

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 514**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/14** (2006.01)

**C12P 19/02** (2006.01)

**C13K 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2014 PCT/EP2014/050271**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014 WO14108454**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2014 E 14700260 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 2943577**

54 Título: **Procedimiento para la hidrólisis enzimática de material lignocelulósico**

30 Prioridad:

**11.01.2013 EP 13150932**

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

**23.01.2020**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)  
Het Overloon 1  
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**SMITS, JOHANNES PETRUS;  
BERKHOUT, MICHAEL PETRUS JOZEF y  
NOORDAM, BERTUS**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 738 514 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 hidrólisis enzimática de material lignocelulósico

Campo de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para la hidrólisis enzimática de material lignocelulósico.

5 Antecedentes de la invención

10 El material de plantas lignocelulósicas, también denominado aquí materia prima o material que contiene celulosa, es una fuente renovable de energía en forma de azúcares que se puede convertir en productos valiosos, por ejemplo biocombustible, tal como bioetanol. Durante este proceso, la (ligno o hemi)-celulosa presente en la materia prima, tal como paja de trigo, rastrojo de maíz, cáscara de arroz, etc., se convierte en azúcares reductores mediante enzimas (hemi)-celulolíticas, que entonces se convierten en productos valiosos, tal como etanol, mediante microorganismos como levaduras, bacterias y hongos.

15 Puesto que la (hemi)-celulosa es cristalina y está atrapada en una red de lignina, la conversión en azúcares reductores es en general lenta e incompleta. Típicamente, la hidrólisis enzimática de materias primas sin tratar produce azúcares < 20% de la cantidad teórica. Aplicando un pretratamiento químico y termofísico, la (hemi)-celulosa es más accesible para las enzimas (hemi)-celulolíticas, y de este modo las conversiones transcurren más rápidamente y con mayores rendimientos.

20 Un rendimiento típico de etanol a partir de glucosa, derivada de rastrojo de maíz pretratado, es 40 galones de etanol por 1000 kg de rastrojo de maíz seco (Badger, P, Ethanol from cellulose: a general review, Trends in new crops and new uses. 2002. J. Janick and A. Whipkey (eds.) ASHS Press, Alexandria, VA), o 0,3 g de etanol por g de materia prima. El rendimiento máximo de etanol en base a celulosa es aproximadamente 90%.

25 Las enzimas celulolíticas – la mayoría de ellas se producen por especies como *Trichoderma*, *Humicola* y *Aspergillus* – se usan comercialmente para convertir materia prima pretratada en una mezcla que contiene (hemi)celulosa insoluble, azúcares reductores obtenidos de ella, y lignina. Esta mezcla se usa entonces en una fermentación, durante la cual los azúcares reductores se convierten en biomasa de levaduras (células), dióxido de carbono y etanol. El etanol producido de esta manera se denomina bioetanol.

30 La producción habitual de azúcares a partir de materia prima lignocelulósica pretratada, la hidrólisis también denominada licuefacción, presacarificación o sacarificación, tiene lugar típicamente durante un proceso que dura 6-168 horas (Kumar, S., Chem. Eng. Technol. 32 (2009) 517-526; Murray, P., et al., Enzyme Microbial Technol 29 (2001) 90-98), a temperaturas elevadas de 45-50°C (Kumar, S., Chem. Eng. Technol. 32 (2009) 517-526) y en condiciones no estériles. Durante esta hidrólisis, la celulosa presente es convertida parcialmente (típicamente 30-95°C, dependiendo de la actividad enzimática y de las condiciones de hidrólisis) en azúcares reductores. En el caso de la inhibición de enzimas mediante compuestos presentes en la materia prima pretratada y por los azúcares liberados, y para minimizar la inactivación térmica, este período de temperatura elevada se minimiza tanto como sea posible.

35 La fermentación tras la hidrólisis tiene lugar en una etapa de procedimiento anaerobio separada, ya sea en la misma vasija o en una diferente, en la que la temperatura se ajusta a 30-33°C (proceso mesófilo) para adecuar el crecimiento y la producción de etanol mediante la biomasa microbiana, habitualmente levaduras. Durante este procedimiento de fermentación, el material (hemi)celulósico que queda se convierte en azúcares reductores mediante las enzimas ya presentes procedentes de la etapa de hidrólisis, mientras que se producen biomasa microbiana y etanol. Este tipo de fermentación se denomina por lo tanto a menudo Sacarificación y Fermentación Simultáneamente, SSF. La fermentación se termina una vez que el material (hemi)celulósico se convierte en azúcares fermentables, y todos los azúcares fermentables se convierten en etanol, dióxido de carbono y células microbianas.

