rendimiento potencial teórico, lo que explica la caída en la conversión de C5 observada justo después de que se agrega la fracción líquida. Dentro de las primeras 24 horas, la mayor parte del C5 de la fracción líquida se convierte en monómeros. Comparando la conversión de C5 justo antes de agregar la fracción líquida con el punto final de la hidrólisis, es posible calcular la conversión de C5 en la fracción líquida en un 90% cuando se usa bagazo de caña de azúcar en estas condiciones.

40 La Tabla 3 muestra los datos de hidrólisis para diferentes biomazas pretratadas bajo diferentes circunstancias e hidrolizadas usando diferentes niveles de dosis de una preparación de celulasa comercialmente disponible optimizada para conversión de biomasa lignocelulósica, Accellerase Trio^{MR} (Genencor). Todos los niveles de dosis de enzimas utilizados estuvieron dentro del intervalo sugerido por el fabricante. Como se muestra, usando autohidrólisis de etapa única e hidrólisis enzimática con derivación C5 e hidrólisis posterior, se pueden obtener rendimientos de monómero C5 del 60% o superior utilizando las dosis recomendadas por los fabricantes de preparaciones de celulasa comercialmente disponibles optimizadas para la conversión de biomasa lignocelulósica mientras se logra la conversión de celulosa del 60% o superior.

Tabla 3. Resultados de la hidrólisis usando autohidrólisis de una etapa de muy baja severidad con derivación C5 e hidrólisis posterior.

	WS	SCB	SCB	CS	CS	EFB
Materia seca después del remojo [% en peso]	40%	39%	39%	40%	40%	39%
Tiempo de residencia [min]	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0
Temperatura [°C]	183,0	182,7	182,7	174,5	174,5	185,2
Severidad del tratamiento previo [log Ro]	3,52	3,51	3,51	3,27	3,27	3,58
Recuperación de C5 del pretratamiento [%]	74%	87%	87%	88%	88%	84%
Número de xilano	11,5%	12,3%	12,3%	15,6%	15,6%	15,5%
Dosis de enzimas [mL de Ac. TRIO/g de glucano]	0,2%	0,3%	0,3%	0,3%	0,2%	0,4%
% de TS en hidrólisis de fibra	22%	22%	22%	19%	22%	22%
Conversión de celulosa después de la hidrólisis (96 h)	78%	64%	66%	68%	58%	69%
Conversión de hemicelulosa (recuperación de C5) después de la hidrólisis (96 h)	80%	73%	73%	61%	61%	75%
% de TS en la segunda hidrólisis	18%	17%	17%	16%	18%	18%
Conversión de celulosa después de la hidrólisis posterior (144 h)	78%	65%	67%	67%	61%	72%
Conversión de hemicelulosa (recuperación de C5) después de la hidrólisis posterior (144 h)	90%	79%	78%	71%	68%	83%
Conversión total de celulosa	78%	65%	67%	67%	61%	72%
Rendimiento total del monómero C5	67%	69%	68%	63%	60%	70%

5 Ejemplo 7. Fermentación conjunta para producir etanol a partir de azúcares C5 y C6 en hidrolizado combinado por levadura modificada.

10 Como ejemplo sobre el uso de un hidrolizado producido a partir de biomasa lignocelulósica blanda (en este caso paja de trigo) preparada mediante pretratamiento de autohidrólisis en una sola etapa hasta un número de xilano > 10%, la Figura 8 muestra datos para una fermentación realizada sin destoxificación o cualesquiera otras etapas de proceso antes de la fermentación con levadura GMO capaz de convertir tanto azúcares C5 como C6 (cepa V1 de TERRANOL^{MR}). El hidrolizado se ajustó a pH 5,5 con gránulos de KOH antes de la fermentación y se complementó con 3 g/L de urea. La fermentación se realizó como una fermentación discontinua. La concentración celular inicial en el reactor era de 0,75 g dw/L. Las fermentaciones se controlaron a pH 5,5 utilizando la adición automática de NH₃ al 10%.

15 La temperatura se mantuvo a 30°C y la velocidad de agitación era de 300 rpm. Como se muestra, la glucosa y la xilosa se consumen fácilmente y el etanol se produce fácilmente, a pesar de la presencia de ácido acético, furfural y otros compuestos que típicamente resultarían inhibitorios a niveles más altos de severidad de pretratamiento.

20 Ejemplo 8. Determinación experimental de niveles de actividad en preparaciones de celulasa comerciales.

25 Las preparaciones comerciales de ACCELLERASE TRIO^{MR} de GENENCOR^{MR} y CELLIC CTEC2^{MR} y CELLIC CTEC3^{MR} de NOVOZYMES^{MR} se diluyeron de forma que las concentraciones de proteína fueran aproximadamente equivalentes en las preparaciones de muestra ensayadas. Se añadieron volúmenes equivalentes de preparaciones enzimáticas diluidas y se realizaron determinaciones de ensayo por duplicado o por triplicado.

30 El ensayo de actividad CBHI (exocelulasa) se realizó en regulador NaOAC 50 mM a pH 5, 25°C, durante 25 minutos. La actividad se determinó por triplicado siguiendo la velocidad continua de liberación de 4-Metilumbeliferona (Abs: 347 nm) a partir del sustrato modelo 4-metilumbeliferil-β-celobiosido. La unidad de actividad era de 1 μmole de equivalentes de MeUmb/minuto. Las concentraciones de proteína fueron 0,16, 0,14, 0,17 mg/mL, respectivamente, para los ensayos CTEC3, ACTrio y CTEC2. La concentración del sustrato era de 0,5 mg/mL.

35 El ensayo de actividad Endo-1,4-β-glucanasa se realizó en regulador NaOAC 50 mM, pH 5; 50°C, durante 60 minutos. La actividad se determinó por triplicado siguiendo el cambio de absorbancia asociado con la generación de extremos reductores del sustrato modelo Avicel PH-101. La unidad de actividad era de 1 μmol de equivalentes de glucosa/min. Las concentraciones de proteína fueron 0,80, 0,67, 0,79 mg/mL respectivamente para los ensayos CTEC3, ACTrio y CTEC2. La concentración de sustrato era de 80 mg/mL.

