

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 218**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/06** (2006.01)

**C12P 19/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2011 PCT/EP2011/002974**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2011 WO11157427**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2011 E 11725883 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2582820**

54 Título: **Hidrólisis enzimática de celulosa**

30 Prioridad:

**17.06.2010 EP 10006308**

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

**28.11.2019**

73 Titular/es:

**BORREGAARD AS (100.0%)  
Hjalmar Wessels vei 6  
1721 Sarpsborg, NO**

72 Inventor/es:

**SJOEDE, ANDERS;  
FROELANDER, ANDERS;  
LERSCH, MARTIN;  
ROEDSRUD, GUDBRAND;  
HALS, KRISTIN;  
KLOEFTEN, ANNE MARI;  
DELIN, LENNART y  
JOHANSSON, MATS, H.**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 733 218 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Hidrólisis enzimática de celulosa

5 **Compendio de la invención**

La presente invención se refiere a un proceso *continuo* para la hidrólisis enzimática de biomasa celulósica. La hidrólisis mejorada según la presente invención es de uso particular en la conversión global de biomasa para celulosa, es decir, el proceso de convertir biomasa celulósica en sustancias químicas o mercancías útiles, por ejemplo, biocombustibles.

10 En una forma de realización, la presente invención se refiere a un proceso para la hidrólisis continua de biomasa celulósica que comprende al menos las siguientes etapas:

(P) proporcionar al menos un reactor, que se puede operar en estado estacionario;

15 (A) añadir una cantidad predeterminada de biomasa celulósica a dicho reactor, en donde dicha biomasa celulósica tiene un contenido sólido de al menos el 10%, preferiblemente al menos el 15%, preferiblemente al menos el 20%, preferiblemente al menos el 25%, más preferiblemente al menos el 30%; más preferiblemente del 10% al 45%, más preferiblemente del 15% al 45%, más preferiblemente del 20% al 40% o del 15% al 30%;

(A') añadir una cantidad predeterminada de enzimas a dicho reactor;

20 (E) realizar al menos una hidrólisis enzimática parcial de la biomasa celulósica en dicho reactor, en donde se alcanza un estado estacionario, en el que la biomasa celulósica se añade continuamente a dicho reactor, mientras que la biomasa celulósica al menos parcialmente hidrolizada se retira continuamente de dicho reactor, en donde dicha biomasa celulósica al menos parcialmente hidrolizada que se retira continuamente tiene una viscosidad, medida en un reómetro Physica MCR 101 en un vaso con un agitador (FL 100/6W) de no más de 25 Pa·s (Pascal segundos),  
25 preferiblemente no más de 10 Pa·s, preferiblemente no más de 5 Pa·s, más preferiblemente no más de 3 Pa·s, más preferiblemente no más de 1 Pa·s y en donde la viscosidad esencialmente permanece por debajo de 25 Pa·s durante el curso de dos horas o más.

30 La viscosidad se mide en condiciones estándar (20°C, 1 baro). El experto en la materia tendrá información adicional sobre cómo medir dicha viscosidad a partir del ejemplo dado en la presente solicitud.

Preferiblemente, en dicho estado estacionario, dicha viscosidad permanece esencialmente constante o permanece esencialmente por debajo de 25 Pa·s durante el curso de 4 horas, 6 horas, 12 horas o más.

35 El fin de establecer un estado estacionario en dicho reactor es permitir la hidrólisis de la biomasa celulósica que tiene un contenido sólido comparativamente alto. Es deseable correr la hidrólisis enzimática a altas cargas de sólidos, preferiblemente el 10% de contenido sólido total ("ST") o mayor, en particular desde una perspectiva medioambiental y económica, ya que esto reduce el consumo de agua y energía, así como los costes de inversión en equipo. Sin embargo, uno de los retos de hidrolizar biomasa celulósica de un alto contenido sólido es alcanzar suficiente mezclado  
40 dada la alta viscosidad de la papilla con el alto contenido en sólidos. Convencionalmente, en particular en los procesos por lotes conocidos de la técnica, el mezclado es solo posible usando maquinaria exigente en energía y de diseño complejo.

45 Según la presente invención, en dicho reactor, se logra una reacción de hidrólisis en estado estacionario. En el mismo, la biomasa celulósica de un alto contenido en sólidos totales (preferiblemente del 10% o mayor, más preferiblemente entre el 15 y el 40%) se añade continuamente a dicho reactor, mientras que la biomasa celulósica al menos parcialmente hidrolizada se retira continuamente de dicho reactor. El estado estacionario se ajusta, es decir, la cantidad de biomasa celulósica añadida y la cantidad de biomasa celulósica al menos parcialmente hidrolizada retirada se ajusta, de modo que el tiempo de retención medio de la biomasa celulósica en el reactor es más largo que el "tiempo de licuación" medio respectivo, es decir, el periodo de tiempo requerido para transformar una papilla sólida en un líquido bombeable durante la hidrólisis, es decir, el tiempo requerido para disminuir la viscosidad de la papilla a un valor, que es aceptable para procesamiento adicional.

50 Según la presente invención, este "tiempo de licuación" se describe de forma adecuada mediante la viscosidad de la biomasa celulósica al menos parcialmente hidrolizada que se retira continuamente del reactor. Dicha viscosidad, medida en un reómetro Physica MCR 101 en un vaso con un agitador (FL 100/6W), no es más de 25 Pa·s (Pascal segundos), preferiblemente no más de 10 Pa·s, preferiblemente no más de 5 Pa·s, más preferiblemente no más de 3 Pa·s, más preferiblemente no más de 1 Pa·s.

60 En una forma de realización preferida, según la cual el rendimiento de glucosa del proceso global aumenta, el proceso para la hidrólisis continua de biomasa celulósica se implementa en una cascada de al menos dos reactores, es decir, la etapa (P) es:

(P) proporcionar una cascada de al menos dos reactores, que se pueden operar en estado estacionario.

65

En una forma de realización preferida, dicho proceso para la hidrólisis continua de biomasa celulósica comprende al menos las siguientes etapas:

- (P) proporcionar una cascada de al menos dos reactores, que se pueden operar en estado estacionario;
- 5 (A) añadir una cantidad predeterminada de biomasa celulósica a dicho primer reactor, en donde dicha biomasa celulósica tiene un contenido sólido de al menos el 10%, preferiblemente al menos el 15%, preferiblemente al menos el 20%, preferiblemente al menos el 25%, más preferiblemente al menos el 30%; más preferiblemente del 10% al 45%, más preferiblemente del 15% al 45%, más preferiblemente del 20% al 40% o del 15% al 30%;
- (A') añadir una cantidad predeterminada de enzimas a dicho primer reactor;
- 10 (E) realizar hidrólisis enzimática parcial de la biomasa celulósica en dicho primer reactor,
- (T) retirar continuamente biomasa celulósica parcialmente hidrolizada de la etapa (E1), que tiene una viscosidad, medida en un reómetro Physica MCR 101 en un vaso con un agitador (FL 100/6W), de no más de 25 Pa·s (Pascal segundos), preferiblemente no más de 10 Pa·s, preferiblemente no más de 5 Pa·s, más preferiblemente no más de 3 Pa·s, más preferiblemente no más de 1 Pa·s, y transferir la misma a un segundo reactor, que se puede operar en estado estacionario;
- 15 (E') realizar hidrólisis enzimática adicional en la biomasa celulósica parcialmente hidrolizada de la etapa (E) en dicho segundo reactor.

### Antecedentes y estado de la técnica

- 20 Como en general se acepta, los recursos para sustancias químicas basadas en petróleo y para petróleo usado como combustible (fósil) son limitados. Un recurso alternativo actualmente usado es "*biocombustible*" obtenido de biomasa. Se pueden usar varias fuentes de biomasa.
- 25 Los "*biocombustibles de primera generación*" son biocombustibles hechos a partir de azúcar, almidón, aceite vegetal, o grasas animales usando tecnología convencional. La materia prima básica ejemplar para la producción de biocombustibles de primera generación son semillas o granos tal como trigo, que dan almidón que se hidroliza y fermenta a bioetanol, o semillas de girasol, que se comprimen para dar aceite vegetal que se puede transformar en biodiesel. Sin embargo, estas materias primas podrían en su lugar entrar en la cadena alimentaria animal o humana.
- 30 Por tanto, los biocombustibles de primera generación se han criticado por desviar alimentos de la cadena alimentaria humana, produciendo escasez de alimentos y aumentos de precios.