45 La pasta fermentada así obtenida consiste en azúcares no fermentables, material (hemi) celulósico no hidrolizable, lignina, células microbianas (más habitualmente, células de levadura), agua, etanol, dióxido de carbono disuelto. Durante las etapas sucesivas, el etanol se destila de la mezcla, y se purifica posteriormente. La suspensión sólida que queda se seca y se usa, por ejemplo, como combustible para quemar, fertilizante, o pienso para el ganado vacuno.

50 Con cada lote de materia prima, se añaden enzimas para maximizar el rendimiento y la cantidad de azúcares fermentables liberados a partir de la materia prima lignocelulósica pretratada durante el tiempo del procedimiento dado. En general, los costes para la producción de enzimas, los rendimientos de materia prima a etanol, y las inversiones, son los factores principales del coste en los costes de producción globales (Kumar, S., Chem. Eng. Technol. 32 (2009) 517-526). Hasta ahora, el coste de la reducción del uso de enzimas se lograba aplicando productos enzimáticos procedentes de fuentes microbianas únicas o múltiples (documento WO2008/008793) con una actividad hidrolítica más amplia y/o mayor (específica), cuyo uso aspira a una menor necesidad de enzimas, a velocidades de conversión más rápidas y/o a mayores rendimientos de conversión, y de este modo a menores

costes globales de producción de bioetanol. Esto requiere grandes inversiones en investigación y desarrollo de estos productos enzimáticos. En el caso de un producto enzimático compuesto de enzimas procedentes de múltiples fuentes microbianas, se necesitan grandes inversiones para la producción de cada compuesto enzimático individual.

Por lo tanto, es deseable mejorar el procedimiento anterior que implica hidrólisis y fermentación.

- 5 Para degradar materia prima lignocelulósica se han usado enzimas celulolíticas termoestables derivadas de *Talaromyces*, y estas enzimas son conocidas por su termoestabilidad en el documento WO2007091231. Sin embargo, no se da ninguna descripción sobre cómo optimizar el procedimiento de hidrólisis y fermentación.

10 Szijarto et al. (2011), *Biotechnology for Biofuels*, vol. 4, artículo no: 2, páginas 1-10, describen el uso de endoglucanasas termoestables en la licuefacción de paja de trigo pretratada hidrotérmicamente con contenidos elevados de sólidos.

Sumario de la invención

Un objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para la hidrólisis de biomasa que contiene celulosa, que comprende

- 15 - una etapa de licuefacción en la que se añade una primera enzima o una primera composición enzimática para licuar al menos parte de los sólidos presentes en la biomasa y obtener un factor de reducción de la viscosidad de al menos 2 en la etapa de licuefacción; seguido de
- una etapa de sacarificación, en la que se añade una segunda composición enzimática para formar azúcares oligoméricos y/o monoméricos; y

en el que la primera enzima o primera composición enzimática es diferente de la segunda composición enzimática;

20 en el que la primera enzima o primera composición enzimática comprende una endoglucanasa;

en el que la segunda composición enzimática comprende una celulasa; y

en el que la primera enzima o primera composición enzimática comprende más endoglucanasa que la segunda composición enzimática (expresado en % en peso de proteína),

en el que el contenido de materia seca en la etapa de licuefacción es 15% en peso o mayor,

25 en el que la etapa de licuefacción se lleva a cabo a una temperatura de 60°C o más, y

en el que la etapa de sacarificación se lleva a cabo a una temperatura de 60°C o más.

30 Preferiblemente, la etapa de licuefacción tiene lugar en un reactor (reactor de licuefacción) que tiene un volumen más pequeño que el volumen del reactor (reactor de sacarificación) en el que tiene lugar la etapa de sacarificación, preferiblemente la relación del volumen del reactor de licuefacción al volumen del reactor de sacarificación está entre 1:2 y 1:50, más preferiblemente entre 1:3 y 1:40.

Según otro aspecto de la invención, el reactor de licuefacción y/o el reactor de sacarificación tienen un volumen de más de 1 m<sup>3</sup>, preferiblemente tienen un volumen de entre 10 y 5000 m<sup>3</sup>.

35 Ventajosamente, en la etapa de licuefacción o en el reactor de licuefacción, se añade menos enzima (sobre materia seca proteica) por volumen de reactor que en la etapa en la que se forma el azúcar oligomérico y/o monomérico o en el reactor de hidrólisis del azúcar monomérico.

