

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 504**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.01.2015 PCT/IB2015/000034**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15107415**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2015 E 15706524 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 3094733**

54 Título: **Procedimiento para la producción de azúcares solubles a partir de biomasa**

30 Prioridad:

16.01.2014 IN 154MU2014

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

22.02.2019

73 Titular/es:

**DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY (50.0%)
Block-2, 6-8 Floor, CGO Complex Lodhi Road
New Delhi 110 003, IN y
INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ODANETH, ANNAMMA, ANIL;
BIRHADE, SACHINKUMAR, HIRAMAN;
VICTORIA, JULIET, JOANNA;
SAWANT, SNEHA, CHANDRAKANT y
LALI, ARVIND, MALLINATH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 701 504 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

Procedimiento para la producción de azúcares solubles a partir de biomasa

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de azúcares solubles a partir de biomasa, en donde los azúcares pueden utilizarse adicionalmente para producir productos valiosos, tales como combustibles y otros compuestos químicos, incluyendo etanol.

10

Antecedentes de la invención

Aunque desde hace tiempo que la biomasa se considera una prometedora fuente de energía renovable de combustible, sigue existiendo la necesidad de un medio más eficiente de transformación de la misma en biocombustibles adecuados. Las materias primas y desechos celulósicos y lignocelulósicos, tales como los residuos agrícolas, los desechos de la silvicultura, lodos de la fabricación del papel y residuos sólidos urbanos e industriales, proporcionan una materia prima renovable potencial para la producción de productos valiosos, tales como combustibles y otros compuestos químicos. Las materias vegetales también son una fuente significativa de azúcar fermentable, tal como glucosa que puede transformarse en biocombustibles. Los azúcares en el material vegetal están compuestos de cadenas largas de polímero que comprenden celulosa, hemicelulosa, glucanos y lignina. De esta manera, resulta necesario descomponer estos polímeros en azúcares monoméricos. Los métodos para convertir la biomasa en azúcares fermentables son conocidos de la técnica y en general comprende dos etapas principales: una etapa de pretratamiento para deshacer la estructura de la planta y una etapa de hidrólisis química o enzimática para convertir las cadenas poliméricas de celulosa y hemicelulosa en azúcares monoméricos, que seguidamente pueden fermentarse para dar productos útiles.

La etapa de pretratamiento es una acción finamente equilibrada destinada a abrir la fibra para permitir el acceso a los enzimas, que minimiza simultáneamente la pérdida de azúcares y la generación de inhibidores para garantizar rendimientos elevados y sustratos adecuados para la hidrólisis y fermentación enzimáticas. Se utilizan métodos de pretratamiento para incrementar la accesibilidad de los polímeros glucídicos de materiales celulósicos y lignocelulósicos a los enzimas de sacarificación/hidrólisis.

La mezcla pretratada seguidamente se somete a hidrólisis enzimática utilizando enzimas tales como hemicelulasas y celulasas, que catalizan la hidrólisis de la hemicelulosa o celulosa en oligosacáridos y/o monosacáridos en el hidrolizado. El hidrolizado se somete adicionalmente a fermentación para producir biocombustibles. Entre los enzimas de sacarificación utilizados para producir azúcares fermentables a partir de la biomasa pretratada se incluyen una o más glucosidasas, tales como glucosidasas hidrolíticas de celulosa, glucosidasas hidrolíticas de hemicelulosa, glucosidasas hidrolítica de almidón, así como peptidasas, lipasas, ligninasas y/o feruloil esterases. Se proporciona una revisión de los enzimas de sacarificación y métodos para el tratamiento de la biomasa en Lynd L.R. Et al. (Microbiol. Mol. Biol. Rev. (2002) 66:506-577).

El documento nº US2009/0053777 da a conocer un procedimiento para la sacarificación de biomasa pretratada con el fin de obtener concentraciones elevadas de azúcares fermentables. El sistema de reactor alimentado por lotes incluye múltiples etapas de reducción de tamaño y mezcla para mantener una mezcla uniforme en un tanque vertical bajo agitación. El procedimiento comprende proporcionar una parte de suspensión de biomasa pretratada mezclable y una parte de consorcio de enzimas de sacarificación que comprende por lo menos un enzima capaz de hidrolizar la celulosa; hacer reaccionar dicha suspensión y enzima a una temperatura comprendida entre 25°C y 60°C y pH entre 4,5 y 6,0; aplicar el mecanismo de reducción de tamaño de las partículas; añadir una parte adicional de biomasa pretratada para producir una suspensión de biomasa de contenido de sólidos más elevado; hacer reaccionar dicha suspensión de biomasa de contenido de sólidos más elevado bajo las mismas condiciones mencionadas, en donde repetir la etapa dos más veces para producir un hidrolizado de contenido más alto en azúcares, donde el peso seco de la biomasa pretratada es de 24% a 30%, obteniendo 20% del peso del producto hidrolizado final.

El documento nº WO2011/157427 describe un procedimiento continuo para la hidrólisis enzimática de biomasa celulósica, en el que el procedimiento implica la adición de una cantidad predeterminada de biomasa celulósica y enzima en un reactor de tanque bajo agitación continua para la hidrólisis enzimática parcial de la biomasa celulósica, en donde la biomasa celulósica parcialmente hidrolizada se retira continuamente. Dicha biomasa celulósica presenta un contenido de sólidos de entre 10% y 45%.

El documento nº WO2006/063467 da a conocer un sistema de procedimiento continuo para la hidrólisis enzimática de celulosa pretratada, que comprende: introducir la suspensión acuosa de la carga de alimentación celulósica pretratada en el fondo de un reactor de hidrólisis de columna vertical. La dispersión axial en el reactor se limita mediante la evitación de la mezcla y manteniendo una velocidad media de flujo de la suspensión de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 20 pies por hora, de manera que los sólidos no disueltos fluyen hacia arriba a una velocidad más lenta que la del líquido. Se añaden enzimas celulasas a la suspensión acuosa antes o durante la etapa de introducción de la suspensión acuosa en el reactor. Se separa un flujo acuoso que comprende productos de hidrólisis y sólidos no

hidrolizados y se recicla la celulosa no hidrolizada al mismo reactor. Describe además las composiciones enzimáticas que comprenden enzimas celulasas y floculantes para proporcionar la exposición del enzima al sustrato para el procedimiento de hidrólisis. El tiempo requerido para la conversión de la celulosa en glucosa es de 48 a 200 horas a una carga de enzima respectiva de 32 unidades/g de celulosa a 5 unidades/g de celulosa.