Por el contrario, el "*biocombustible de segunda generación*" se puede producir sosteniblemente usando biomasa compuesta de las partes residuales no alimenticias (es decir, no digeribles) de cultivos actuales, tal como tallos, hojas, bagazo (residuo de fibra de caña de azúcar), cascarrillas, etc., que se dejan detrás una vez el cultivo alimenticio se ha extraído, así como otra materia prima que no se usa para fines alimenticios (cultivos no alimenticios), tal como madera, plantas anuales y cereales que comprenden poco grano, y también desechos industriales tal como serrín, pieles y pulpa de exprimir frutas, procesamiento de vino etc.

40 Una etapa importante en la conversión de biomasa global para este biocombustible de segunda generación es la hidrólisis de biomasa celulósica sin tratar o tratada en unidades más pequeñas. En dicha etapa de hidrólisis, las cadenas de celulosa se rompen por medio de romper al menos un enlace glucosídico  $\beta$ -1-4.

Más específicamente, la celulosa es un polímero lineal insoluble de unidades de glucano repetitivas unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1-4. En agua, la celulosa típicamente se hidroliza por el ataque del hidrógeno electrofílico de la molécula de agua sobre el enlace glucosídico. En las cadenas de celulosa, cada unidad de glucosa tiene el potencial para formar tres enlaces de hidrógeno con monómeros en cadenas adyacentes, produciendo una estructura cristalina estable, que no se hidroliza fácilmente. La velocidad de la reacción de hidrólisis se puede aumentar mediante el uso de temperaturas y presiones elevadas o puede estar catalizada por ácido diluido o concentrado o por enzimas (como es el caso en la presente invención).

A escala industrial, es de interés particular hidrolizar biomasa celulósica con un alto contenido en sólidos. Convencionalmente, la biomasa celulósica que tiene un alto contenido en sólidos se hidroliza usando tiempos de hidrólisis excesivos, que con frecuencia abarcan 5-7 días, algunas veces empleando configuraciones combinadas donde se realizan hidrólisis y fermentación simultáneamente.

El documento US 2009/0209009 se refiere a la hidrólisis enzimática de celulosa y divulga que el coste de las enzimas se puede reducir introduciendo un dominio de unión a celulosa en uno de los componentes enzimáticos necesario para la degradación de celulosa, es decir, beta-glucosidasa. Para lograr esto, se necesitan agentes de unión específicos. Este agente de unión permite que la enzima se una a la celulosa para reciclaje conveniente. Además, la reacción de hidrólisis se realiza en reactores que retienen sólidos dedicados, en donde los sólidos tienen un tiempo de retención que es más largo que el de líquido.

El documento WO 2009/140674 describe un proceso por lotes alimentados con separación de sólidos y dilución del sustrato para poder manejar grandes cantidades de sólidos suspendidos totales (SST) en el reactor.

Un artículo por Brethauer, S.; Wyman, C. E. "Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production" *Biores. Technol.* 2010, 4862 discute el proceso de hidrólisis y fermentación por lotes frente al continuo en términos generales, pero con énfasis en la fermentación. Las ventajas mencionadas incluyen tiempo de apagado del recipiente reducido para limpiar y llenar que se traduce en una productividad volumétrica aumentada, reactores más pequeños, menor inversión de capital, y facilidad de control en estado estacionario. Los datos presentados en el artículo son de experimentos de fermentación continua.

Un artículo por Fan, Z.L.; South, C.; Lyford, K.; Munsie, J.; van Walsum, P.; Lynd, L. R. "Conversion of paper sludge to ethanol in a semi continuous solids-fed reactor" *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2003, volumen 26, páginas 93-101 describe un reactor semicontinuo donde se alimenta residuos de papel a ciertos intervalos a un reactor que corre a SFS (= sacarificación y fermentación simultánea). Los autores observan que al disminuir la frecuencia de alimentación (adiciones de alimentación por tiempo de residencia), se puede disminuir la carga de celulosa.

El artículo científico con el título "A Model for Continuous Enzymatic Saccharification of Cellulose with Simultaneous Removal of Glucose Syrup" por Tarun K. Ghose et al., de *Biotech. & Bioeng.* (1970), páginas 921 - 946, XP002657297 divulga celulosa de *trichoderma viride* que se concentró en membranas de varios límites moleculares. Se estudiaron las velocidades de flujo y la retención de actividad en condiciones de ultrafiltración. Las enzimas concentradas se usaron para sacarificar sustrato finamente molido (Solka Floe) en reactores tanques agitados (STR) y de membrana (MR).

Un artículo científico adicional con el título "Analysis of process integration and intensification of enzymatic cellulose hydrolysis in a membrane bioreactor", por Q Gan et al. publicado en *J. Chem. Tech & Biotech* (2005), vol. 80, páginas 688 - 698, XP002657298, divulga cómo la cinética de la reacción y la productividad del reactor se pueden mejorar en un proceso que implica la reacción y separación de productos simultáneas usando un reactor de membrana con una única zona de reacción y zona de separación combinadas. Se investigaron diferentes estrategias de operación de hidrólisis de celulosa por lotes, lote alimentado y continua con eliminación de productos (azúcares reductores) intermitente o simultánea para reducir la inhibición enzimática y mejorar la productividad del reactor.

A la luz del estado de la técnica como se ha discutido anteriormente, un objeto de la presente invención es proporcionar un proceso para la hidrólisis enzimática de biomasa celulósica, en el que una biomasa celulósica con contenido en sólidos comparativamente alto se puede hidrolizar en condiciones a escala industrial mientras que se minimizan costes (de inversión y operación).

Este objeto (y otros) se resuelve(n) mediante el siguiente proceso para la hidrólisis continua de biomasa celulósica que comprende al menos las siguientes etapas:

(P) proporcionar al menos un reactor, que se puede operar en estado estacionario;

(A) añadir una cantidad predeterminada de biomasa celulósica a dicho reactor, en donde dicha biomasa celulósica tiene un contenido sólido de al menos el 10%, preferiblemente al menos el 15%, preferiblemente al menos el 20%, preferiblemente al menos el 25%, más preferiblemente al menos el 30%; más preferiblemente del 10% al 45%, más preferiblemente del 15% al 45%, más preferiblemente del 20% al 40% o del 15% al 30%;

(A') añadir una cantidad predeterminada de enzimas a dicho reactor;

(E) realizar al menos una hidrólisis enzimática parcial de la biomasa celulósica en dicho reactor,

en donde se alcanza un estado estacionario, en el que biomasa celulósica se añade continuamente a dicho reactor, mientras que biomasa celulósica al menos parcialmente hidrolizada se retira continuamente de dicho reactor, en donde dicha biomasa celulósica al menos parcialmente hidrolizada que se retira continuamente tiene una viscosidad, medida en un reómetro Physica MCR 101 en un vaso con un agitador (FL 100/6W), de no más de 25 Pa·s (Pascal segundos), preferiblemente no más de 10 Pa·s, preferiblemente no más de 5 Pa·s, más preferiblemente no más de 3 Pa·s, más preferiblemente no más de 1 Pa·s y en donde la viscosidad esencialmente permanece por debajo de 25 Pa·s durante el curso de dos horas o más.

En el mismo, y a lo largo de la descripción entera de la presente invención, el término "contenido en sólido" (también conocido para el experto en materia como "ST" o "sólidos totales") indica la proporción entre el peso de una muestra después de que se haya secado a 105°C durante 16 h, y el peso de la misma muestra antes de dicho secado.

Correspondientemente, el término "SDT" o "sólidos disueltos totales" como se usa a lo largo de la presente solicitud indica la proporción entre el peso del filtrado seco (105°C durante 16 h) resultante de una muestra después de que se haya filtrado y el peso de la misma muestra antes de dicha filtración y secado.