Según un aspecto adicional de la invención, la segunda composición enzimática comprende al menos dos celobiohidrolasas diferentes, y opcionalmente una beta-glucosidasa y/o GH61.

Preferiblemente, la primera enzima o primera composición enzimática y/o la segunda enzima o segunda composición enzimática comprenden una enzima termoestable.

40 Según una realización preferida, la etapa de licuefacción se realiza en modo discontinuo alimentado, semicontinuo, o continuo, más preferiblemente en modo continuo.

45 Según otra realización preferida, la etapa de sacarificación se realiza en modo discontinuo alimentado, semicontinuo, o por lotes, más preferiblemente, en modo por lotes o discontinuo alimentado. En la etapa de licuefacción se mantiene un contenido de materia seca de 15% en peso o mayor, 20% en peso o mayor, 25% en peso o mayor, 30% en peso o mayor, 35% en peso o mayor, o 40% en peso o mayor, y preferiblemente menos de 42% en peso.

La etapa de licuefacción se realiza a una temperatura de 60°C o más, 65°C o más, o 70°C o más, preferiblemente la etapa de licuefacción se realiza a una temperatura de entre 65°C y 110°C, incluso más preferiblemente entre 65°C y 90°C, todavía más preferiblemente entre 65°C y 80°C, y lo más preferible entre 70°C y 80°C.

Breve descripción de las figuras

5            Figura 1: efecto de la prelicuefacción con endoglucanasa.

Figura 2: decaimiento de la viscosidad durante la licuefacción de materia prima lignocelulosa a diferentes temperaturas (◆ = 62°C, ▲ = 70°C y ● = 75°C).

Descripción detallada de la invención

10            La presente invención se refiere a reducir los costes de operación, tales como costes de enzimas, costes de reactores y costes de energía, y a un procedimiento para la hidrólisis de biomasa que contiene celulosa. Los costes de las enzimas se pueden reducir usando menos enzimas y manteniendo al mismo tiempo resultados de producción elevada, tales como niveles elevados de azúcares, etanol, biogas u otros productos deseados, todos comparados con los procedimientos de hidrólisis conocidos. El coste de los reactores se puede reducir seleccionando las condiciones del procedimiento, que dan como resultado un menor volumen del reactor total en comparación con los procedimientos de hidrólisis conocidos. Según la invención, se pueden obtener ahorros energéticos mediante una menor necesidad de suministro de energía al procedimiento de la invención.

Material lignocelulósico

20            El material lignocelulósico aquí incluye cualquier material lignocelulósico y/o hemicelulósico. El material lignocelulósico adecuado para uso como materia prima o material que contiene celulosa en la invención incluye biomasa, por ejemplo biomasa virgen y/o biomasa no virgen, tal como biomasa agrícola, orgánicos comerciales, escombros de construcción y de demolición, residuos sólidos municipales, papel usado y residuos de jardines. Las formas habituales de la biomasa incluyen árboles, arbustos y hierbas, trigo, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, pasto varilla, miscanthus, maíz, rastrojo de maíz, cáscaras de maíz, mazorcas de maíz, tallos de cánola, tallos de soja, sorgo dulce, grano de maíz, incluyendo fibra procedente de granos, productos y subproductos de la molienda de cereales tales como maíz, trigo y cebada (incluyendo molienda en húmedo y molienda en seco), a menudo denominados "salvado o fibra", así como residuos sólidos municipales, papel usado y residuos de jardines. La biomasa también puede ser, pero no se limita a, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos de silvicultura, residuos sólidos municipales, papel usado, y residuos de la molienda de pasta y papel. La "biomasa agrícola" incluye ramas, arbustos, cañas, maíz y cáscaras de maíz, cultivos energéticos, bosques, frutos, flores, granos, hierbas, cultivos herbáceos, hojas, corteza, agujas, troncos, raíces, retoños, cultivos leñosos de corta rotación, arbustos, pasto varilla, árboles, vegetales, pieles de frutos, vides, pasta de remolacha, harinas de trigo, cáscaras de avena, y maderas duras y blandas (sin incluir maderas con materiales perjudiciales). Además, la biomasa agrícola incluye materiales residuales orgánicos generados a partir de procesos agrícolas que incluyen actividades de cultivo y de silvicultura, específicamente residuos de madera de silvicultura. La biomasa agrícola puede ser cualquiera de los mencionados anteriormente de forma individual, o en cualquier combinación o mezcla de los mismos.