El documento n° US2010/0255554 da a conocer un método de optimización de un procedimiento de hidrólisis alimentada por lotes en la que el tiempo de hidrólisis se minimiza mediante el control de la adición alimentada de volumen y/o la frecuencia de adición de lotes o prehidrolizado y enzima alimentado. El procedimiento mencionado comprende: llenar un recipiente reactor con agua, añadir enzima celulasa y secuencialmente añadir biomasa prehidrolizada lignocelulósica al recipiente reactor para producir una mezcla de reacción, en donde el prehidrolizado alimentado se añade en lotes a un volumen de lote y frecuencia de adición de los lotes preseleccionados durante un tiempo de alimentación total de 20 horas para conseguir una consistencia final preseleccionada y un contenido de materia seca preseleccionado en la mezcla de reacción final. Se alcanza 70% a 90% de conversión teórica de celulosa a glucosa en la mezcla de reacción, en la que la frecuencia de adición de lotes es un lote cada 80 a 105 min, consistencia final preseleccionada de 24% y tiempo total de alimentación de 80 a 120 h.

Srinoprakutara et al., Journal of Food Science and Engineering, Vol. 2, 2012, 149-156, se refiere a la utilización de un pretratamiento de ácido sulfúrico diluido para el pretratamiento químico de paja de arroz y el efecto de la carga de paja de arroz y celulosa comercial (Accelerase 1000™).

Moreira et al., Brazilian Journal of Microbiology, Vol 43, 2012, 498- 505, se refieren a la utilización de diferentes especies fúngicas sobre la hidrólisis de residuos agroindustriales.

Takashi et al., Renewable Energy, Vol. 62, 2013, 754-760, se refiere a la utilización de diferentes velocidades de agitación para mejorar la pulverización de cedro japonés en polvo.

Chand Pasha et al., Journal of Industrial and Scientific Research, Vol. 71, 2012, 616-620, se refiere a la paja de arroz pretratada con álcali para la producción de celulosa utilizando *Aspergillus niger* mediante fermentación en estado sólido.

Meissner et al., Agrividia, 2010 (folleto de la compañía) se refiere a la utilización de una mezcla de enzimas para la digestión de rastrojo de maíz.

Boonwong et al., KKU Research Journal Vol. 19, 2014, 361-370, se refieren a la utilización del potencial de los desechos agrícolas (coronas de piña, cáscaras de durián y hojas de caña azucarera) para reducir la producción de azúcares mediante la utilización del pretratamiento de ácido sulfúrico tras la hidrólisis enzimática.

Según los métodos descritos en la técnica anterior, la estrategia principal utilizada en la producción de biocombustibles incluye tres etapas principales: el tratamiento de la biomasa, la hidrólisis enzimática y la fermentación de azúcares para producir biocombustibles. Los obstáculos principales durante la hidrólisis enzimática son la baja velocidad de la reacción, el elevado coste del enzima y la baja concentración de producto. Siguiendo los métodos descritos en la técnica anterior, los problemas anteriormente indicados se superan realizando la hidrólisis enzimática utilizando una elevada consistencia de sólidos insolubles. Sin embargo, la reacción de sacarificación a una consistencia elevada de sólidos insolubles debe enfrentarse a los retos de una viscosidad incrementada, requisitos energéticos más elevados de mezcla, activación directa del enzima y mala transferencia del calor debido a las propiedades reológicas de la suspensión fibrosa densa. De esta manera, existe una necesidad de desarrollar un procedimiento que pueda superar los retos anteriormente indicados.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

Uno de los aspectos de la presente invención, según se define en las reivindicaciones, es proporcionar un procedimiento para la hidrólisis mediada enzimáticamente de la biomasa para la producción de azúcares solubles, en la que dicho procedimiento comprende la adición constante de partes pequeñas de biomasa a la solución enzimática, permitiendo la solubilización rápida. Esto permite la adición de biomasa de manera que las concentraciones de sustrato sean elevadas en la mezcla de reacción, permitiendo una sacarificación eficiente a una carga de sustrato elevada. El reciclado de la biomasa no hidrolizada junto con el enzima soluble garantiza una reutilización completa de dicho enzima para la hidrólisis repetida, incrementando de esta manera la productividad global del enzima utilizado.

La presente invención proporciona un procedimiento para la producción de azúcares solubles a partir de biomasa, en el que dicho procedimiento comprende: preparar una solución de enzima con un pH en el intervalo de 4 a 6 en un recipiente reactor a una temperatura comprendida en el intervalo de 40°C a 60°C; añadir un lote de biomasa con un porcentaje de holocelulosa (%) en el intervalo de 70% a 100% y un contenido de humedad en el intervalo de 10% a 80% (p/p) a la solución enzimática en la etapa (a), manteniendo simultáneamente el pH en el intervalo de 4 a 6 y la temperatura de 40°C a 60°C, a fin de obtener una mezcla de reacción inicial que contiene una proporción de biomasa:enzima predeterminada, en la que la proporción de biomasa:enzima predeterminada en la mezcla de reacción inicial se encuentra comprendida en el intervalo de 1:104 a 1:106 (Kg de biomasa/FPU de enzima); añadir la biomasa

remanente en lotes repetidamente tal como en la etapa (b) durante un periodo de 30 a 90 min a fin de obtener una carga de sólidos de 10% a 30% en la mezcla de reacción final, en la que la proporción de biomasa:enzima se mantiene en el intervalo de 1:103 a 1:105 (kg de biomasa/FPU de enzima); permitiendo que la mezcla de reacción final reaccione durante 5 a 120 min adicionales a fin de obtener un hidrolizado de biomasa, en la que se consigue 40% a 80% de solubilización de la biomasa; separar el contenido sólido-líquido del hidrolizado de biomasa de la etapa (d) a fin de obtener un filtrado que comprende azúcares solubles y enzima, y un residuo de biomasa no hidrolizada y enzima adsorbido; separar el enzima soluble de los azúcares solubles presentes en el filtrado, y reciclar el residuo de la etapa (e) y el enzima soluble separado de la etapa (f) a etapa 8b) a fin de mantener la proporción de biomasa:enzima predeterminada para la producción de azúcares solubles.

Un aspecto de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, proporciona un procedimiento para la hidrólisis mediada enzimáticamente de la biomasa pretratada para la producción de azúcares solubles en el sistema de recipiente reactor. Las estrategias utilizadas para la sacarificación enzimática se clasifican en tres grupos principales, es decir: (a) para incrementar la biomasa acumulada en un reactor, (b) para reciclar el enzima, (c) para mitigar el efecto de inhibición. De esta manera, la presente invención incrementa el contenido de sólidos totales en la producción de azúcares solubles.

Breve descripción del dibujo

La figura 1 ilustra el procedimiento de adición gradual de alimentación de biomasa para conseguir una concentración elevada de sustrato. El procedimiento implica la adición de alimentación a un intervalo constante para conseguir una carga de sólidos final de 15%. La mezcla de reacción solubilizada resultante se somete a ultrafiltración, para separar el retenido que consiste en residuos no hidrolizados y enzimas solubles, y el permeado, que consiste en azúcares solubles. La expresión "parte de alimentación" utilizada en la presente memoria se refiere al lote de sustrato añadido gradualmente a la mezcla de reacción. La expresión residuo no hidrolizado utilizada en la presente memoria se refiere a la biomasa insoluble que queda después de la solubilización, que se recicla de vuelta a la reacción para la utilización posterior.