El término "SST" o "sólidos suspendidos totales" indica la proporción entre el peso de la torta del filtro seca (105°C durante 16 h) resultante de una muestra después de se haya filtrado y el peso de la misma muestra antes de dicha filtración y secado. Por tanto, la relación entre estas medidas es  $ST = SDT + SST$

Al implementar el proceso continuo según la presente invención, es decir, por medio de establecer un estado estacionario y una pauta de viscosidad definida, los problemas basados en la alta viscosidad inicial y diseño complejo

del reactor se resuelven. En particular, la presente invención resuelve el problema de realizar una hidrólisis enzimática comercialmente viable a alta carga de sólidos, mientras se mantiene la viscosidad en el reactor baja. La presente invención permite correr la hidrólisis enzimática a un alto contenido de sólidos totales y a un bajo contenido de sólidos suspendidos totales ("SST") como un proceso continuo con o sin reciclaje de enzimas.

5 No se requiere agitación especial del reactor puesto que no hay problema con alto SST. Como consecuencia, se pueden usar CSTR (reactores de tanque agitado continuamente) convencionales para el proceso de la presente invención. Por tanto, preferiblemente, el (al menos un) reactor usado en el proceso según la presente invención es un reactor agitado continuamente, más preferiblemente un reactor de tanque agitado continuamente.

10 Una forma de realización adicional que resuelve el/los objeto(s) anteriormente mencionado(s) también aumenta el rendimiento de glucosa del proceso global. En la misma, el proceso para la hidrólisis continua de biomasa celulósica según la presente invención, en particular la etapa (P) se implementa en una cascada de al menos dos reactores.

15 No hay límite respecto al máximo número de reactores. El número de reactores operados en una cascada (es decir, operados secuencialmente) depende esencialmente del rendimiento de glucosa deseado.

20 En un aspecto preferido de la presente invención, la cantidad de enzimas requerida en el proceso global se reduce en al menos el 30%, preferiblemente al menos el 40% por medio de incluir un bucle de reciclaje, en el que las enzimas se reciclan. En el mismo, el hidrolizado, es decir, la fase líquida que comprende la celulosa hidrolizada y las enzimas, del (último) reactor se somete a una etapa de separación, en donde los sólidos no hidrolizados se separan del hidrolizado que todavía contiene enzimas. Dicho hidrolizado líquido se mezcla después con biomasa celulósica no hidrolizada ("fresca"), que después se introduce en el (primer) reactor de hidrólisis.

## 25 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 muestra un reactor continuo operado según el proceso de la presente invención con una cascada posterior opcional de reactores adicionales;

30 La figura 2 muestra un diagrama de flujo de la hidrólisis enzimática continua de biomasa celulósica en una cascada de al menos dos reactores, en donde al menos una porción de las enzimas añadidas al reactor se recicla;

35 La figura 3 muestra un diagrama de flujo de la hidrólisis enzimática continua de biomasa celulósica en una cascada de al menos dos reactores, en donde la inhibición de la hidrólisis por alta carga de azúcar se minimiza en una cascada de reactores, que disminuye secuencialmente en volumen;

La figura 4 representa el desarrollo de la viscosidad de biomasa celulósica sometida a hidrólisis enzimática a lo largo del tiempo, proporcionando información sobre el tiempo de retención mínimo esperado en el estado estacionario;

40 La figura 5 es un diagrama de flujo de un concepto de biorrefinería global según una forma de realización de la presente invención;

La figura 6 muestra un diagrama de flujo de la hidrólisis enzimática continua de biomasa celulósica en una cascada de tres reactores según los ejemplos 2 y 3.

## 45 **Descripción detallada de la invención**

50 La presente invención se refiere a la hidrólisis de biomasa celulósica. No existen restricciones con respecto al tipo o composición de la biomasa celulósica diferente de que dicha biomasa comprende celulosa. Según una definición adecuada, "biomasa" es la masa total de materia (previamente) viva, en particular materia orgánica, en una unidad determinada de área medioambiental, preferiblemente material vegetal, vegetación, o desechos agrícolas usados como un combustible o fuente de energía. El hecho de que biomasa "previamente" viva también se incluya como "biomasa celulósica" implica que materiales celulósicos reciclados, en particular materiales de algodón reciclados y/o productos basados en papel reciclados u otros materiales reciclados basados en celulosa concebibles, también están incluidos. Cualquier mezcla de materiales celulósicos reciclados, tal como productos de papel reciclados, con cualquier otro tipo de biomasa celulósica también está incluida.

60 Según una forma de realización preferida, dicha biomasa celulósica comprende más del 30% de celulosa (% en peso, basado en la masa global), preferiblemente más del 50% de celulosa, preferiblemente más del 70% de celulosa. En la misma, el término "celulosa" también comprende el término "hemicelulosa". La biomasa celulósica preferida según la presente invención comprende algodón, borra de algodón y biomasa lignocelulósica, es decir, biomasa que comprende tanto componentes de lignina como componentes celulósicos y/o hemicelulósicos.

65 La biomasa celulósica preferida que es particularmente adecuada para el proceso según la presente invención se basa en cultivos energéticos, plantas anuales, residuos agrícolas y madera.

Los cultivos energéticos comerciales son típicamente especies de cultivos densamente plantados, de alto rendimiento que preferiblemente son de valor nulo o limitado como alimentos. Por ejemplo, los cultivos de madera tal como Salix, Miscanthus, sauce o álamo son cultivos energéticos preferidos.

5 Los ejemplos preferidos de plantas anuales son paja, caña de azúcar y yuca.

Los residuos agrícolas incluyen esas partes de cultivos cultivables que no se van a usar para el fin principal de producir alimentos, pienso o fibras, por ejemplo, usados como lechos para animales y plumas. Estos residuos están ejemplificados por bagazo de caña de azúcar y tallo de maíz.

10 El material de partida particularmente preferido de caña de azúcar se puede dividir en bagazo, azúcar y paja. El bagazo es un material fibroso que consiste en celulosa, hemicelulosa, lignina, extractivos, sales inorgánicas y otras sustancias orgánicas tal como proteínas y ácidos orgánicos.

15 El bagazo y la madera dura tienen muchas similitudes, es decir, alto contenido en xilano, longitud de fibra más corta y menor contenido en lignina y celulosa comparado con la madera blanda. Sin embargo, el bagazo tiene un contenido en ceniza ligeramente mayor. El contenido en ceniza se puede explicar por diferencias en la morfología de la planta y el método de recolección. La longitud de fibra corta en el bagazo se debe principalmente a su alto contenido en médula (~30%).

20 En general, basado en el hecho de que puede no ser necesaria reducción mecánica de tamaño y que se obtienen mayores rendimientos de hidrólisis, es particularmente preferido realizar el proceso según la presente invención con residuos agrícolas no de madera, en particular, bagazo, como la biomasa celulósica.

25 La madera también es un material adecuado para el presente proceso. En la misma, todos los tipos de madera son adecuados.

Según el presente proceso, la pulpa de biomasa celulósica se hidroliza enzimáticamente. La celulosa es un polímero lineal insoluble de unidades de glucano repetitivas unidos por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1-4. En agua, la celulosa se hidroliza por el ataque del hidrógeno electrofílico de la molécula de agua sobre el enlace glucosídico. En las cadenas de celulosa cada unidad de glucosa tiene el potencial de formar tres enlaces de hidrógeno con monómeros en cadenas adyacentes, produciendo una estructura cristalina estable, que no se hidroliza fácilmente. La velocidad de la reacción de hidrólisis se puede aumentar mediante el uso de temperaturas y presiones elevadas o puede estar catalizada por ácido diluido o concentrado o por enzimas, preferiblemente, como es el caso en la presente invención, por enzimas.

35 Según una forma de realización preferida de la presente invención, se usan complejos enzimáticos (celulasas) extracelulares o asociados a la membrana celular que pueden hidrolizar específicamente el polímero de celulosa en monómeros de glucosa solubles en la etapa de hidrólisis. Las celulasas son complejos multiproteína que consisten en enzimas sinérgicas con diferentes actividades específicas que se pueden dividir en exo- y endo-celulasas (glucanasas) y  $\beta$ -glucosidasa (celobiasa). Además, hay enzimas (hemicelulasas, lacasas, peroxidasas lignolíticas, etc.) que pueden degradar los otros componentes principales de la biomasa celulósica. Todas estas enzimas y cualquier combinación de las mismas son enzimas preferidas que se pueden usar en la hidrólisis enzimática de la presente invención.