Pretratamiento

40            La materia prima se puede pretratar opcionalmente con calor, mecánicamente, microbianamente, con modificación enzimática y/o química, o cualquier combinación de tales métodos a fin de mejorar la accesibilidad del sustrato a la hidrólisis enzimática y/o hidrolizar la hemicelulosa y/o solubilizar la hemicelulosa y/o celulosa y/o lignina, de cualquier manera conocida en la técnica. En una realización, el pretratamiento se lleva a cabo tratando la lignocelulosa con explosión por vapor, tratamiento con agua caliente, o tratamiento con ácido diluido o base diluida.

Etapa de lavado

45            Opcionalmente, el procedimiento según la invención comprende una etapa de lavado. La etapa de lavado opcional se puede usar para eliminar compuestos solubles en agua que pueden actuar como inhibidores para la etapa de fermentación. La etapa de lavado se puede realizar de manera conocida.

Etapa de licuefacción

El procedimiento según la invención comprende la licuefacción de la materia prima. En esta etapa, el material lignocelulósico opcionalmente pretratado y opcionalmente lavado se pone en contacto con una primera enzima o una primera composición enzimática.

50            Dependiendo del material lignocelulósico y del pretratamiento, las condiciones de reacción diferentes, por ejemplo temperatura, dosis de enzima, tiempo de reacción de hidrólisis y concentración de materia seca, se pueden adaptar por la persona experta a fin de lograr una conversión deseada de la lignocelulosa. Aquí en lo sucesivo se dan algunas indicaciones.

5 Preferiblemente, en la etapa de licuefacción, se añade una primera enzima o primera composición enzimática para licuar al menos parte de los sólidos presentes en la biomasa, y mantener la viscosidad de la biomasa que contiene celulosa en esta etapa por debajo de 1000 cP, preferiblemente por debajo de 800 cP, más preferiblemente por debajo de 600 cP. En esta etapa, la biomasa que contiene celulosa tiene preferiblemente un contenido de materia seca de entre 15 y 30% en peso.

A un contenido de materia seca de 5% en peso o mayor, por ejemplo a 20% en peso, la biomasa que contiene celulosa tendrá una viscosidad de más de 1000 cP, por ejemplo 2000 cP.

10 Según la invención, en la etapa de licuefacción, se añade una primera enzima o primera composición enzimática para licuar al menos parte de los sólidos presentes en la biomasa, para obtener un factor de reducción de la viscosidad de al menos 2, al menos 4, al menos 6, al menos 10, al menos 15, o al menos 20, en la etapa de licuefacción. En general, el factor de reducción de la viscosidad será menor que 50. Por factor de reducción de la viscosidad se quiere decir la viscosidad de la biomasa que entra en la etapa de licuefacción, dividida entre la viscosidad de la biomasa que abandona la etapa de licuefacción (cP/cP).

15 A fin de obtener un contenido elevado de sólidos y una baja viscosidad en la etapa de licuefacción, en la fase de arranque, el reactor de licuefacción puede contener agua y biomasa que contiene celulosa (y la primera enzima o primera composición enzimática) en una cantidad tal que la viscosidad sea menor que 1000 cP, preferiblemente por debajo de 800 cP, más preferiblemente por debajo de 600 cP. Después de que la viscosidad disminuya debido a la enzima añadida, se puede añadir más biomasa que contiene celulosa, y de este modo aumentará el contenido de materia seca en la etapa de licuefacción. Este procedimiento de arranque se puede hacer hasta que se alcanza el contenido de materia seca deseado en el reactor de licuefacción. Subsiguientemente, la etapa de licuefacción se puede continuar en modo discontinuo alimentado, semicontinuo, o continuo.

20 Otra manera de arrancar es un procedimiento en el que la biomasa que contiene celulosa en la etapa de licuefacción tiene inicialmente una viscosidad mayor que 500 cP. En este procedimiento, la etapa de licuefacción se continúa en modo discontinuo alimentado, semicontinuo o continuo, solamente después de que la primera enzima o primera composición enzimática haya disminuido la viscosidad por debajo de 1000 cP, preferiblemente por debajo de 800 cP, más preferiblemente por debajo de 600 cP. En este procedimiento, ventajosamente, en la fase de arranque, se dosifica más primera enzima o primera composición enzimática (por cantidad de materia seca de biomasa que contiene celulosa) en la fase de arranque que en el modo discontinuo alimentado, semicontinuo, o continuo, subsiguiente.