Descripción detallada de la invención

Se utilizan varios términos para la descripción de la invención.

Definiciones:

El término "biomasa" utilizado en la presente memoria se refiere a biomasa que comprende mazorcas de maíz, rastrojo de maíz, fibra de maíz, hojas de maíz, serrín, paja de trigo, bagazo de caña azucarera, hierbas de mijo, paja de arroz y herbáceas, y se trata convenientemente para obtener holocelulosa enriquecida que contiene más de 70% y conseguir que la homocelulosa resulte accesible a la reacción enzimática.

La expresión "hidrolizado de biomasa" utilizada en la presente memoria se refiere al producto de hidrólisis que comprende una mezcla de la biomasa hidrolizada, enzima y la biomasa no hidrolizada del recipiente reactor.

La expresión "azúcares solubles" utilizada en la presente memoria se refiere a todos los polisacáridos y monosacáridos y sus mezclas que son solubles en agua y pueden utilizarse como sustratos de carbonos por microorganismos en el procedimiento de fermentación para producir biocombustibles, compuestos bioquímicos y/o que también pueden utilizarse como azúcares en cualquier alimento, farmacéutico y/o otras aplicaciones.

El término "material residual" utilizado en la presente memoria se refiere al líquido o suspensión inicial cargado en un reactor antes de introducir la biomasa pretratada e iniciar el procedimiento de sacarificación.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la hidrólisis mediada enzimáticamente de biomasa para la producción de azúcares solubles, en el que el enzima, que permite la solubilización de la celulosa para permitir una elevada carga de biomasa para la reacción de hidrólisis, puede reciclarse y puede producir un hidrolizado de biomasa con elevadas concentraciones de azúcares.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento con reciclado enzimático para obtener una carga elevada de la biomasa, que produce un hidrolizado de la biomasa con elevada concentración de azúcares.

Otro objetivo de la invención es evaluar una concentración de sustrato para incrementar la carga de biomasa durante la hidrólisis enzimática con respecto a la conversión de celulosa y reducir la viscosidad durante la hidrólisis con el objetivo de proporcionar un mejor conocimiento de las relaciones mutuas entre carga de biomasa, viscosidad y degradación de la celulosa catalizada enzimáticamente del material de biomasa.

Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar la recuperación y reciclado del enzima a partir del hidrolizado de biomasa para la utilización posterior en la hidrólisis enzimática.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento para evitar la inhibición del sustrato y la inhibición del producto final que desempeña un papel vital en la conversión de la biomasa en azúcares solubles.

5 La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, proporciona un procedimiento para la producción de azúcares solubles a partir de biomasa, en el que dicho procedimiento comprende:

- a. preparar una solución de enzima con un pH en el intervalo de 4 a 6 en un recipiente reactor a una temperatura en el intervalo de 40°C a 60°C,
- 10 b. añadir un lote de biomasa con un % de holocelulosa en el intervalo de 70% a 100% y un contenido de humedad en el intervalo de 10% a 80% (p/p) a la solución enzimática en la etapa (a), manteniendo simultáneamente el pH en el intervalo de 4 a 6 y una temperatura de 40°C a 60°C a fin de obtener una mezcla de reacción inicial que contiene una proporción de biomasa:enzima predeterminada, en la que la proporción de biomasa:enzima predeterminada en la mezcla de reacción inicial se encuentra comprendida en el intervalo de 1:10⁴ a 1:10⁶ (kg de biomasa/FPU de enzima);
- 15 c. añadir la biomasa restante en lotes repetidamente tal como en la etapa (b) durante un periodo de 30 a 90 min a fin de obtener una carga de sólidos de 10% a 30% en la mezcla de reacción final, en la que la proporción de biomasa:enzima se mantiene en el intervalo de 1: 10³ a 1 : 10⁵ (kg de biomasa/FPU de enzima);
- d. dejar que la mezcla de reacción final reaccione durante 5 a 120 min adicionales a fin de obtener un hidrolizado de biomasa, en el que se alcanza una solubilización de la biomasa de 40% a 80%;
- 20 e. separar el contenido de sólidos-líquido del hidrolizado de biomasa de la etapa (d) a fin de obtener un filtrado que comprende azúcares solubles y enzima, y un residuo de biomasa no hidrolizada y enzima adsorbido;
- f. separar el enzima soluble respecto de los azúcares solubles presentes en el filtrado; y
- g. reciclar el residuo de la etapa (e) y el enzima soluble separado de la etapa (f) a la etapa (b) para mantener la proporción de biomasa:enzima predeterminada para la producción de azúcares solubles.

25 Una de las realizaciones más preferentes de la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de azúcares solubles mediante hidrólisis de la biomasa, en la que la biomasa utilizada para la hidrólisis es un producto agrícola seleccionado del grupo que consiste en mazorcas de maíz, rastrojo de maíz, fibra de maíz, hojas de maíz, serrín, paja de trigo, bagazo de caña azucarera, hierbas de mijo, paja de arroz y herbáceas, y se pretrata convenientemente para producir un contenido de celulosa y hemicelulosa accesible a la reacción enzimática.

30 Según todavía otra realización de la presente invención, la biomasa utilizada para el procedimiento de hidrólisis puede pretratarse a fin de obtener holocelulosa enriquecida que contiene más de 70%, según se requiere en la etapa (b) de la reivindicación 1, y producir la holocelulosa accesible a la reacción enzimática.

35 Según otra realización de la presente invención, la biomasa puede pretratarse mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, tal como con ácido, base, solvente orgánico, agentes oxidantes u otros compuestos químicos y/o en combinación con vapor o con vapor solo, disrupción mecánica, tal como mediante trituración, molienda o picado.

40 En todavía otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de azúcares solubles a partir de biomasa pretratada, en el que la biomasa pretratada se somete a múltiples etapas de reducción del tamaño antes del procedimiento de hidrólisis, y el contenido del reactor se mezcla uniformemente permitiendo el control del pH y la temperatura durante la hidrólisis.

45 Según todavía otra realización de la presente invención, la combinación de reducción de tamaño, hidrólisis enzimática más rápida y adición de biomasa de una manera constante, permite una mezcla eficiente de la biomasa, dando como resultado de esta manera una acumulación reducida de la viscosidad de la biomasa. Las etapas de reducción de tamaño permiten la rápida solubilización de la biomasa sólida húmeda.