45 La celobiasa es un inhibidor por producto final conocido de glucanasas y se sabe que la  $\beta$ -glucosidasa alivia esta inhibición convirtiendo la celobiasa a glucosa (etapa limitante de la velocidad). En procesos industriales, por ejemplo, fermentación de etanol por levaduras, la eficacia de sacarificación por celulasas se puede mejorar por sacarificación y fermentación simultánea (SFS). El mayor desafío con la SFS se relaciona con la diferente temperatura óptima para enzimas hidrolíticas comunes y organismos de fermentación. Además de la inhibición por producto final, se sabe que la lignina reduce el rendimiento enzimático al unirse a celulasas de forma no específica.

50 Se prefiere que la biomasa celulósica se someta a al menos un tipo de pretratamiento antes de la hidrólisis, que transforme al menos parte de la lignina de la biomasa celulósica en una forma soluble en agua, haciendo la misma de esta manera particularmente adecuada para la etapa de hidrólisis de la presente invención.

55 Por tanto, según una forma de realización preferida, el pretratamiento de la celulosa se realiza para aumentar el área de superficie específica de la celulosa. El pretratamiento correcto tiene las ventajas de aumentar la velocidad de hidrólisis enzimática debido a sustrato más accesible y también al eliminar potenciales sustancias inhibitorias.

60 Aunque el proceso según la presente invención es aplicable a todos los tipos de materiales celulósicos, se prefiere que el material se pretrate en una etapa separada que precede a la etapa de hidrólisis. Se encontró que dicha etapa de pretratamiento aumenta la eficacia de la hidrólisis enzimática.

Dicho pretratamiento es mecánico o químico, preferiblemente químico.

En el (pre)tratamiento mecánico, el momento o energía se transfiere a la biomasa celulósica, por ejemplo, por medio de dividir o cortar o batir la biomasa a partículas menores. En el mismo, no se añaden reactivos químicos y la estructura química de los componentes del material permanece esencialmente sin afectar.

5 En el (pre)tratamiento químico, al menos un reactivo químico se añade y la estructura química de al menos un componente del componente en la biomasa se altera. Como se discutirá en más detalle posteriormente, la “cocción al sulfito” es un pretratamiento químico y es, de hecho, el tipo preferido de pretratamiento.

10 En una forma de realización preferida, se usa biomasa celulósica en el presente proceso, en particular biomasa lignocelulósica, que no requiere (pre)tratamiento mecánico y en donde la cocción al sulfito es el único (pre)tratamiento. La cocción al sulfito se puede dividir en cuatro grupos principales: elaboración de pulpa al sulfito ácido, bisulfito ácido, alcalino débil y alcalino.

15 En el pretratamiento preferido según la presente invención, la biomasa celulósica se cocina con un sulfito, preferiblemente un sulfito de sodio, calcio, amonio o magnesio en condiciones ácidas, neutras o básicas. Esta etapa de pretratamiento disuelve la mayoría de la lignina como lignina sulfonada (lignosulfonato) junto con partes de la hemicelulosa.

20 Sorprendentemente, en el proceso de producción, se encontró que el uso de la cocción al sulfito como una etapa de pretratamiento en la producción de combustibles o sustancias químicas a partir de azúcares fermentables es muy eficaz ya que produce rendimientos globales mayores de sustancias químicas. En esencia, se logra una mayor producción (>80%) de sustancias químicas útiles que en cualquier otra tecnología de biorrefinería de plataforma de azúcar conocida.

25 El hecho de que la pulpa de celulosa resultante de este pretratamiento de una etapa sea particularmente baja en impurezas, en particular lignina, hace más fácil desarrollar o adaptar enzimas para la hidrólisis.

El pretratamiento con sulfito preferiblemente se realiza según una de las siguientes formas de realización. En las mismas y a lo largo de la presente divulgación, el “pretratamiento con sulfito” también se denomina como “cocción”.

- 30
- cocción ácida (preferiblemente  $\text{SO}_2$  con un hidróxido, más preferiblemente con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$  o  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ),
  - cocción al bisulfito (preferiblemente  $\text{SO}_2$  con un hidróxido, más preferiblemente con  $\text{NaOH}$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$  o  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ),
  - cocción alcalina débil (preferiblemente  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , más preferiblemente con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) y
  - 35 • cocción alcalina (preferiblemente  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  con un hidróxido, más preferiblemente con  $\text{NaOH}$ ).

Con respecto a la etapa de pretratamiento con sulfito (cocción al sulfito), que es un pretratamiento preferido que se va a implementar antes de la hidrólisis enzimática según la presente invención, la divulgación respectiva del documento WO 2010/078930 con el título “*Conversión de biomasa lignocelulósica*” presentada el 16 de diciembre, 2009.

40 La presente invención también se refiere a un proceso integrado para la producción de monosacáridos, sustancias químicas basadas en azúcares, biocombustibles o materiales junto con lignina sulfonada a partir de biomasa lignocelulósica que comprende al menos las siguientes etapas:

- 45
- (i) pretratamiento de una biomasa lignocelulósica, preferiblemente en una etapa de cocción al sulfito;
  - (ii) separación de la biomasa lignocelulósica pretratada de la etapa (i) en
    - (a) una fase de “licor de sulfito gastado” líquida, que preferiblemente comprende el 50% o más de la lignina de la biomasa lignocelulósica en forma de lignina sulfonada, y en
    - (b) una pulpa, que preferiblemente comprende el 70% o más de la celulosa de la biomasa lignocelulósica;
  - 50 (iii) hidrólisis de la pulpa (b) de la etapa (ii) en una plataforma de química de azúcar que comprende monosacáridos; en donde dicha etapa de hidrólisis es el proceso para la hidrólisis continua de biomasa lignocelulósica como se describe anteriormente,
  - (iv) opcionalmente procesamiento adicional de los monosacáridos de la etapa (iii) que producen sustancias químicas útiles, biocombustibles y/o proteínas; y
  - 55 (v) conversión directa o procesamiento adicional de la lignina sulfonada de la fase líquida (a) de la etapa (ii) en sustancias químicas útiles, biocombustibles y/o materiales.

Este proceso global se representa esquemáticamente en la figura 5.

60 La etapa (iv) del dicho proceso se refiere a la fermentación de monosacáridos, en particular de hexosas y pentosas a etanol u otras sustancias químicas basadas en azúcares a para producir proteínas de biomasa.

La fermentación implica microorganismos que degradan azúcares liberando energía mientras el proceso produce productos como un alcohol o un ácido. *Saccharomyces cerevisiae* (levadura del panadero) es el más frecuentemente usado para fermentar hexosas a etanol. Un mol de glucosa producirá estequiométricamente 2 moles de etanol más 2

moles de dióxido de carbono. La pulpa de bagazo contiene cantidades relativamente grandes de pentosas. Estos azúcares también se pueden fermentar o metabolizar para producir proteínas de biomasa.

5 Con o sin referencia al proceso integrado descrito anteriormente para la producción de monosacáridos, la presente invención se refiere a la hidrólisis de biomasa celulósica como se ha descrito anteriormente. Con respecto a dicha hidrólisis, las siguientes formas de realización son preferidas.

10 En una forma de realización preferida, en el proceso continuo de la presente invención, la papilla entera de componentes líquidos y sólidos se mueve a través de los reactores a la misma velocidad, es decir, sólidos de fibra sin hidrolizar y la fase acuosa de la papilla se retienen durante el mismo intervalo de tiempo en dicho reactor.