40 El ensayo de actividad β-glucosidasa se realizó en regulador NaOAC 50 mM, pH 5; 50°C, durante 20 minutos. La actividad se determinó por triplicado siguiendo el cambio de absorbancia asociado con la liberación de glucosa a partir de la celobiosa del sustrato modelo. La unidad de actividad era de 2 μmol de glucosa/min. Las concentraciones de proteína fueron 0,1, 0,12, 0,12 mg/mL respectivamente para los ensayos CTEC3, ACTrio y CTEC2. La concentración de sustrato era de 1,7 mg/mL.

45 El ensayo de la actividad Endo-1,4-β-xilanasas se realizó en regulador NaOAC 50 mM, pH 5; 50°C, durante 60 minutos. La actividad se determinó por triplicado siguiendo el cambio de absorbancia asociado con la generación de

extremos reductores a partir de arabinoxilano extraíble con agua del sustrato modelo. La unidad de actividad era de 1 μmol de equivalentes de glucosa/min. Las concentraciones de proteína fueron 1,12, 0,97, 1,12 mg/mL, respectivamente, para los ensayos CTEC3, ACTrio y CTEC2. La concentración de sustrato era de 10 mg/mL.

5 El ensayo de actividad β -xilosidasa se realizó en regulador NaOAC 50 mM, pH 5; 50°C, durante 60 minutos. La actividad se determinó por duplicado siguiendo la liberación de xilosa asociada con la hidrólisis de arabinoxilano extraíble con agua del sustrato modelo. La unidad de actividad era de 1 μmol de xilosa/min. Las concentraciones de proteína fueron 1,12, 0,97, 1,12 mg/mL, respectivamente, para los ensayos CTEC3, ACTrio y CTEC2. La concentración de sustrato era de 10 mg/mL.

10 El ensayo de actividad β -L-arabinofuranosidasa se realizó en regulador NaOAC 50 mM, pH 5; 50°C, durante 60 minutos. La actividad se determinó por triplicado mediante la siguiente liberación de arabinosa asociada con la hidrólisis del arabinoxilano extraíble con agua del sustrato modelo. La unidad de actividad era de 1 μmol de arabinosa/min. Las concentraciones de proteína eran 1,12, 0,97, 1,12 mg/mL, respectivamente, para los ensayos CTEC3, ACTrio y CTEC2. La concentración de sustrato era de 10 mg/mL.

15 El ensayo de la actividad la amiloglucosidasa (AMG) se realizó en regulador NaOAC 50 mM, pH 5; 50°C, durante 80 minutos. La actividad se determinó por triplicado siguiendo el cambio de absorbancia asociado con la liberación de glucosa del almidón de maíz soluble del sustrato modelo. La unidad de actividad era de 1 μmol de glucosa/min. Las concentraciones de proteína eran 1,12, 0,97, 1,12 mg/mL respectivamente para los ensayos CTEC3, ACTrio y CTEC2. La concentración de sustrato era de 10 mg/mL.

20 El ensayo de actividad α -amilasa se realizó en regulador NaOAC 50 mM, pH 5; 50°C, durante 60 minutos. La actividad se determinó por triplicado siguiendo el cambio de absorbancia asociado con la generación de extremos reductores a partir del almidón de maíz soluble del sustrato modelo. La unidad de actividad era de 1 μmol de equivalentes de glucosa/min. Las concentraciones de proteína eran 1,12, 0,97, 1,12 mg/mL, respectivamente, para los ensayos CTEC3, ACTrio y CTEC2. La concentración de sustrato era de 10 mg/mL.

25 El ensayo de actividad acetil xilano esterasa se realizó en regulador Succinato 100 mM, pH 5; 25°C, durante 25 minutos. La actividad se determinó por triplicado siguiendo la velocidad continua de liberación de 4-nitrofenilo (Abs: 410 nm) del acetato de 4,4-nitrofenilo. La unidad de actividad era de 1 μmol de equivalentes de pNP/min. Las concentraciones de proteína eran 0,48, 0,42, 0,51 mg/mL respectivamente para los ensayos CTEC3, ACTrio y CTEC2. La concentración de sustrato era de 10 mg/mL.

30 Los resultados de las determinaciones de actividad se muestran en la Tabla 1.

Las realizaciones y ejemplos son solo descriptivos y no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones.

Referencias

- 40 Agbor, V., et al. "Biomass pretreatment: Fundamentals toward application", *Biotechnology Advances* (2011) 29: 675
- Alvira, P., et al. "Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review", *Bioresource Technology* (2010) 101: 4851
- 45 Baboukani, B., et al. "Optimisation of dilute-acid pretreatment conditions for enhancement sugar recovery and enzymatic hydrolysis of wheat straw", *Biosystems Engineering III* (2012) 166
- 50 Banerjee, G., Car, S., Scott-Craig, J., Borrusch, M., y Walton, D., "Rapid optimisation of enzyme mixtures for deconstruction of diverse pretreatment/biomass feedstock combinations," *Biotechnology for Biofuels* (2010), 3: 22.
- Belkacemi, K., Abatzoglou, N., Overend, R.P., Chornet, E., "Phenomenological Kinetics of Complex Systems: Mechanistic Considerations in the Solubilization of Hemicelluloses following Aqueous/Steam Treatments". *Ind. Eng. Chem. res.*, (1991) 30, 2416-2425.
- 55 Bettiga, M., et al. "Arabinose and xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a fungal pentose utilization pathway", *Microbial Cell Factories* (2009) 8: 40
- 60 Billard, H., Faraj, A., Ferreira, N., Menir, S., y Heiss-Blanquet, S., "Optimisation of a synthetic mixture composed of major *Trichoderma reesei* enzymes for the hydrolysis of steam-exploded wheat straw," *Biotechnology for Biofuels* (2012), 5: 9.
- Chen, Y., et al., "Xylose and cellulose fractionation from corncob with three different strategies and separate fermentation of them to bioethanol", *Bioresource Technology* (2010) 101: 6994
- 65 Chung, Y., et al., "Enzymatic Saccharification and Fermentation of Xylose-Optimized Dilute Acid-Treated Lignocellulosics", *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2005) 121-124: 947