50 En la presente invención, la carga secuencial de biomasa pretratada como sustrato durante la hidrólisis enzimática se lleva a cabo para la producción de azúcares solubles. La reacción se somete a una carga gradual de sustrato para incrementar los niveles de sustrato de 10% a 30% en masa seca (MS) (p/p). La concentración de glucosa final más alta se encuentra comprendida en el intervalo de 50 a 150 g/litro tras 2 horas.

55 Otra realización de la presente invención proporciona un procedimiento para la carga de biomasa, en el que se carga un lote de biomasa inicialmente en el recipiente reactor como suspensión mezclable de una concentración particular comprendida entre 1% y 10%.

60 Según todavía otra realización de la presente invención, se añade biomasa constantemente en dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, nueve, diez y doce partes de alimentación en 0,5 a 1,5 h a fin de incrementar la carga de sólidos en por lo menos aproximadamente 30% (p/v).

65 En otra realización de la presente invención, la biomasa se añade constantemente en tres a nueve partes de alimentación en 0,5 a 1,0 h a fin de incrementar la carga de sólidos en por lo menos aproximadamente 15% (p/v).

ES 2 701 504 T3

En todavía otra realización de la presente invención se proporciona un procedimiento para la producción de azúcares solubles a partir de biomasa, en el que el tiempo de alimentación es de aproximadamente 0,5 a 1,5 h.

5 En la realización todavía más preferente de la presente invención, la parte de biomasa total que debe añadirse a la mezcla de reacción se lleva a cabo en una parte y/o lotes cada 2,5 a 50 min para conseguir la carga de biomasa sólida predeterminada en el intervalo de 10% a 30% y un tiempo de alimentación total predeterminado de 0,5 a 1,5 h.

10 En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de azúcares solubles a partir de biomasa, en el que la adición de biomasa a la solución de enzima se lleva a cabo constantemente bajo agitación con un agitador superior con capacidad de agitación en el intervalo de 200 a 400 rpm, que permite la mezcla completa de la biomasa, dando como resultado una viscosidad más baja de la biomasa y un control uniforme del pH y la temperatura durante el procedimiento de hidrólisis.

15 En la realización más preferente de la presente invención, se añaden todos los enzimas de sacarificación al inicio de la reacción.

20 Según otra realización de la presente invención, los enzimas de sacarificación utilizados para la hidrólisis se seleccionan del grupo que consiste en celulasas, peptidasas, lipasas, ligninasas y feruloil estearasas y enzimas auxiliares adicionales, más preferentemente celulasas.

En una realización de la invención, se añade el enzima al sistema de reacción a una carga de proteínas de entre aproximadamente 2 mg/g y aproximadamente 95 mg/g de biomasa.

25 En todavía otra realización de la presente invención, la biomasa presente en el recipiente reactor del inicio del procedimiento de hidrólisis se encuentra en forma de suspensión mezclable que se torna sustancialmente homogénea bajo la acción del sistema de agitación y menos viscoso bajo la acción de la concentración de enzimas sacarificadores.

30 Según la presente invención, la mezcla completa de la biomasa proporciona una mejor controlabilidad del pH y la temperatura, dando como resultado un hidrolizado de la biomasa con una biomasa en peso seco elevada con altos rendimientos de azúcares solubles.

35 En una realización preferente de la presente invención, la incubación de la mezcla de reacción inicial se lleva a cabo a una temperatura comprendida en el intervalo de 40°C a 60°C y a un pH en el intervalo de 4 a 6 según se define en la reivindicación 1 durante un periodo de 2,5 a 120 min.

40 En otra realización de la presente invención, la biomasa parcialmente hidrolizada en la suspensión se torna menos viscosa, permitiendo la adición de biomasa adicional a la suspensión, manteniendo simultáneamente una mezclabilidad y viscosidad suficiente de la suspensión con un incremento del porcentaje de sólidos totales cargados en la suspensión en hidrólisis.

Según la invención, la hidrólisis de la biomasa se lleva a cabo a un pH en el intervalo de 4 a 6 y un óptimo de temperatura entre 40°C y 60°C para alcanzar una solubilización de 40% a 80% de la biomasa.

45 Según la presente invención, la temperatura requerida de entre 40°C y 60°C puede alcanzarse mediante calentamiento de la suspensión de biomasa basándose en el óptimo de temperatura de los enzimas de sacarificación que deben utilizarse y el tipo particular de biomasa bajo procesamiento, para conseguir la mejor velocidad de reacción de sacarificación posible.

50 El pH deseado de la suspensión se consigue mediante la adición de ácido o base según se requiera durante la mezcla de la suspensión de biomasa para garantizar que se alcanza un pH sustancialmente uniforme en todo el material de biomasa.

55 En una realización todavía más preferente de la presente invención, el control del pH de la suspensión se consigue mediante la utilización de ácido y/o base, el ácido se selecciona del grupo que consiste en HCl, H₂SO₄, CH₃COOH, H₃PO₄, HNO₃, o base seleccionada del grupo que consiste en NaOH, KOH, NH₃, Na₂CO₃ y K₂CO₃.

60 Una de las realizaciones de la invención proporciona un procedimiento de hidrólisis de la biomasa, en el que el hidrolizado de biomasa obtenido del procedimiento de hidrólisis contiene una mezcla de solución de azúcares solubles, enzima y biomasa no hidrolizada.

Según la presente invención, el procedimiento descrito es tal que se mantiene adsorbido el máximo de enzima sobre la biomasa y genera una corriente concentrada de azúcares.

65 En otra realización de la presente invención, la separación o filtración del enzima y/o de biomasa no hidrolizada a partir del hidrolizada se lleva a cabo utilizando la microfiltración (MF), en la que la membrana presenta un valor de corte de peso molecular (MWCO, por sus siglas en inglés) de 100 kDa a 500 kDa.

En otra realización de la presente invención, la recuperación y reciclado del enzima celulasa mediante separación de la solución de azúcares solubles y enzima celulasas del retenido obtenido tras la ultrafiltración se lleva a cabo utilizando una membrana con un valor de corte de peso molecular (MWCO) de 1 kDa a 20 kDa.

5 La parte de suspensión de biomasa que queda sin hidrolizar y la cantidad sustancial de enzima adsorbido sobre ella se reciclan. El enzima adicional presente, además de los azúcares solubles en el hidrolizado, se recuperan mediante filtración y se reciclan.

Según otra realización de la presente invención, la biomasa se convierte en azúcares solubles en 0,5 a 2 h.

10 El permeado obtenido tras la ultrafiltración comprende azúcares solubles que pueden transferirse a un procedimiento de fermentación.

15 En una de las realizaciones más preferentes de la presente invención, la concentración de azúcares solubles en el hidrolizado producido en el presente procedimiento es de por lo menos 75 g/l, que típicamente se considera una concentración de azúcares elevada.