15 Según una primera forma de realización, como se ejemplifica en la figura 1, el sustrato, es decir, la biomasa celulósica, se alimenta en un reactor y se añaden enzimas. El proceso se corre continuamente, es decir, en un estado estacionario. En dicho reactor, el sustrato, es decir, la biomasa celulósica, se hidroliza. La viscosidad de la biomasa celulósica parcialmente hidrolizada, en un reactor operado según la presente invención, con el 25% de ST (compuesto del 10% de SST y el 15% de SDT) puede ser aproximada por la viscosidad en el experimento por lotes correspondiente después de un tiempo de reacción de 16 horas.

20 No existen restricciones con respecto al reactor necesario para correr el proceso, aunque un CSTR (reactor de tanque agitado continuamente) es preferido.

25 Según una forma de realización preferida, también mostrada en la figura 1, se proporciona una cascada de reactores para mejorar el rendimiento de glucosa. En los reactores adicionales (posteriores al primer reactor descrito anteriormente), el sustrato se hidroliza adicionalmente produciendo un hidrolizado con alta concentración de azúcar (= sólidos disueltos totales altos, "SDT") y un residuo sólido que consiste en material que no se puede hidrolizar (lignina, materiales inorgánicos, etc.).

30 Incluso aunque el reactor se alimenta con sustrato que tiene un alto contenido en sólido, por ejemplo, un 25% de ST, el contenido suspendido total ("SST") en el reactor es solo aproximadamente el 10% en estado estacionario (asumiendo 3 reactores en serie con un tiempo de reacción total de 48 horas, 16 h en cada reactor). La viscosidad de la solución con el 25% de ST (compuesto del 10% de SST y el 15% de SDT) en reactor en estado estacionario de la presente invención corresponde a la viscosidad en un reactor por lotes después de un tiempo de reacción de 16 horas o menos.

35 El tiempo de retención medio en el reactor para biomasa celulósica añadida a un reactor de hidrólisis debe ser aproximadamente, preferiblemente algo mayor que el tiempo requerido para la licuación en un reactor por lotes con buena agitación. Por tanto, el tiempo de retención medio del primer reactor se debe elegir de tal modo que se logre suficiente licuación para que la papilla sea bombeable.

40 Según una segunda forma de realización, los costes de enzimas se disminuyen empleando reciclaje de enzimas. El proceso se describe esquemáticamente en la figura 2.

45 En un aspecto preferido de la presente invención, la cantidad de enzimas requerida en el proceso global se reduce en al menos el 30%, preferiblemente al menos el 40% a través de la inclusión de un bucle de reciclaje, en el que las enzimas se reciclan.

50 Según esta forma de realización preferida, el hidrolizado, es decir, la fase líquida que comprende la celulosa hidrolizada y las enzimas, del (último) reactor se somete a una etapa de separación, en donde los sólidos no hidrolizados se separan al menos parcialmente del hidrolizado que aún contiene enzimas. Dicho hidrolizado líquido se mezcla después con biomasa celulósica no hidrolizada ("fresca"), que después se introduce en el reactor para hidrólisis.

55 Esto se ilustra en la figura 2. En la misma, después del tanque 3 de hidrólisis de una cascada de tres reactores de hidrólisis, el hidrolizado (que incluye enzimas) se separa de los residuos sólidos no hidrolizados. Dicho hidrolizado se recicla en el sistema a través de un tanque de mezclado (el tanque más a la izquierda en la figura 2). En dicho tanque de mezclado, puede tener lugar algo de hidrólisis (residual), pero dicho reactor se pretende principalmente para mezclar el hidrolizado reciclado que contiene las enzimas con biomasa celulósica añadida ("sustrato"). En una etapa de separación opcional después de dicho tanque de mezclado dedicado, algo del hidrolizado, en particular algo del producto final de azúcares se puede separar para procesamiento adicional.

60 Por tanto, según una forma de realización preferida, al menos algo de la masa celulósica al menos parcialmente hidrolizada que se retira continuamente del reactor, preferiblemente del último reactor de una cascada de dos o más reactores, se somete a una etapa de separación, en donde los sólidos no hidrolizados se separan al menos parcialmente del hidrolizado, es decir, la fase líquida que comprende la biomasa celulósica hidrolizada y enzimas, en donde dicho hidrolizado líquido se mezcla después con biomasa celulósica, preferiblemente en un reactor o tanque dedicado, que después se introduce en el proceso según la presente invención.

65



La ventaja añadida con esta solución de proceso es que el hidrolizado/solución de azúcar (después de la separación del material no hidrolizado) se mezcla con el sustrato antes del (primer) tanque de reacción. Esto disminuirá las cantidades de enzimas necesarias drásticamente, al menos el 40% (debido a la sustitución de la fase líquida en la pulpa).

5 Al mezclar el hidrolizado (después de la separación de los sólidos no hidrolizados) con sustrato fresco (es decir, biomasa celulósica), las enzimas con una fracción de unión a hidratos de carbono se pueden unir al sustrato (celulosa) antes de que se alimente al primer reactor de hidrólisis. Esto permitirá una reducción adicional en el consumo de enzimas, además de la reducción del 40% mencionada anteriormente.

10 Según una forma de realización más preferida, se aborda la inhibición de la hidrólisis basada en un contenido en azúcar que es demasiado alto (alto SDT).

15 En la misma, cualquier potencial inhibición inducida por azúcares de la hidrólisis preferiblemente se supera por la separación secuencial de azúcares.

Según esta forma de realización preferida, como se ilustra en la figura 3, los sólidos suspendidos se separan del líquido después del primer reactor, en el que tiene lugar una reacción de hidrólisis.

20 Típicamente, se puede lograr aproximadamente una conversión del 60% de celulosa/hemicelulosa a mono azúcares en el reactor de hidrólisis operado en estado estacionario según la presente invención. El 40% restante de fibras no hidrolizadas se transfiere después a un segundo reactor. Se espera que las enzimas con una fracción de unión a hidratos de carbono se unan a las fibras no hidrolizadas. Además, las enzimas disueltas en el líquido atrapado en las fibras también se transferirán al segundo reactor. Además de las enzimas que se recuperan del primer reactor, una pequeña cantidad de enzimas preferiblemente se añade en el segundo reactor.

Preferiblemente, el tamaño del segundo reactor de hidrólisis se disminuye a escala para cumplir con la cantidad de fibras no hidrolizadas de modo que se logra el mismo SST o al menos uno similar que en el primer reactor.

30 El proceso entero se puede repetir de la misma manera para cualquier reactor de hidrólisis posterior, que entonces se disminuye a escala proporcionalmente.

35 En general, según esta forma de realización preferida, en el proceso según la presente invención, se usa una cascada de dos o más reactores, en donde al menos algo del hidrolizado, es decir, la fase líquida que comprende la biomasa celulósica hidrolizada y las enzimas del primer reactor se separa de la fase sólida y se somete a procesamiento adicional en cualquiera de los reactores posteriores, y en donde dicha fase sólida se añade a un reactor posterior, preferiblemente que es menor en tamaño y/o volumen que el primer reactor, en donde se puede añadir una cantidad predeterminada adicional de enzima a dicho reactor posterior.

#### 40 Ejemplos

Las siguientes convenciones aplicadas también a lo largo de la especificación aplican para los ejemplos:

La temperatura se da en °C.

45 % indica % en peso si no se especifica otra cosa

Equivalente de glucosa = La cantidad de glucosa derivable de la celulosa en el sustrato

Equivalente de xilosa = La cantidad de xilosa derivable de xilano en el sustrato

#### 50 Ejemplo 1

55 Para determinar el tiempo de retención medio aproximado de un primer reactor, se hidrolizó una muestra de sustrato de bagazo cocido al sulfito alcalino preparada de forma similar a las condiciones descritas en el ejemplo 1 del documento WO 2010/078930. La hidrólisis se realizó en un reómetro Physica MCR 101 en un vaso con un agitador (FL 100/6W). La velocidad de rotación fue 30 rpm y la temperatura 50°C. La concentración de la biomasa celulósica fue del 10% y la adición de enzima fue del 40% v/p de Accellerase Duet (Genencor, CA, EE UU). La viscosidad se siguió continuamente y la viscosidad como función del tiempo se muestra en la figura 4.