- Diaz, M., et al. "Hydrothermal pretreatment of rapeseed straw", *Bioresource Technology* (2010) 101: 2428
- 5 Divne, C., et al., "The 3-dimensional crystal-structure of the catalytic core of cellobiohydrolase-I from *Trichoderma reesei*," *Science* (1994), 265: 524.
- Dogaris, I., et al., "Hydrothermal processing and enzymatic hydrolysis of sorghum bagasse for fermentable carbohydrates production", *Bioresource Technology* (2009) 100: 6543
- 10 Dumon, C., et al., "Progress and future prospects for pentose-specific biocatalysts in biorefining ", *Process Biochemistry* (2012) 47: 346
- Farrell, E et al., "Ethanol can contribute to energy and environmental goals," *Science* (2006), 311: 506.
- 15 Ghosh, A., et al., "Genome-Scale Consequences of Cofactor Balancing in Engineered Pentose Utilization Pathways in *Saccharomyces cerevisiae*", *PLoS ONE* (2011) 6: 11
- Girio, F., et al., "Hemicelluloses for fuel ethanol: A review," *Bioresource Technology* (2010), 101: 4775
- 20 Hu, C., et al., "Simultaneous utilization of glucose and xylose for lipid production by *Trichosporon cutaneum*", *Biotechnology and Biofuels* (2011) 4: 25
- Humbird, D., et al. "Process Design and Economic for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol: Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover" Technical Report NREL/TP-5100-47764 Mayo de 2011
- 25 Humbird, D., et al., "Economic Impact of Total Solids Loading on Enzymatic Hydrolysis of Dilute Acid Pretreated Corn Stover," *Biotechnology Progress* (2010) 26: 1245
- 30 Jacobsen, S., et al. "Xylose Monomer and Oligomer Yields for Uncatalyzed Hydrolysis of Sugarcane Bagasse Hemicellulose at Varying Solids Concentration", *Ind. Eng. Chem. Res.* (2002) 41: 1454
- Jacobsen, S.E., Wyman, C.E., Cellulose and Hemicellulose Hydrolysis Models for Application to Current and Novel Pretreatment Processes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2000), 84-86, 81-96.
- 35 Jeong, T., et al. "Optimizing Dilute-Acid Pretreatment of Rapeseed Straw for Extraction of Hemicellulose", *Appl Biochem Biotechnol* (2010) 161: 22
- Jin, M., et al. "Two-step SSCF to convert AFEX-treated switchgrass to ethanol using commercial enzymes and *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST)", *Bioresource Technology* (2010) 101: 8171
- 40 Jojima, T., et al. "Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook", *Applied Microbiology and Biotechnology* (2010) 85: 471
- 45 Kim, J., et al. "Two-stage pretreatment of rice straw using aqueous ammonia and dilute acid", *Bioresource Technology* (2011) 102: 8992
- 50 Kim, K. et al. "Continuous Countercurrent Extraction of Hemicellulose from Pretreated Wood Residues", *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2001) 91-93: 253
- Klinke, H., et al., "Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pretreatment of biomass," *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2004) 66: 10.
- 55 Knudsen, N., et al., "Possibilities and evaluation of straw pretreatment," 10th european biomass conference in Würzburg in 1998, *Biomass for Energy and Industry*, páginas 224-228.
- Kothari, U., y Lee, Y., "Inhibition effects of dilute acid pre-hydrolysate of corn stover on enzymatic hydrolysis of solka floc," *Applied. Biochem. Biotechnol.* (2011) 165: 1391
- 60 Kristensen, J., Felby, C., y Jorgensen, H., "Determining yields in high solids enzymatic hydrolysis of biomass," *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2009), 156: 557.
- Kuhad, R., et al. "Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects", *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (2011) 15: 4950
- 65