20 Según todavía otra realización de la presente invención, los azúcares solubles producidos mediante el procedimiento de la invención pueden utilizarse en un procedimiento de fermentación para producir productos valiosos, tales como combustibles y otros compuestos químicos, incluyendo etanol.

Ventajas de la presente invención

25 1) La presente invención presenta varias ventajas económicas respecto al procedimiento por lotes convencional, tales como la reducción del coste de capital debido a un menor volumen, menor coste operativo y menor procesamiento cadena abajo debido a una concentración de producto más elevada.

2) El procedimiento proporcionado es más eficaz, conduciendo a una reducción de la viscosidad más rápida y a una producción más eficiente de azúcares solubles que los procedimientos conocidos tradicionales.

30 3) Aunque la utilización de enzimas para el procedimiento de hidrólisis es cara, la presente invención proporciona la recuperación y reciclado del enzima utilizado, permitiendo que el procedimiento resulte más eficaz respecto a los costes y permita la producción continua de azúcares solubles a partir de la biomasa.

4) La presente invención proporciona un procedimiento para la adsorción del enzima en la biomasa antes de la hidrólisis, lo que conduce a una velocidad de reacción y recuperación del enzima incrementados.

35 **Ejemplos**

Ejemplo 1

- Sacarificación de la biomasa con contenido variable de celulosa

40 La biomasa pretratada que consiste en un contenido variable de holocelulosa (70% a 95%) derivado de tratamiento con ácido/álcali de paja de trigo se solubilizó en una solución de enzima mantenida a 50°C y pH 5,0 con una carga total de sólidos secos de 15,0%. El material residual inicial consistía en 37,5 g de biomasa en peso seco que se mezcló con una solución de enzima compuesta de celulasa B (Advanced Enzyme Technology Ltd., Thane, india) y 750 g de agua acidificada a una carga de proteína de 27,75 mg/g de biomasa. La masa de reacción se agitó a 300 rpm y se mantuvo la temperatura a 50°C y a pH 5,0. La biomasa restante se añadió gradualmente en 0,5 a 1,0 h a fin de incrementar la carga de sólidos a 15%. El porcentaje de holocelulosa solubilizada se determinó como reducción del peso seco de la holocelulosa total añadida a la reacción y representada en términos de % de solubilización tal como se proporciona a continuación.

50
$$\% \text{ Solubilización} = \frac{\text{Peso seco de holocelulosa no hidrolizada al final de la reacción}}{\text{Peso seco de holocelulosa total añadida a la reacción}} \times 100$$

$$\times 100$$

Tabla 1: - Sacarificación de la biomasa con contenido variable de celulosa

Ejemplo nº	Carga de biomasa	Contenido de holocelulosa	% de solubilización
		80%	35,75%
1	15%	85%	58,16%
		95%	71,50%

55 Ejemplo 2

Sacarificación de biomasa con carga variable de biomasa

La biomasa pretratada que consistía en un contenido de holocelulosa (70% a 95%) derivado de tratamiento con ácido/álcali de paja de trigo se solubilizó en una solución de enzima mantenida a 50°C y pH 5,0 con una carga total de sólidos secos de 15,0%, 20,0% y 30,0%. El material residual inicial consistía en 37,5 g de biomasa en peso seco que se mezcló con una solución de enzima compuesta de celulasa B (Advanced Enzyme Technology Ltd., Thane, India) y 750 g de agua acidificada a una carga de proteína de 27,75 mg/g de biomasa. La masa de reacción se agitó a 300 rpm y se mantuvo la temperatura a 50°C y a pH 5,0. La biomasa restante se añadió gradualmente en 0,5 a 1,0 h a fin de incrementar la carga de sólidos a 15,0%, 20,0% y 30,0%. Se determinó el porcentaje de solubilización tal como se ha mencionado anteriormente, en el Ejemplo 1.

Tabla 2: sacarificación de biomasa con carga variable de biomasa

Ejemplo nº	Carga de biomasa	Contenido de holocelulosa	% de solubilización
	15%	95%	71,50%
2	20%	95%	58,13%
	30%	95%	52,78%

Ejemplo 3

Sacarificación de la biomasa pretratada

La biomasa pretratada derivada mediante tratamiento con ácido/álcali de paja de trigo se solubilizó en una solución de enzima mantenida a 50°C y pH 5,0 con una carga total de sólidos secos de 15%. El material residual inicial consistía en 37,5 g de biomasa en peso seco que se mezcló con una solución de enzima compuesta de celulasa B (Advanced Enzyme Technology Ltd., Thane, india) y 750 g de agua acidificada a una carga de proteína de 27,75 mg/g de biomasa. La masa de reacción se agitó a 300 rpm y se mantuvo la temperatura a 50°C y a pH 5,0. La biomasa restante se añadió gradualmente en 0,5 a 1,0 h a fin de incrementar la carga de sólidos a 1 %. Se determinó el porcentaje de solubilización tal como se ha mencionado anteriormente, en el Ejemplo 1.

Tabla 3: sacarificación de biomasa pretratada con celulasa B

Ejemplo nº	Componente de biomasa	Tipo de biomasa	Enzima	pH	% de solubilización
3	Celulosa	Paja de trigo	Celulasa B	5,0	73,14
	Holocelulosa				62,14

Ejemplo 4

Partes alimentadas y solubilización de la biomasa (~85% de holocelulosa)

Se añadieron 100 g (masa seca) de biomasa pretratada (~85% de holocelulosa) a 2 l de solución de enzima mantenida a 50°C y pH 5,0 a fin de obtener una proporción de sustrato:enzima de 1:10⁶ (kg de biomasa/FPU de enzima). Se llevaron a cabo adiciones graduales de 200 g de biomasa pretratada en tres, cinco, siete y nueve partes alimentadas durante la siguiente hora a fin de obtener una proporción de sustrato:enzima de 1:10⁵ (kg de biomasa/FPU de enzima). Se dejó que transcurriese la reacción durante una hora bajo las condiciones anteriormente indicadas. La mezcla de reacción completa se centrifugó para separar el residuo sólido respecto de la masa solubilizada, que se sometió adicionalmente a filtración a través de membrana para separar los azúcares y el enzima. Se determinó el porcentaje de solubilización tal como se ha mencionado anteriormente, en el Ejemplo 1. La tabla a continuación muestra el % de solubilización que puede alcanzarse.