60 La hidrólisis produce un descenso inicial rápido en la viscosidad y, después de un periodo de tiempo corto, la curva de viscosidad empieza a aplanarse y alcanza un nivel donde la muestra se puede ver como un líquido o tipo líquido. Esta viscosidad es dependiente del sustrato (aquí: biomasa celulósica) y las condiciones experimentales, pero se puede considerar que el material hidrolizado está licuado cuando la viscosidad es menor de 3 Pa·s (pascal segundo), es decir, menor de 3000 centipoise.

65 El tiempo de retención medio mínimo del (primer) reactor se determina por el tiempo para licuación que a su vez es dependiente de varios parámetros, tal como sustrato, concentración de sustrato, y cantidad y tipo de enzimas.

**Ejemplo 2**

Una muestra de sustrato de bagazo cocido al sulfito ácido (pulpa de bagazo), preparada en condiciones similares a las descritas en el ejemplo 2 del documento WO 2010/078930, se sometió a hidrólisis continua en una organización experimental con 3 reactores en serie como se representa en la figura 6. Se midió que el volumen total del sistema era aproximadamente 6,6 litros. Los reactores eran cubiertos y se conectaron a un baño de agua para control de la temperatura, y se hizo circular agua de refrigeración en las tapas para minimizar la evaporación de los reactores.

Se añadieron continuamente enzimas (Accellerase DUET de Genencor, CA, EE UU), tampón (tampón acetato de sodio, concentración 50 mM en los reactores en estado estacionario) y la pulpa de bagazo al reactor 1. La mezcla de reacción de mantuvo a 50°C en los reactores 1 a 3. El hidrolizado se recogió en el tanque de producto que estaba enfriado con agua a aproximadamente 5°C.

El aporte total medio al sistema fue 144,2 g/h. La concentración de sustrato seco media en el aporte fue el 17,1% y la carga de enzima media fue 0,273 g de Accellerase DUET/g de sustrato seco. Se calculó que el tiempo de hidrólisis (retención) medio fue 46 h, asumiendo una densidad de mezcla de reacción de 1,0 g/ml.

La producción del sistema al tanque de producto se pesó regularmente. La producción fue de media el 5,1% menor que el aporte al sistema. La principal razón para la pérdida se asume que es la evaporación de agua de los tres reactores y/o la acumulación de material en los reactores. Se tomaron muestras de los tres reactores dos veces al día para medir los rendimientos de glucosa y xilosa. Después de 4-5 días los valores de glucosa y xilosa en los tres reactores se estabilizaron, indicando mediante ello que se alcanzaron las condiciones del estado estacionario. Los rendimientos de glucosa se calcularon como (g de producción de glucosa/h) / (g de aporte de equivalentes de glucosa/h). Los rendimientos de glucosa en los tres reactores calculados como valores medios a lo largo de tres días en estado estacionario fueron el 24,6% (reactor 1), el 40,2% (reactor 2) y el 49,6% (reactor 3). Los rendimientos de xilosa se calcularon como (g de producción de xilosa/h) / (g de aporte de equivalentes de xilosa/h). Los rendimientos de xilosa en los tres reactores calculados como valores medios a lo largo de tres días en estado estacionario fueron el 33,7% (reactor 1), el 56,0% (reactor 2) y el 66,0% (reactor 3). La viscosidad se midió usando un reómetro Physica MCR 101 equipado con un vaso con un agitador (FL 100/6W), la velocidad de rotación fue 1 rpm y la temperatura 50°C. Un valor medio de la viscosidad en el reactor 1 en estado estacionario fue 1,7 Pa·s (pascal segundo) que se tiene que comparar con la viscosidad del aporte (una suspensión de sustrato al 17,1%) que se midió que era 82,2 Pa·s.

Este ejemplo muestra que un proceso de hidrólisis continua con altas cargas de sólidos en estado estacionario produce un hidrolizado con rendimientos de glucosa y xilosa muy altos usando solo agitación convencional. La viscosidad en el primer reactor era sustancialmente menor que la de la alimentación en estado estacionario.

**Ejemplo 3**

Una muestra de sustrato de bagazo cocido al sulfito alcalino (pulpa de bagazo), preparada en condiciones similares a las descritas en el ejemplo 1 del documento WO 2010/078930, se sometió a hidrólisis en una organización experimental con 3 reactores en serie como se representa en la figura 6. Se midió que el volumen total del sistema era aproximadamente 6,6 litros. Los reactores eran cubiertos y se conectaron a un baño de agua para control de la temperatura, y se hizo circular agua de refrigeración en las tapas para minimizar la evaporación de los reactores.

Se añadieron continuamente enzimas (Accellerase DUET de Genencor, CA, EE UU), tampón (tampón acetato de sodio, concentración 50 mM en los reactores en estado estacionario) y la pulpa de bagazo al reactor 1. La mezcla de reacción de mantuvo a 50°C en los reactores 1 a 3. El hidrolizado se recogió en el tanque de producto que estaba enfriado con agua a aproximadamente 5°C.

El aporte total medio al sistema fue 144,1 g/h. La concentración de sustrato seco media en el aporte fue el 18,8% y la carga de enzima media fue 0,173 g de Accellerase DUET/g de sustrato seco. Se calculó que el tiempo de hidrólisis (retención) medio fue 46 h, asumiendo una densidad de mezcla de reacción de 1,0 g/ml.

La producción del sistema al tanque de producto se pesó regularmente. La producción fue de media el 1% menor que el aporte al sistema. La principal razón para la pérdida se asume que es la evaporación de agua de los tres reactores y/o la acumulación de material en los reactores. Se tomaron muestras de los tres reactores dos veces al día para medir los rendimientos de glucosa y xilosa. Después de 4-5 días los valores de glucosa y xilosa en los tres reactores se estabilizaron, indicando mediante ello que se alcanzaron las condiciones del estado estacionario. Los rendimientos de glucosa se calcularon como (g de producción de glucosa/h) / (g de aporte de equivalentes de glucosa/h). Los rendimientos de glucosa en los tres reactores calculados como valores medios a lo largo de tres días en estado estacionario fueron el 39,8% (reactor 1), el 55,0% (reactor 2) y el 58,8% (reactor 3). Los rendimientos de xilosa se calcularon como (g de producción de xilosa/h) / (g de aporte de equivalentes de xilosa/h). Los rendimientos de xilosa en los tres reactores calculados como valores medios a lo largo de tres días en estado estacionario fueron el 75,0% (reactor 1), el 93,2% (reactor 2) y el 89,6% (reactor 3). La viscosidad se midió usando un reómetro Physica MCR 101 equipado con un vaso con un agitador (FL 100/6W), la velocidad de rotación fue 30 rpm y la temperatura 50°C. Un

valor medio de la viscosidad en el reactor 1 en estado estacionario fue 1,5 Pa·s (pascal segundo) que se tiene que comparar con la viscosidad de un aporte simulado (se tuvo que usar una suspensión de sustrato al 10% en lugar de suspensión de sustrato al 18,8% debido a la viscosidad muy alta) que se midió que era 249 Pa·s.

- 5 Este ejemplo muestra que un proceso de hidrólisis continua basado en un sustrato diferente a altas cargas de sólidos en estado estacionario produce un hidrolizado con rendimientos de glucosa y xilosa muy altos usando solo agitación convencional. La viscosidad en el primer reactor era sustancialmente menor que la de la alimentación en estado estacionario.