- Kurian, J., et al. "BIOCONVERSION OF HEMICELLULOSE HYDROLYSATE OF SWEET SORGHUM BAGASSE TO ETHANOL BY USING PICHIA STIPITIS NCIM 3497 AND DEBARYOMYCES HANSENI SP.", *Bioresources* (2010) 5: 2404
- 5 Larsen, J., et al. "The IBUS Process - Lignocellulosic Bioethanol Close to a Commercial Reality", *Chem. Eng. Technol.* (2008) 5: 765
- Lee, J., et al. "Autohydrolysis pretreatment of Coastal Bermuda grass for increased enzyme hydrolysis", *Bioresource Technology* (2009) 100: 6434
- 10 Lee, J., et al., "Recent developments of key technologies on cellulosic ethanol prouction", *Journal of Scientific & Industrial Research* (2008) 67: 865
- Lee, J. et al. "Review article Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol", *Journal of Biotechnology* (1997) 56: 1
- 15 Leith, H y Whittaker, R, *Primary productivity of the biosphere*. Springer, Berlin. 1975. P. 205-206.
- Lloyd, T., y Wyman, C. "Application of a Depolymerization Model for Predicting Thermochemical Hydrolysis of Hemicellulose." *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2003), 105-108, 53-67.
- 20 Lu, X., et al. "Optimization of H2SO4-catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw for bioconversion to ethanol: Focusing on pretreatment at high solids content", *Bioresource Technology* (2009) 100: 3048
- 25 Madhavan, A., et al. "Bioconversion of lignocellulose-derived sugars to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*", *Critical Reviews in Biotechnology* (2012) 32: 22
- Martinez, D., et al., "Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei*," *Nature Biotechnology* (2008), 26: 553.
- 30 Matsushika, A., et al. "Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives", *Applied Microbiology and Biotechnology* (2009) 84: 37
- Mesa, L. et al. "Comparison of process configurations for ethanol production from two-step pretreated sugarcane bagasse", *Chemical Engineering Journal* (2011) 175: 185
- 35 Monavari, S., et al. "The influence of solid/liquid separation techniques on the sugar yield in two-step dilute acid hydrolysis of softwood followed by enzymatic hydrolysis", *Biotechnology for Biofuels* (2009) 2: 6
- 40 Nguema-Ona, E., Moore, J., Fagerstrom, A., Fangel, J., Willats, W., Hugo, A., y Vivier, M., "Profiling the main cell wall polysaccharides of tobacco leaves using high-throughput and fractionation techniques", *Carbohydrate Polymers* (2012), 88: 939
- Ohgren, K., et al. "EVect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover", *Bioresource Technology* (2007) 98: 2503
- 45 Overend, R.P., Chornet, E., "Fractionation of lignocellulosics by steam aqueous pretreatments" *Philos. Trans. R. Soc. Lond. A* (1987), 321, 523-536.
- 50 Palmquist E, H Grage, NQ Meinander y B Hahn-Hagerdal "Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and phydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts." *Biotechnol. Bioeng.* (1999) 63: 46-55
- Paptheofanous, M., et al. "TWO-STAGE ACID-CATALYZED FRACTIONATION OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS IN AQUEOUS ETHANOL SYSTEMS AT LOW TEMPERATURES", *Bioresource Technology* (1995) 54: 305
- 55 Petersen, M., et al. "Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals", *Biomass and Bioenergy* (2009) 33: 834
- Quing, Q., Yang, B., Wyman, C., "Xylo-oligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes," *Bioresource Technology* (2010) 101: 9624
- 60 Quing, Q., y Wyman, E., "Hydrolysis of different chain length xylo-oligomers by cellulase and hemicellulase enzymes," *Bioresource Technology* (2011) 102: 1359
- 65 Rosgaard, L., et al., "Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated barley straw substrates," *Biotechnol. Prog.* (2007), 23: 1270

- Rouvinen, J., et al., "3-dimensional structure of cellobiohydrolase-II from *Trichoderma reesei*," *Science* (1990), 249: 380
- 5 Saha, B., et al., "Hemicellulose bioconversion", *Microbiol Biotechnol* (2003) 30: 279
- Sanchez, R., et al. "Improved xylose and arabinose utilization by an industrial recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain using evolutionary engineering", *Biotechnology for Biofuels* (2010) 3: 13
- 10 Shen, F., et al. "Evaluation of hemicellulose removal by xylanase and delignification on SHF and SSF for bioethanol production with steam-pretreated substrates", *Bioresource Technology* (2011) 102: 8945
- 15 Singhania, R., et al., "Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases," *Enzyme and Microbial Technology* (2010), 46: 541
- Sluiter, A., et al., "Determination of Extractives in Biomass," US National Renewable Energy Laboratory (NREL), Laboratory Analytical Procedure (LAP) con fecha de publicación 17 de julio de 2005, NREL/TP-510-42619, revisado en enero de 2008
- 20 Sluiter, A., et al., "Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples," US National Renewable Energy Laboratory (NREL), Laboratory Analytical Procedure (LAP) con fecha de publicación 8 de diciembre de 2006, NREL/TP-510-42623, revisado en enero de 2008
- 25 Sluiter, A., et al., "Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass," US National Renewable Energy Laboratory (NREL), Laboratory Analytical Procedure (LAP) con fecha de publicación 25 de abril, 2008, NREL/TP-510-42618, revisado en abril de 2008
- 30 Soderstrom, J., et al. "Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H₂SO₄ impregnation for ethanol production", *Biomass and Bioenergy* (2003) 24: 475
- Soderstrom, J., et al. "Effect of Washing on Yield in One- and Two-Step Steam Pretreatment of Softwood for Production of Ethanol", *Biotechnol. Prog.* (2004) 20: 744
- 35 Soderstrom, J., et al. "Separate versus Simultaneous Saccharification and Fermentation of Two-Step Steam Pretreated Softwood for Ethanol Production", *Journal of Wood Chemistry and Technology* (2005) 25: 187
- 40 Taherzadeh, M., et al. "Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review" *International Journal Molecular Science* (2008) 9: 1621
- Thomsen, M., et al. "Preliminary Results on Optimization of Pilot Scale Pretreatment of Wheat Straw Used in Coproduction of Bioethanol and Electricity", *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2006) 129-132: 448
- 45 Vinzant, T., et al., "Fingerprinting *Trichoderma reesei* hydrolases in a commercial cellulase preparation," *Applied Biochem and Biotechnol.* (2001), 91-93: 99
- Weiss, N.D., et al., "A simplified Method for the Measurement of Insoluble Solids in Pretreated Biomass Slurries." *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2009), 975-987: 162(4)
- 50 Won, K., et al. "Fractionation of barley straw with dilute sulfuric acid for improving hemicellulose recovery", *Korean Journal Chemical Engineering* (2012) 29: 614
- 55 Ximenes, E., et al., "Inhibition of cellulases by phenols," *Enzyme and Microbial. Tecno.* (2010) 46: 170
- Zaldivar J, A Martinez y LO Ingram "Effects of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*." *Biotechnol. Bioeng.* (1999) 65. 24-33
- 60 Zhang, P., et al., "Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies," *Biotechnology Advances* (2006), 24: 452