Tabla 4: efecto de las partes alimentadas sobre la solubilización de la biomasa ~85% de holocelulosa)

Ejemplo nº	Carga de biomasa	Partes alimentadas	% de solubilización
3	15%	3	56,76%
		5	62,14%
		7	65,50%
		9	68,30%

Ejemplo 5

Partes alimentadas y solubilización de la biomasa (~92% de celulosa)

Se añadieron 100 g (masa seca) de biomasa pretratada (~92% de celulosa) a 2 l de solución de enzima mantenida a 50°C y pH 5,0 a fin de obtener una proporción de sustrato: enzima de 1:10⁶ (kg de biomasa: FPU de enzima). Se llevaron a cabo adiciones graduales de 200 g de biomasa pretratada en tres, cinco, siete y nueve partes alimentadas durante la siguiente hora a fin de obtener una proporción de sustrato:enzima de 1:10⁵ (kg de biomasa/FPU de enzima). Se dejó que transcurriese la reacción durante una hora bajo las condiciones anteriormente indicadas. La mezcla de reacción completa se centrifugó para separar el residuo sólido respecto de la masa solubilizada, que se sometió

adicionalmente a filtración a través de membrana para separar los azúcares y el enzima. Se determinó el porcentaje de solubilización tal como se ha mencionado anteriormente, en el Ejemplo 1. La tabla a continuación muestra el % de solubilización que puede alcanzarse.

5 Tabla 5: efecto de las partes alimentadas sobre la solubilización de la biomasa ~92% de celulosa)

Ejemplo nº	Carga de biomasa	Partes alimentadas	% de solubilización
5	15%	3	65,51%
		5	72,80%
		7	75,98%
		9	79,58%

Ejemplo 6

Tamaño de partícula para la solubilización de la biomasa

10 Se redujo el tamaño de la paja de arroz y se sometió a pretratamiento con álcali para holocelulosa (>80% celulosa). La muestra pretratada anterior se añadió a una solución de enzima mantenida a 50°C y pH 5,0 para producir una concentración inicial de 5%. Se llevaron a cabo adiciones lentas de biomasa pretratada durante la siguiente hora para acumular la concentración de biomasa a 15%. Se dejó que transcurriese la reacción durante otra hora bajo las
15 condiciones anteriormente indicadas. La mezcla de reacción completa se centrifugó para separar el residuo sólido respecto de la masa solubilizada, que se sometió adicionalmente a filtración a través de membrana para separar los azúcares y el enzima. Se determinó el porcentaje de solubilización tal como se ha mencionado anteriormente, en el Ejemplo 1. La tabla a continuación muestra el % de solubilización que puede alcanzarse.

20 Tabla 6: efecto del tamaño de partícula sobre la solubilización de la biomasa

Ejemplo nº	Carga de biomasa	Tamaño de la biomasa	% de solubilización
6	15%	1 mm	68,17%
	15%	0,4mm	73,14%
	15%	0,05mm	35,60%

Ejemplo 7

Comparación entre la hidrólisis de celulosa por lotes y alimentada por lotes

25 Se añadieron 300 g (masa seca) de biomasa pretratada (>80% celulosa) a 2 l de solución de enzima mantenida a 50°C y pH 5,0 en dos modos diferentes de reacción: a) lote de adición única y b) adiciones graduales durante una hora - alimentación por lotes. Se dejó que transcurriese la reacción durante una hora bajo las condiciones anteriormente indicadas. La mezcla de reacción completa se centrifugó para separar el residuo sólido respecto de la masa
30 solubilizada, que se sometió adicionalmente a filtración a través de membrana para separar los azúcares y el enzima. Se determinó el porcentaje de solubilización tal como se ha mencionado anteriormente, en el Ejemplo 1. La tabla a continuación muestra el % de solubilización que puede alcanzarse.

35 Tabla 7: solubilización de la biomasa - comparación entre modos de operación

Ejemplo nº	Carga de biomasa	Modo de operación	% de solubilización
7	15%	Lote	25,98%
		Lote alimentado	62,37%

Ejemplo 8

Efecto de la carga de enzima sobre la hidrólisis de la biomasa

40 Se añadieron 100 g (masa seca) de biomasa pretratada (>80% de celulosa) a 2 l de solución de enzima que contenía diferentes cargas de proteína a fin de obtener una proporción de sustrato: enzima de 1:10⁴ a 1:10⁷ (kg de biomasa/FPU de enzima). La reacción se llevó a cabo a 50°C y pH 5,0. Se llevaron a cabo adiciones lentas de 200 g de biomasa pretratada durante la siguiente hora para incrementar la concentración de la biomasa a 15% y se dejó que transcurriese la reacción durante otra hora bajo las condiciones anteriormente indicadas. La mezcla de reacción completa se
45 centrifugó para separar el residuo sólido respecto de la masa solubilizada, que se sometió adicionalmente a filtración a través de membrana para separar los azúcares y el enzima. Se determinó el porcentaje de solubilización tal como se ha mencionado anteriormente, en el Ejemplo 1. La tabla a continuación muestra el % de solubilización que puede alcanzarse.

50

Tabla 8: efecto de la carga de enzima sobre la solubilización de la biomasa

Ejemplo nº	Carga de biomasa	Carga de enzima (kg de biomasa/FPU de enzima)	Parte alimentada	% de solubilización
8	15%	1: 10 ⁴	5	18,45%
		1: 3x10 ⁴		32,14%
		1: 4x10 ⁴		54,35%
		1:6x10 ⁴		62,37%
		1: 10 ⁵		68,14%

Ejemplo 9

5 Hidrólisis continua de holocelulosa (~85% de holocelulosa) con reciclado del enzima

Se añadieron 100 g (masa seca) de biomasa pretratada (~85% de holocelulosa) a 2 l de solución de enzima mantenida a 50°C y pH 5,0 a fin de obtener una proporción de sustrato:enzima de 1:10⁶ (kg de biomasa/FPU de enzima). Se llevaron a cabo adiciones graduales de 200 g de biomasa pretratada durante la siguiente hora a fin de obtener una proporción de sustrato:enzima de 1:10⁵ (kg de biomasa/FPU de enzima). Se dejó que transcurriese la reacción durante una hora bajo las condiciones anteriormente indicadas. La mezcla de reacción completa se centrifugó para separar el residuo sólido respecto de la masa solubilizada, que se sometió adicionalmente a filtración a través de membrana para separar los azúcares y el enzima. El residuo sólido y el enzima soluble se reciclaron y se añadieron gradualmente 150 g de biomasa nueva durante la siguiente hora a fin de obtener una proporción de sustrato:enzima de 1:10⁵ (kg de biomasa/FPU de enzima). La mezcla de reacción completa se sometió nuevamente a centrifugación y filtración a través de membrana a fin de obtener el residuo sólido y enzima soluble que se recicló nuevamente durante un periodo de tres ciclos consecutivos. Se determinó el porcentaje de solubilización tal como se ha mencionado anteriormente, en el Ejemplo nº 1.