**REIVINDICACIONES**

1. Proceso para la hidrólisis continua de biomasa celulósica que comprende al menos las siguientes etapas:
  - (P) proporcionar al menos un reactor, que se pueda operar en estado estacionario;
  - (A) añadir una cantidad determinada de biomasa celulósica a dicho reactor, en donde dicha biomasa celulósica tiene un contenido sólido de al menos el 10%;
  - (A') añadir una cantidad determinada de enzimas a dicho reactor;
  - (E) realizar al menos una hidrólisis enzimática parcial de la biomasa celulósica en dicho reactor,

en donde se alcanza un estado estacionario en dicho proceso, en el que la biomasa celulósica se añade continuamente a dicho reactor, mientras que biomasa celulósica al menos parcialmente hidrolizada se retira continuamente de dicho reactor, en donde dicha biomasa celulósica al menos parcialmente hidrolizada que se retira continuamente tiene una viscosidad, medida en un reómetro Physica MCR 101 en un vaso con un agitador (FL 100/6W), de no más de 25 Pa·s (Pascal segundos), en donde la viscosidad esencialmente permanece por debajo de 25 Pa·s durante el curso de dos horas o más.
2. Proceso según la reivindicación 1, en donde una cascada de al menos dos reactores se proporciona en la etapa (P), preferiblemente que comprende además las siguientes etapas:
  - (T) retirar continuamente biomasa celulósica parcialmente hidrolizada de la etapa (E), que tiene una viscosidad, medida en un reómetro Physica MCR 101 en un vaso con un agitador (FL 100/6W), de no más de 25 Pa·s (Pascal segundos), y transferir la misma a un reactor posterior, que se puede operar en estado estacionario;
  - (E') realizar hidrólisis enzimática adicional en la biomasa celulósica parcialmente hidrolizada de la etapa (E) en dicho reactor posterior.
3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, en donde el contenido sólido de la biomasa celulósica, que se añade a dicho reactor el al menos el 15%, preferiblemente al menos el 20%, preferiblemente al menos el 25%, más preferiblemente al menos el 30%, más preferiblemente del 10% al 45%, más preferiblemente del 15% al 45%, más preferiblemente del 20% al 40% o del 15% al 30%.
4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la viscosidad de la biomasa celulósica parcialmente hidrolizada retirada continuamente medida en un reómetro Physica MCR 101 en un vaso con un agitador (FL 100/6W), es no más de 10 Pa·s, preferiblemente no más de 5 Pa·s, más preferiblemente no más de 3 Pa·s, más preferiblemente no más de 1 Pa·s.
5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la biomasa celulósica es biomasa lignocelulósica y preferiblemente comprende madera, plantas anuales, residuos o desechos agrícolas, en particular bagazo o cultivos energéticos.
6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la biomasa celulósica comprende más del 20% de celulosa, preferiblemente más del 50% de celulosa, más preferiblemente más del 70% de celulosa.
7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la biomasa celulósica se somete a pretratamiento antes de dicha hidrólisis, en donde dicho pretratamiento preferiblemente es cocción al sulfito y la biomasa celulósica preferiblemente es biomasa lignocelulósica.
8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el reactor es un CSTR, es decir, un reactor de tanque continuamente agitado.
9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde complejos de enzimas extracelulares o asociadas a la membrana celular, en particular mezcla de celulasas y  $\beta$ -glucosidasas, que pueden hidrolizar específicamente el polímero de celulosa en monómeros de glucosa solubles se usan en dicha etapa de hidrólisis.
10. Proceso según la reivindicación 9, en donde las enzimas comprenden celulasas, hemicelulasas y/o  $\beta$ -glucosidasas.
11. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos parte de la biomasa celulósica al menos parcialmente hidrolizada que se retira continuamente del reactor se somete a una etapa de separación, en donde los sólidos no hidrolizados se separan al menos parcialmente de al menos parte del hidrolizado, es decir, la fase líquida que comprende biomasa celulósica hidrolizada y enzimas, en donde dicho hidrolizado líquido se mezcla después con biomasa celulósica, que después se introduce en un reactor, preferiblemente un reactor de mezcla dedicado.

12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 2-11, en donde se usa una cascada de dos o más reactores para la hidrólisis,
- 5 y en donde al menos parte del hidrolizado, es decir, la fase líquida que comprende biomasa celulósica hidrolizada y enzimas, del primer reactor se separa de la fase sólida y se somete a procesamiento adicional,
- y en donde dicha fase sólida de dicha separación se añade a un reactor posterior, que preferiblemente es menor en tamaño y/o volumen que el primer reactor, más preferiblemente en donde se añade una cantidad de enzima predeterminada adicional a dicho reactor posterior.
- 10 13. Proceso según la reivindicación 12, que se repite para cualquier par posterior de reactores adyacentes en una cascada de tres o más reactores para hidrólisis, en donde preferiblemente cada siguiente reactor es menor en tamaño y/o volumen que cada reactor precedente, respectivamente.
- 15 14. Proceso para la producción de monosacáridos, sustancias químicas basadas en azúcares, biocombustibles o materiales junto con lignina sulfonada a partir de biomasa lignocelulósica que comprende al menos las siguientes etapas:
- 20 (i) pretratamiento de una biomasa lignocelulósica, preferiblemente en una etapa de cocción al sulfito;
- (ii) separación de la biomasa lignocelulósica pretratada de la etapa (i) en
- (a) una fase líquida de "licor de sulfito gastado", que preferiblemente comprende el 50% o más de la lignina de la biomasa lignocelulósica en forma de lignina sulfonada, y en
- (b) una pulpa, que preferiblemente comprende el 70% o más de la celulosa de la biomasa lignocelulósica;
- 25 (iii) hidrólisis de la pulpa (b) de la etapa (ii) en una plataforma química de azúcar que comprende monosacáridos; en donde dicha etapa de hidrólisis es el proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes;
- (iv) opcionalmente procesamiento adicional de los monosacáridos de la etapa (iii) que produce sustancias químicas útiles, biocombustibles y/o proteínas; y
- 30 (v) conversión directa o procesamiento adicional de a lignina sulfonada de la fase líquida (a) de la etapa (ii) en sustancias químicas útiles, biocombustibles y/o materiales.