REIVINDICACIONES

1. Un método de procesamiento de biomasa lignocelulósica que comprende:
- 5 - Proporcionar materia prima de biomasa lignocelulósica blanda,
 - Tratamiento previo de la materia prima a pH dentro del intervalo de 3,5 a 9,0 en un tratamiento previo hidrotérmico presurizado de una sola etapa con un contenido de MS de por lo menos 35% a temperaturas entre 160 y 200°C para tiempos de residencia de menos de 60 minutos, de modo que la biomasa pretratada se caracteriza por tener un número xilano del 10% o superior,
- 10 - Separar la biomasa pretratada en una fracción sólida y una fracción líquida,
 - Hidrolizar la fracción sólida con o sin adición de contenido suplementario de agua al 15% de MS o superior durante un tiempo entre 24 y 150 horas usando hidrólisis enzimática catalizada por una mezcla de enzimas que comprende actividades endoglucanasa, exoglucanasa, B-glucosidasa, endoxilanasas, xilosidasas y acetil xilano esterasa, y
- 15 - Mezclar posteriormente la fracción líquida separada y la fracción sólida hidrolizada después de que se haya obtenido por lo menos un 50% de conversión de celulosa en glucosa y realizar una hidrólisis posterior durante un período de por lo menos 6 horas, por lo que los xilooligómeros en la fracción líquida se degradan a xilosa monomérica por la acción de actividades enzimáticas que permanecen dentro de la fracción sólida hidrolizada.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que el pretratamiento hidrotérmico presurizado de una etapa se lleva a cabo como un pretratamiento de autohidrólisis presurizado de una etapa, en el que el ácido acético liberado por hidrólisis de hemicelulosa durante el pretratamiento cataliza adicionalmente la hidrólisis de hemicelulosa.
- 25 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, con la condición de que el ácido sulfúrico no se añada a la materia prima durante la etapa de pretratamiento.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la materia prima es paja de trigo, rastrojo de maíz, bagazo de caña de azúcar, bagazo de sorgo dulce o racimos de fruta vacíos.
- 30 5. El método de la reivindicación 1, en el que la materia prima se lava y/o se lixivia antes del pretratamiento presurizado; o en el que la materia prima se empapa en un líquido que contiene ácido acético de una etapa posterior del pretratamiento antes del pretratamiento presurizado.
- 35 6. El método de la reivindicación 1, en el que la estructura de fibra de la materia prima se mantiene durante el pretratamiento.
7. El método de la reivindicación 1, en el que el pretratamiento presurizado se realiza a una presión de 10 bar o inferior.
- 40 8. El método de la reivindicación 1, en el que la materia prima se retira del reactor de pretratamiento presurizado usando un sistema de hidrociclón o un sistema de tipo exclusiva.
9. El método de la reivindicación 1, en el que la materia prima se trata previamente con una severidad tal que la biomasa se caracteriza por tener un número de xilano del 12% o superior.
- 45 10. El método de la reivindicación 1, en el que la fracción sólida tiene un contenido de materia seca del 40% o superior.
- 50 11. El método de la reivindicación 1, en el que el rendimiento de xilosa monomérica después de la hidrólisis posterior o el rendimiento de glucosa monomérica después de la hidrólisis es por lo menos del 60% del rendimiento máximo teórico.
12. El método de la reivindicación 1, en el que la hidrólisis enzimática se realiza durante por lo menos 96 horas.
- 55 13. El método de la reivindicación 1, en el que la hidrólisis enzimática se lleva a cabo con entre un 15 y un 23% de contenido de materia seca, o con un contenido de materia seca del 20% o superior.
14. El método de la reivindicación 1, en el que la hidrólisis enzimática se realiza usando
- 60 (i) una preparación de celulasa comercialmente disponible optimizada para la conversión de biomasa lignocelulósica utilizada a un nivel de dosis enzimática dentro del intervalo sugerido por los fabricantes; opcionalmente, en el que dicha preparación de celulasa comercialmente disponible se complementa con una o más actividades enzimáticas adicionales, o
- 65 (ii) una mezcla de enzimas que comprende actividades exocelulasa (EC 3.2.1.91); actividad endocelulasa (EC 3.2.1.4); actividad B-glucosidasa (EC 3.2.1.21); actividad B-1,4-endoxilanasas (EC 3.2.1.8); y actividad acetil xilanol esterasa (EC 3.1.1.72), y en el que la mezcla de enzimas se caracteriza adicionalmente por tener proporciones

relativas de las actividades enzimáticas de tal manera que por cada actividad celulasa de 1 FPU existe actividad endoglucanasa de por lo menos 30 U de CMC y con actividad beta glucosidasa de al menos 28 U de pNPG y con actividad endoxilanasas de por lo menos 50 U de ABX; opcionalmente, que comprende adicionalmente actividad B-1,3-xilosidasa (EC 3.2.1.72); actividad B-1,4-xilosidasa (EC 3.2.1.37); y actividad alfa 1,3 y/o alfa 1,5 arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.23).

5

15. El método de la reivindicación 1 caracterizado además porque

10

(i) un hidrolizado C5/C6 combinado recuperado después de la hidrólisis posterior de la fracción líquida se fermenta directamente hasta etanol usando una o más cepas de levadura modificadas;
(ii) la fracción sólida comprende sólidos insolubles con más del 50% de sólidos disueltos asociados removidos; o
(iii) por lo menos el 85% de los xilooligómeros presentes en la fracción líquida se hidrolizan a monómeros de xilosa durante la hidrólisis posterior.