Tabla 9: hidrólisis continua de holocelulosa con reciclados de enzima

Ejemplo nº	Nº de ciclo	Carga de biomasa, % (p/p)	Carga de enzima (kg de biomasa/FPU de enzima)	Tiempo de reacción (h)	% de solubilización
9	1	15%	1:10 ⁵	2	61,8%
	2		Enzima reciclado	2	48,15%
	3		Enzima reciclado	2	42,86%
	4		Enzima reciclado	2	47,24%

Ejemplo 10

25 Proporciones de sustrato:enzima en la mezcla de reacción

Se añadieron 300 g (masa seca) de biomasa pretratada (>80% holocelulosa) a 2 l de solución de enzima en diferentes proporciones de sustrato:enzima de (1:10² a 1:10⁷) mantenido a 50°C y pH 5,0 en cinco adiciones graduales durante 1,5 h. La reacción se agitó durante una hora bajo las condiciones anteriormente indicadas. La mezcla de reacción completa se filtró a través de una malla de nilón para separar el residuo sólido respecto de la masa solubilizada, que se sometió adicionalmente a filtración (micro+ultra) a través de membrana para separar los azúcares solubles y el enzima. Se determinó el porcentaje de solubilización tal como se ha mencionado anteriormente, en el Ejemplo 1. La tabla a continuación muestra el % de solubilización que puede alcanzarse.

Tabla 10: efecto de la proporción de sustrato:enzima sobre la solubilización de la biomasa

Ejemplo nº	Carga de enzima (kg de biomasa/FPU de enzima)	Parte alimentada	% de solubilización
10	1:10 ²	5	0,86%
	1:10 ³		5,34%
	1:10 ⁴		17,90%
	1:10 ⁵		67,87%
	1:10 ⁶		75,14%
	1:10 ⁷		83,52%

Ejemplo 11

40 Reutilización de enzima para la solubilización de la holocelulosa (>95% holocelulosa)

Se añadieron 300 g (masa seca) de biomasa pretratada (>95% holocelulosa) a 2 l de solución de enzima mantenida a 50°C y pH 5,0 en cinco adiciones graduales durante 1,5 h. La reacción se agitó durante una hora bajo las condiciones anteriormente indicadas. La mezcla de reacción completa se filtró a través de una malla de nilón para separar el residuo sólido respecto de la masa solubilizada, que se sometió adicionalmente a filtración (micro+ultra) a través de membrana para separar los azúcares solubles y el enzima. La solución de enzima recuperada tras la filtración a través

de membrana se mezcló con el residuo sólido obtenido tras la filtración. A continuación, se añadieron partes nuevas de biomasa pretratada a la mezcla para alcanzar una carga de sólidos de 15%. El esquema de operaciones anterior se repitió durante cinco ciclos. Se determinó el porcentaje de solubilización tal como se ha mencionado anteriormente, en el Ejemplo 1. La tabla a continuación muestra el % de solubilización que puede alcanzarse en cada ciclo.

5

Tabla 11: reutilización de enzima para la solubilización de la biomasa

Ejemplo nº	Reciclado de enzima	Parte alimentada	% de solubilización
11	1	5	82,31
	2		75,10
	3		72,34
	4		70,23
	5		68,23

Ejemplo 12

10 Reciclado de enzima soluble para la solubilización de la biomasa

Se añadieron 300 g (masa seca) de biomasa pretratada (>85% holocelulosa) a 2 l de solución de enzima mantenida a 50°C y pH 5,0 en cinco adiciones graduales durante 1,5 h. La reacción se agitó durante una hora bajo las condiciones anteriormente indicadas. La mezcla de reacción completa se filtró a través de una malla de nilón para separar el residuo sólido respecto de la masa solubilizada, que se sometió adicionalmente a filtración (micro+ultra) a través de membrana para separar los azúcares solubles y el enzima. La solución de enzima recuperada tras la filtración a través de membrana se diluyó en tampón acidificado nuevo hasta alcanzar 2 l. A continuación, se añadieron partes nuevas de biomasa pretratada a la solución de enzima para alcanzar una carga de sólidos de 15%. El esquema de operaciones anterior se repitió durante cinco ciclos. Se determinó el porcentaje de solubilización tal como se ha mencionado anteriormente, en el Ejemplo 1. La tabla a continuación muestra el % de solubilización que puede alcanzarse en cada ciclo.

15

20

Tabla 12: reciclado de enzima soluble para la solubilización de la biomasa

Ejemplo nº	Reciclado de enzima	Parte alimentada	% de solubilización
12	1	5	68,21
	2		45,10
	3		22,34
	4		10,23
	5		2,31

25 Ejemplo 13

Solubilización de la celulosa con concentraciones variables de enzima (mg/g de biomasa)

Para la reacción se utilizó celulosa obtenida por tratamiento con álcali de paja de trigo a 50°C y pH 5,0 cn una carga de sólidos secos de 15,0%. El material residual inicial consistía en 1.000 g de agua (pH 5) y 37,5 g de celulosa. La masa de reacción se agitó a 300 rpm. La temperatura se mantuvo a 50°C y el pH, a 5,0. El enzima añadido al sistema de reacción era celulasa B (Advanced Enzyme Technology Ltd., Thane, India) a una carga de proteína de 4,625 mg, 11,56 mg/kg, 18,5 mg/g, 27,75 mg/g y 46,25 mg/g de biomasa. Tras la licuefacción, se añadió gradualmente la biomasa restante en cinco partes alimentadas en 1,0 a 1,5 h para incrementar la carga de sólidos a 15%. Se determinó el contenido de azúcares en la reacción mediante protocolos de medición de los azúcares (Ghose et al., Measurement of cellulase activity. Pure and Applied Chemistry, 59(2) 257-268, 1988). La cantidad de glucosa liberada se incrementa con la carga de enzima, tal como se indica en la Tabla 13.

30

35

Tabla 13: concentración variable de enzima y solubilización de la celulosa

Ejemplo nº	Carga de enzima, mg/g	Nº de parte alimentada	% de azúcares solubles
	4,62		0,41
13	11,56	5	2,84
	18,50		3,00
	27,75		4,10
13	46,25	5	5,50