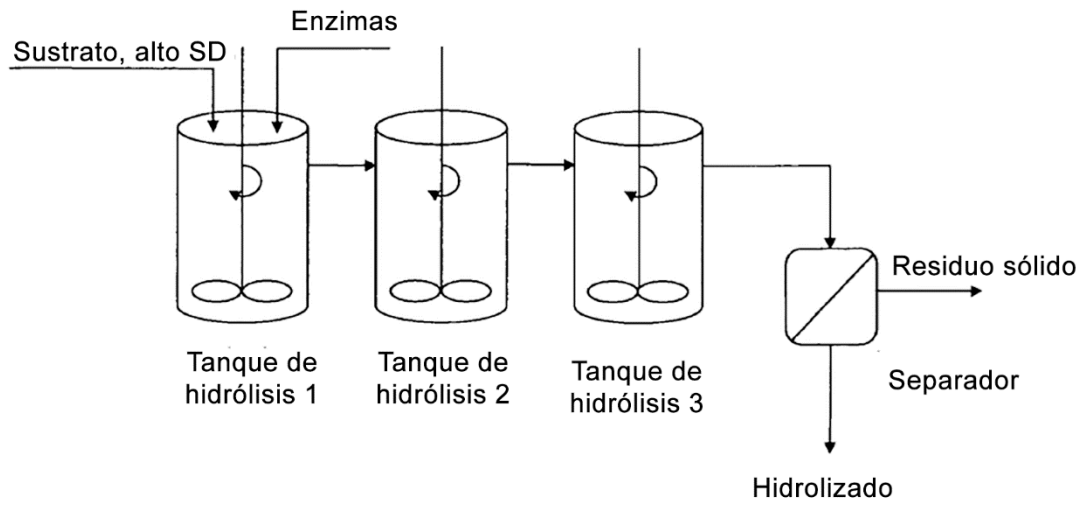


Figura 1

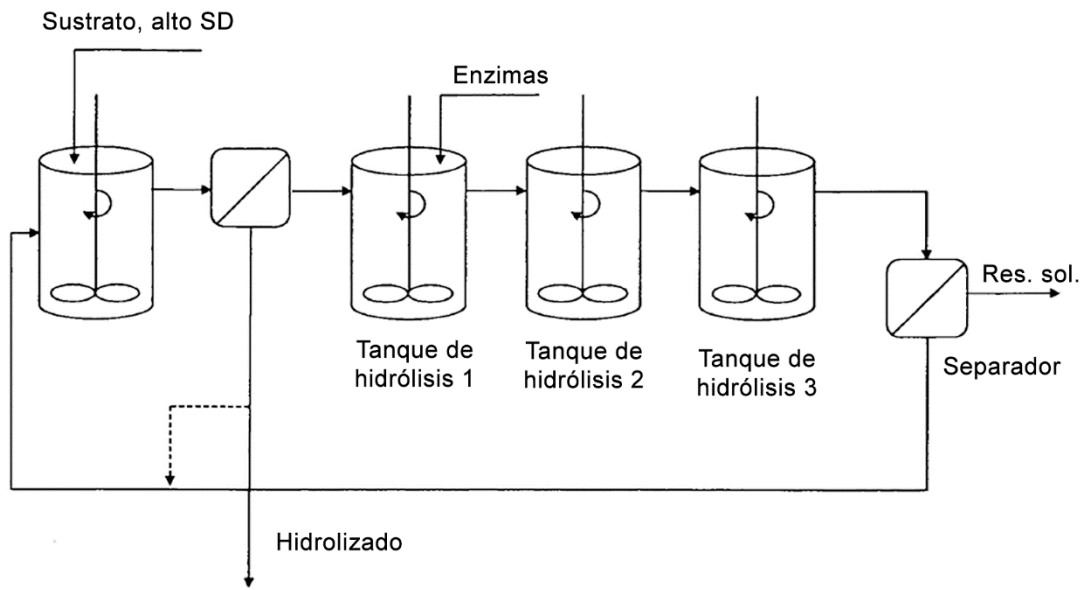


Figura 2

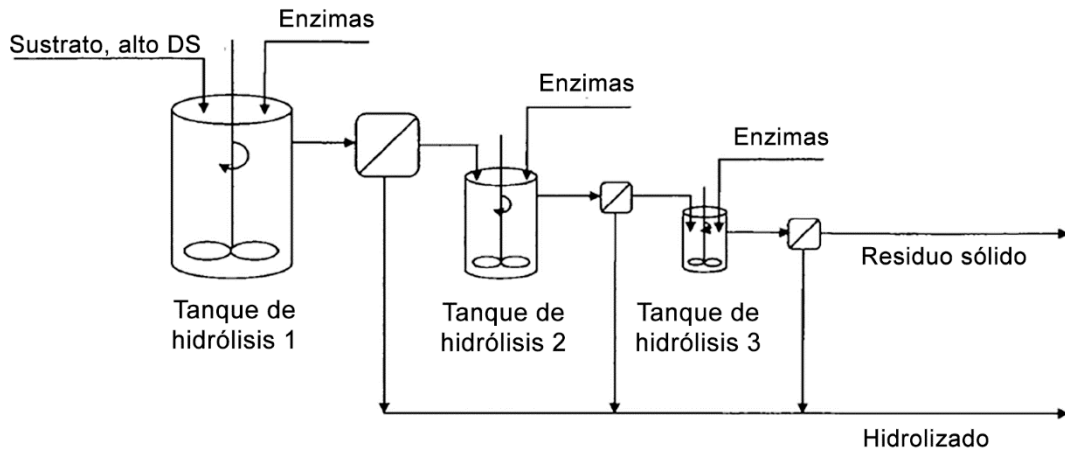


Figura 3



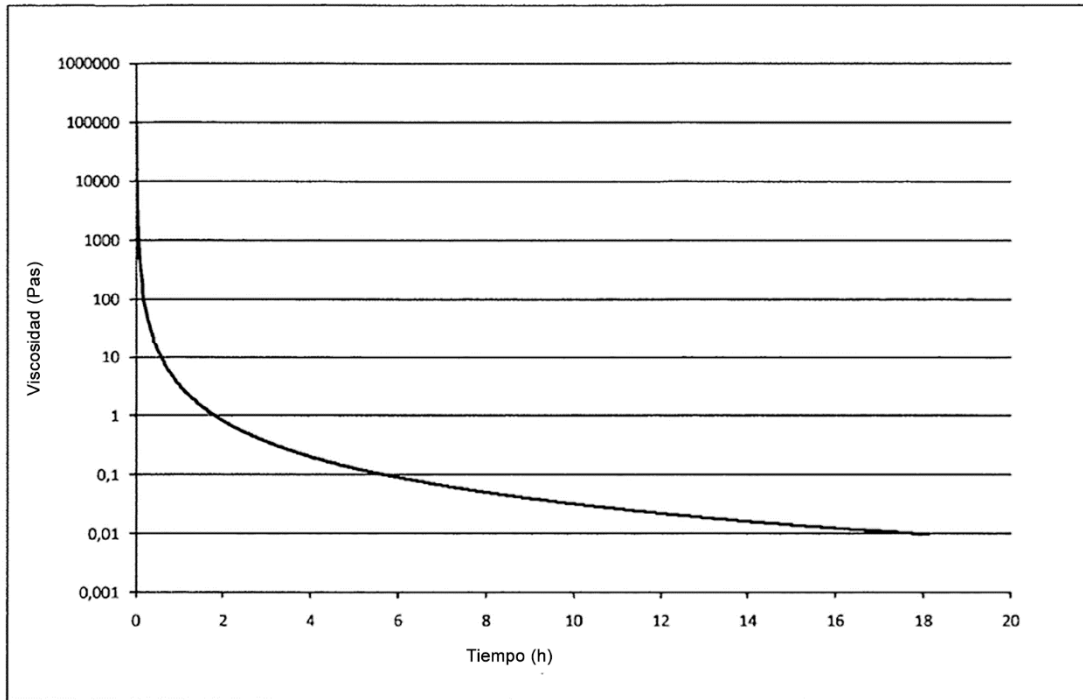


Figura 4

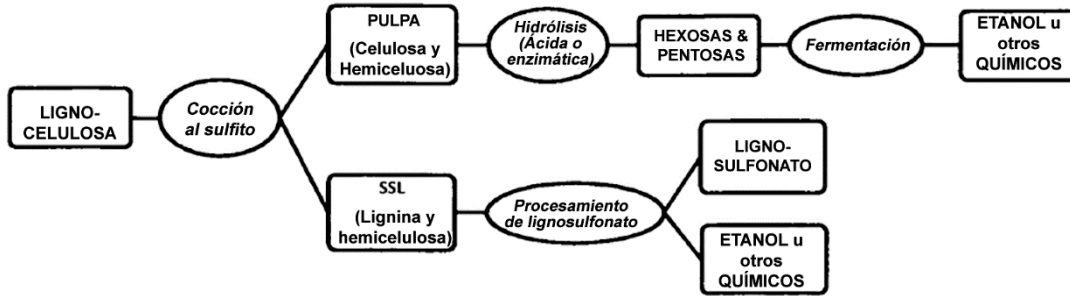


Figura 5

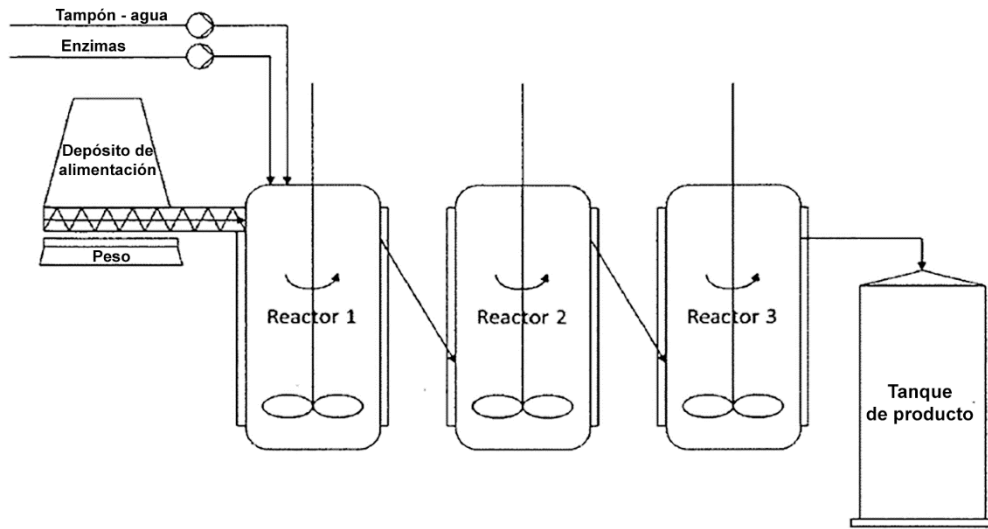


Figura 6