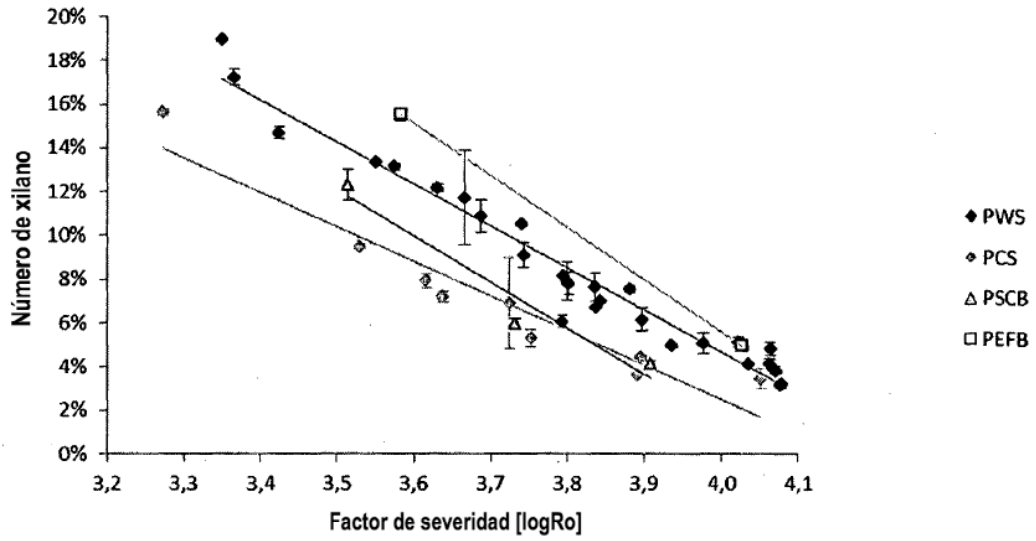


Figura 1. Número de xilano como una función del factor de severidad para paja de trigo (PWS), rastrojo de maíz (PCS), bagazo de caña de azúcar (SCB) y racimos de fruta vacíos de palma de aceite (PEFB) pretratados.

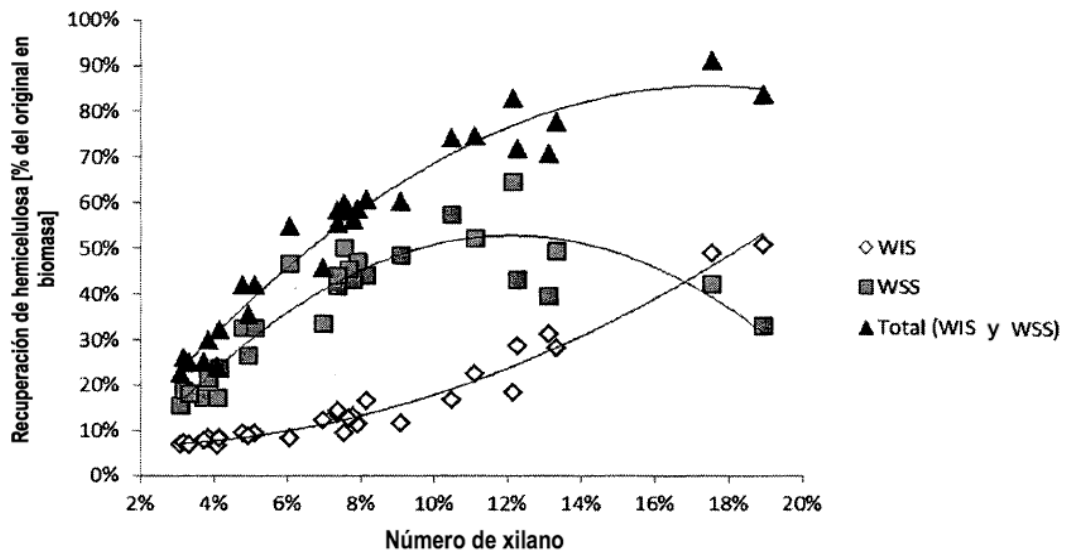


Figura 2. Recuperación de azúcares originales de hemicelulosa de paja de trigo después del pretratamiento expresados como sólidos insolubles en agua (WIS) y sólidos solubles en agua (WSS) como una función del número de xilano.

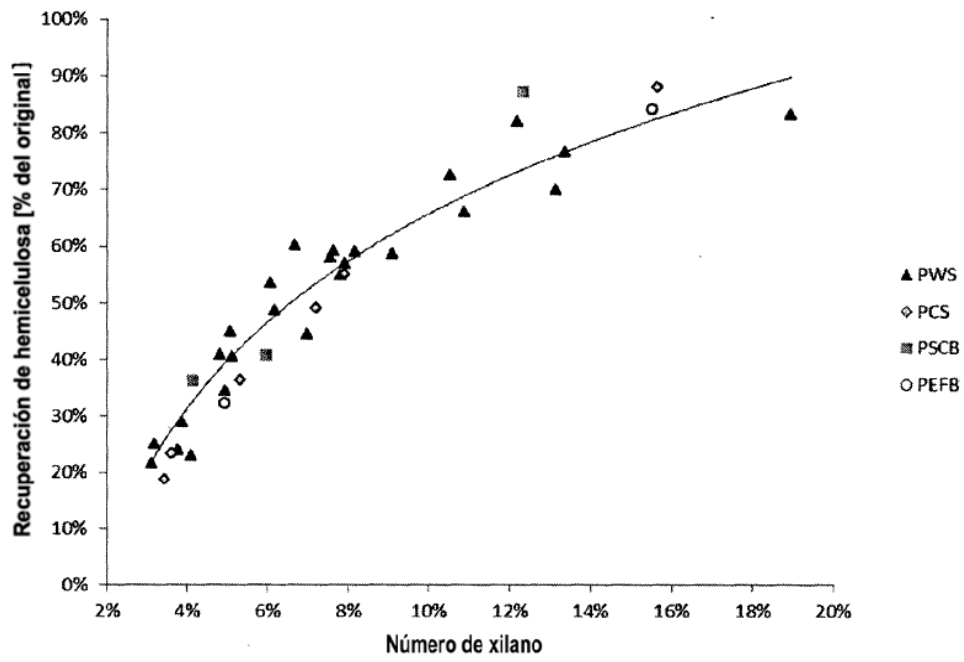


Figura 3. Recuperación de azúcares originales de hemicelulosa después del pretratamiento como una función del número de xilano para paja de trigo (PWS), rastrojo de maíz (PCS), bagazo de caña de azúcar (PSCB) y racimos de fruta vacíos (PEFB)