40

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de azúcares solubles a partir de biomasa, que comprende:
 - a. preparar una solución de enzima con un pH en el intervalo de 4 a 6 en un recipiente reactor a una temperatura en el intervalo de 40°C a 60°C,
 - b. añadir un lote de biomasa con un % de holocelulosa en el intervalo de 70% a 100% y un contenido de humedad en el intervalo de 10% a 80% (p/p) a la solución enzimática en la etapa (a), manteniendo simultáneamente el pH en el intervalo de 4 a 6 y una temperatura de 40°C a 60°C a fin de obtener una mezcla de reacción inicial que contiene una proporción de biomasa:enzima predeterminada, en la que la proporción de biomasa:enzima predeterminada en la mezcla de reacción inicial se encuentra comprendida en el intervalo de 1:10⁴ a 1:10⁶ (kg de biomasa/FPU de enzima);
 - c. añadir la biomasa restante en lotes repetidamente tal como en la etapa (b) durante un periodo de 30 a 90 min a fin de obtener una carga de sólidos de 10% a 30% en la mezcla de reacción final, en la que la proporción de biomasa:enzima se mantiene en el intervalo de 1:10³ a 1:10⁵ (kg de biomasa/FPU de enzima);
 - d. dejar que la mezcla de reacción final reaccione durante 5 a 120 min adicionales a fin de obtener un hidrolizado de biomasa, en el que se alcanza una solubilización de la biomasa de 40% a 80%;
 - e. separar el contenido de sólidos-líquido del hidrolizado de biomasa de la etapa (d) a fin de obtener un filtrado que comprende azúcares solubles y enzima, y un residuo de biomasa no hidrolizada y enzima adsorbido;
 - f. separar el enzima soluble respecto de los azúcares solubles presentes en el filtrado; y
 - g. reciclar el residuo de la etapa (e) y el enzima soluble separado de la etapa (f) a la etapa (b) para mantener la proporción de biomasa:enzima predeterminada para la producción de azúcares solubles.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha biomasa es producto agrícola seleccionado del grupo que consiste en mazorcas de maíz, rastrojo de maíz, fibra de maíz, hojas de maíz, serrín, paja de trigo, bagazo de caña azucarera, hierbas de mijo, paja de arroz y herbáceas, y pretratado convenientemente para enriquecer en holocelulosa a >70% y conseguir que la holocelulosa sea accesible a la reacción enzimática.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho enzima se selecciona del grupo que consiste en celulasas, peptidasas, lipasas, ligninasas, feruloil esterases y enzimas auxiliares adicionales.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho enzima es celulasa.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha solución de enzima se prepara en un recipiente reactor a una carga de proteína en el intervalo de 2 mg/g a 95 mg/g de biomasa.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha solución de enzima se prepara en un recipiente reactor a una carga de proteína en el intervalo de 4,625 mg/g a 46,25 mg/g de biomasa.
7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho lote de biomasa se carga inicialmente en el recipiente reactor como suspensión mezclable con una concentración en el intervalo de 1% a 10% (p/v).
8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la biomasa restante se añade constantemente en dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, nueve, diez o doce partes alimentadas en 0,5 a 1,5 h para incrementar la carga de sólidos por lo menos a 30% (p/v).
9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la biomasa se añade constantemente en tres a nueve partes alimentadas en 0,5 a 1,0 h para incrementar la carga de sólidos a por lo menos 15% (p/v).
10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la concentración de azúcares solubles en el hidrolizado de biomasa es de por lo menos 75 g/l de azúcares solubles totales a alta concentración.
11. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha biomasa se convierte en azúcares solubles en 0,5 a 2 h.
12. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichos azúcares solubles comprenden polisacáridos y monosacáridos.
13. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho azúcar soluble es glucosa.
14. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la concentración final de glucosa más alta en los azúcares solubles obtenida es de entre 50 y 150 g/l.

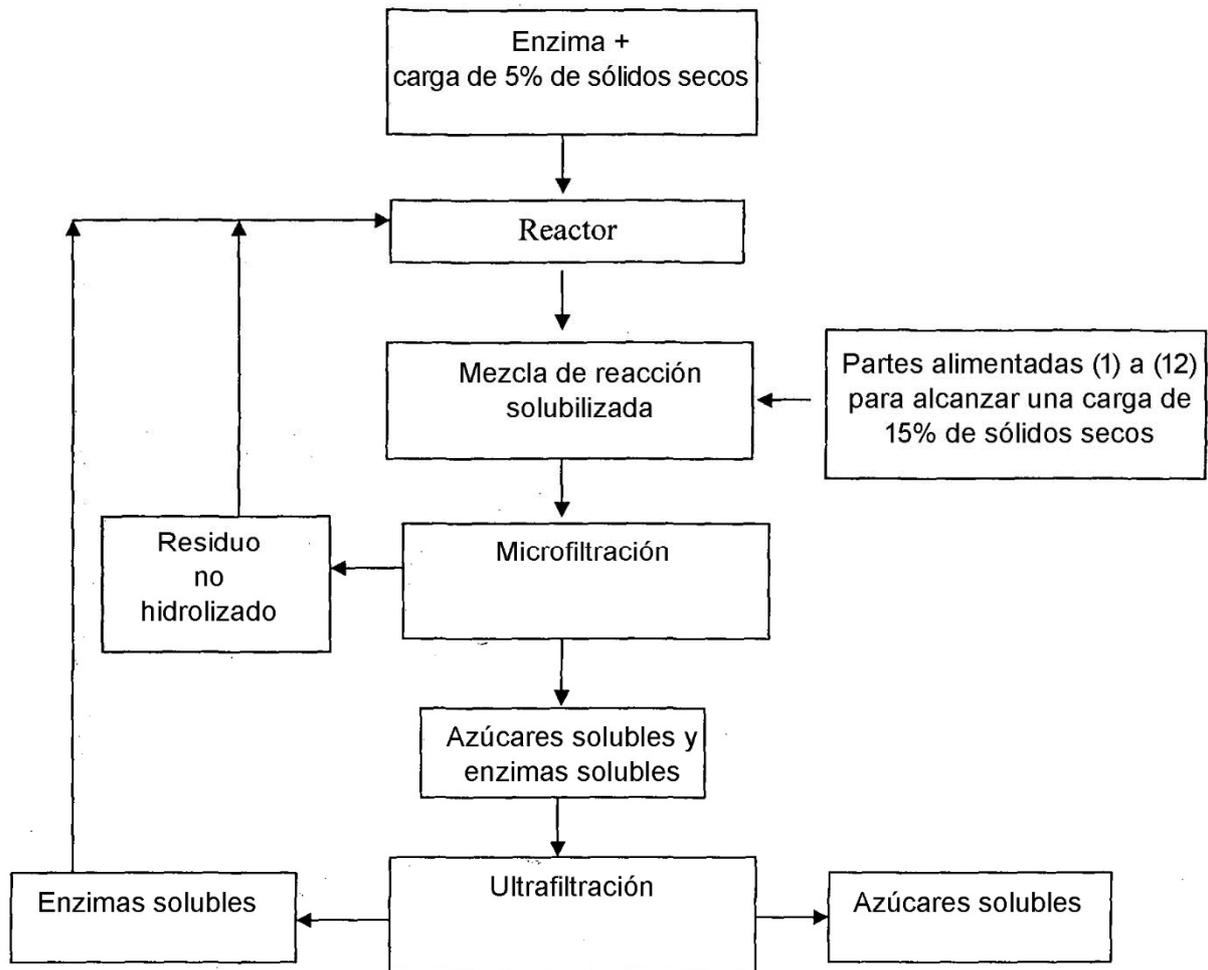


FIGURA 1