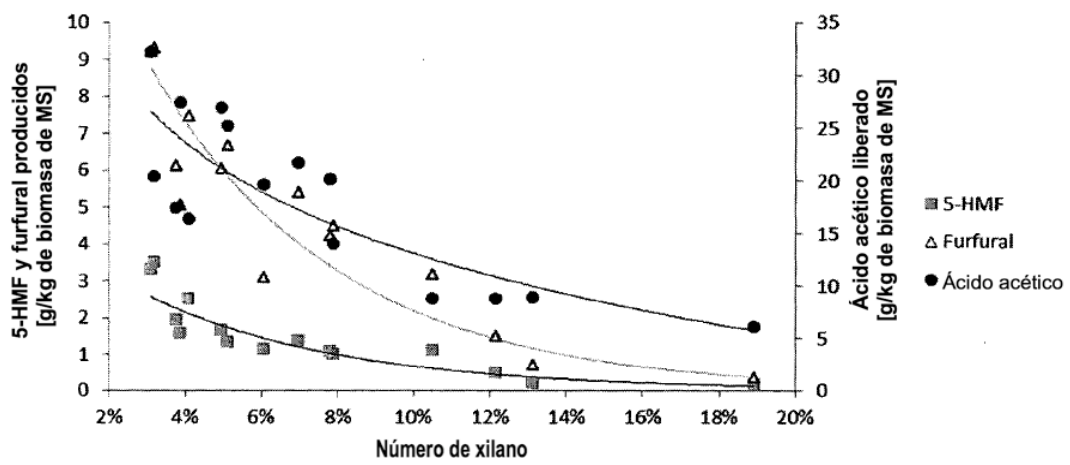


Figura 4. Liberación y producción de ácido acético y producción de los furanos 5-HMF y furfural durante el pretratamiento de autohidrólisis como una función del número de xilano.

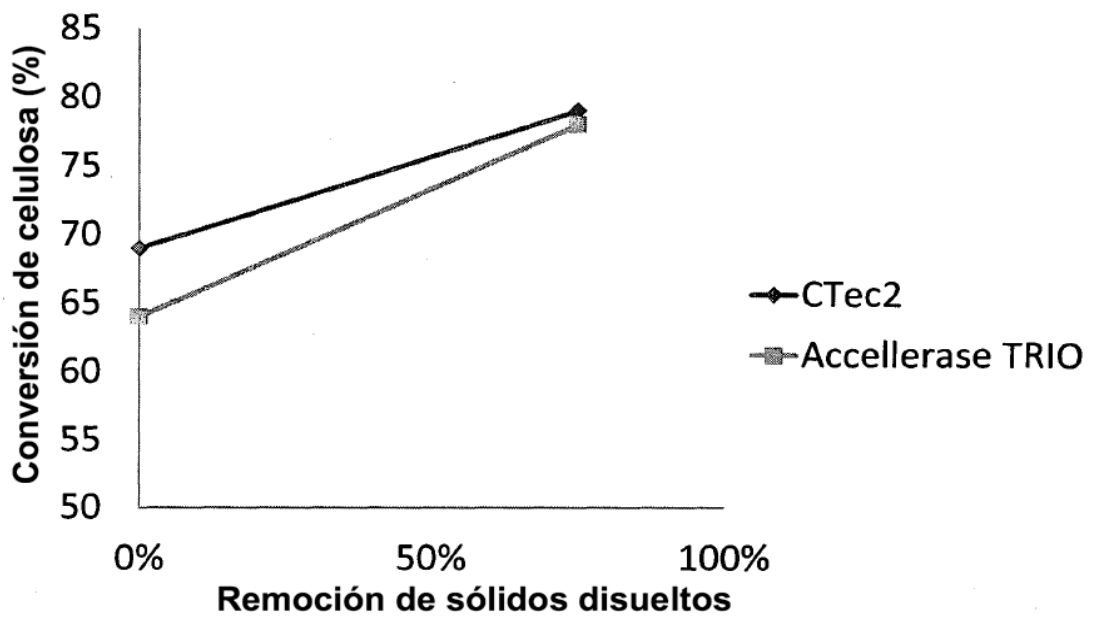


Figura 5. Conversión de celulosa como una función de la remoción de los sólidos disueltos.

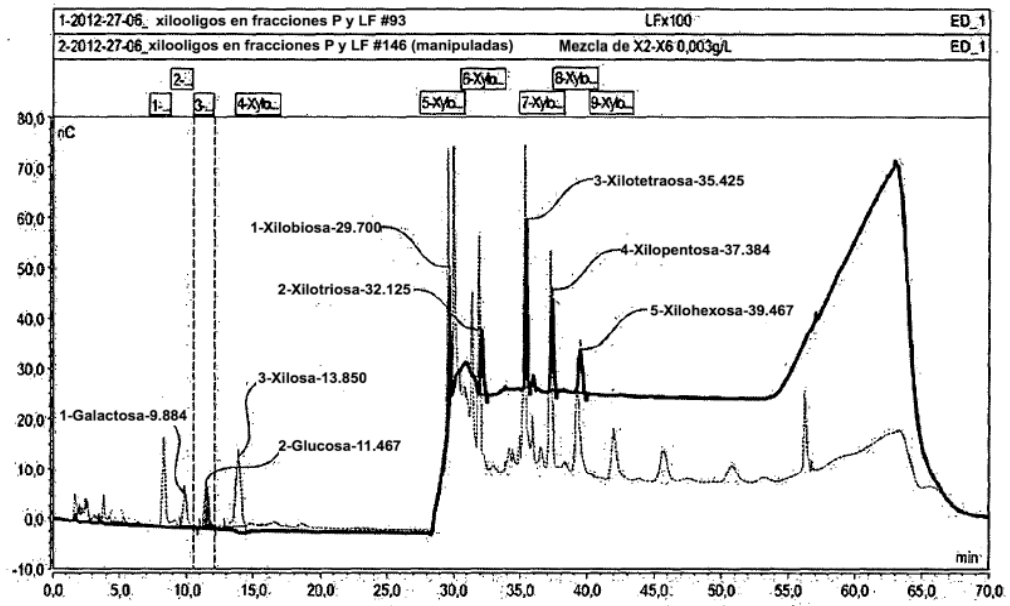


Figura 6. Caracterización por HPLC de la fracción líquida de paja de trigo pretratada por autohidrólisis hasta un número de xilano del 11,5%.

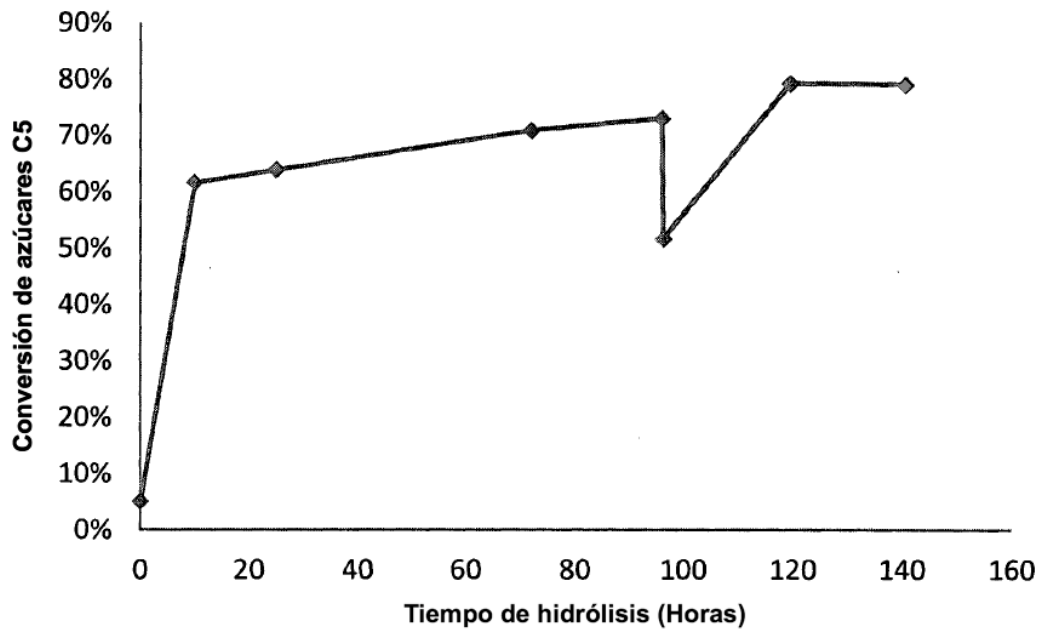


Figura 7. Perfil de hidrólisis que muestra la conversión de azúcares C5 en monómeros durante la hidrólisis de la fracción sólida y después de la adición de la fracción líquida las 96 horas expresado como % del rendimiento teórico.

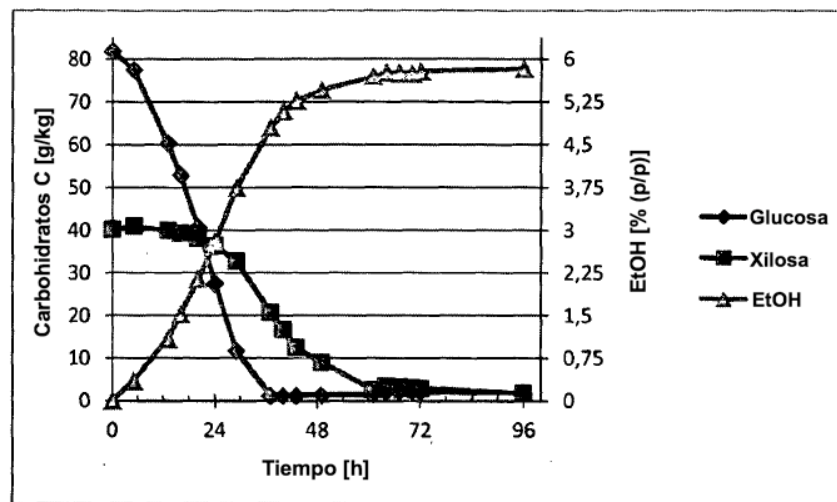


Figura 8. Fermentación por la cepa de levadura V1MR de Terranol de paja de trigo pretratada con vapor (número de xilano > 10%) que fue previamente hidrolizada por Cellic Ctec2MR de Novozymes y usada como fracción líquida y sólida combinada sin detoxificación para remover los inhibidores de la fermentación.

Esquema de proceso - pretratamiento con vapor de una sola etapa, hidrólisis de derivación C5 e hidrólisis posterior

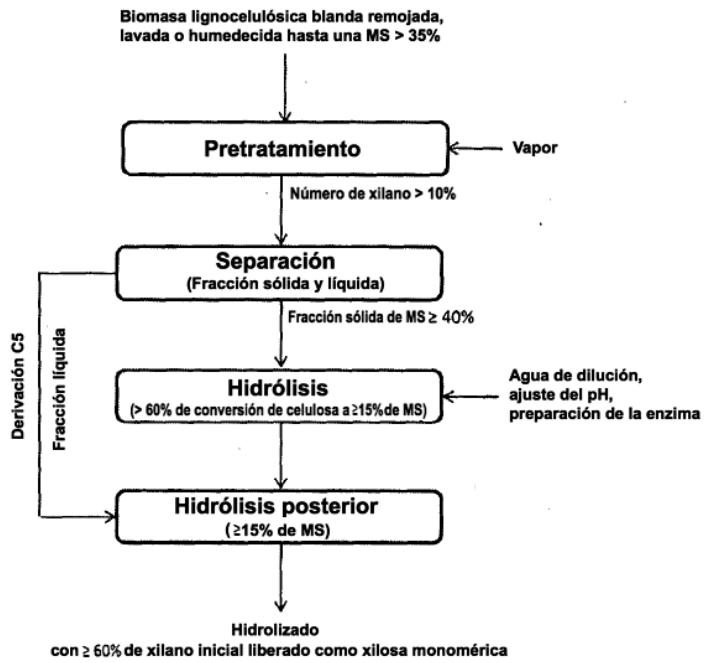


Figura 9. Esquema de proceso para una realización