30 La primera enzima o primera composición enzimática que se añade en la etapa de licuefacción es diferente de la segunda composición enzimática usada en la etapa de sacarificación.

La primera enzima o primera composición enzimática comprende una endoglucanasa.

La primera enzima o primera composición enzimática comprende más endoglucanasa que la segunda composición enzimática (expresado en % en peso de proteína).

35 La etapa de licuefacción se lleva a cabo a una temperatura de 60°C o más, 65°C o más, o 70°C o más, preferiblemente la etapa de licuefacción se lleva a cabo a una temperatura de entre 65°C y 110°C, más preferiblemente entre 65°C y 90°C, todavía más preferiblemente entre 65°C y 80°C, y lo más preferible entre 70°C y 80°C. La temperatura elevada durante la licuefacción tiene muchas ventajas, que incluyen trabajar a la temperatura óptima de la composición enzimática, la reducción del riesgo de contaminación (bacteriana), mayor actividad enzimática, menor viscosidad tras la etapa de licuefacción, mayor decaimiento de la viscosidad durante la etapa de licuefacción, se necesita una cantidad menor de agua refrigerante, el uso de agua refrigerante con una mayor temperatura, es más fácil la reutilización de las enzimas, y más (todas las ventajas relativas a la situación en la que se usa una menor temperatura en la etapa de licuefacción).

40 La cantidad de primera enzima o primera composición enzimática añadida (denominada aquí también dosis de enzima o carga de enzima) puede ser baja. Por ejemplo, la cantidad de enzima añadida en la etapa de licuefacción es 6 mg de proteína/g de peso de materia seca o menor, 5 mg de proteína/g de materia seca o menor, 4 mg de proteína/g de materia seca o menor, 3 mg de proteína/g de materia seca o menor, 2 mg de proteína/g de materia seca o menor, o 1 mg de proteína/g de materia seca o menor (expresado como proteína en mg de proteína/g de materia seca). En una realización, la cantidad de enzima es 0,5 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,4 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,3 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,25 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,20 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,18 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,15 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, o 0,10 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor (expresado como total de enzimas de celulosa en mg de enzima/g de materia seca).

55 En un aspecto adicional de la invención, el tiempo de licuefacción es 10 horas o menos, 5 horas o menos, 3 horas o menos, o 2 horas o menos. En otro aspecto, el tiempo de licuefacción es 10 horas a 1 minuto, 5 horas a 3 minutos, o 3 horas a 5 minutos. Debido a la estabilidad de la enzima o de la composición enzimática, la enzima o composición enzimática seguirá siendo activa en la siguiente etapa (sacarificación).

El pH durante la licuefacción se puede escoger mediante la persona experta. El pH durante la licuefacción puede ser 3,0-6,4. Se pueden escoger enzimas estables para uso en el procedimiento de la invención que tengan un intervalo amplio de pH de hasta 2 unidades de pH, hasta 3 unidades de pH, hasta 5 unidades de pH. El pH óptimo puede estar dentro de los límites de pH 2,0 a 8,0, 3,0-8,0, 3,5-7,0, 3,5-6,0 3,5-5,0, 3,5-4,5, 4,0-4,5, o es alrededor de 4,2.

- 5 De forma significativa, un procedimiento de la invención se lleva a cabo usando niveles elevados de materia seca (del material lignocelulósico) en la etapa de licuefacción. De este modo, la invención se lleva a cabo con un contenido de materia seca de 15% en peso o mayor, 20% en peso o mayor, 25% en peso o mayor, 30% en peso o mayor, 35% en peso o mayor o 40% en peso o mayor, y preferiblemente menos de 42% en peso. Por ejemplo, el contenido de materia seca en la etapa de licuefacción es 15% en peso, 16% en peso, 17% en peso, 18% en peso, 19% en peso, 20% en peso, 21% en peso, 22% en peso, 23% en peso, 24% en peso, 25% en peso, 26% en peso, 27% en peso, 28% en peso, 29% en peso, 30% en peso, 31% en peso, 32% en peso, 33% en peso, o más.

Preferiblemente, el reactor de licuefacción tiene un volumen de 1 m<sup>3</sup> o más, preferiblemente de más de 10 m<sup>3</sup>, y lo más preferible, de 50 m<sup>3</sup> o más. En general, el reactor de licuefacción será más pequeño que 3000 m<sup>3</sup> o 5000 m<sup>3</sup>.

#### Sacarificación

- 15 El procedimiento según la invención comprende una etapa de sacarificación enzimática. La hidrólisis enzimática incluye, pero no se limita a, hidrólisis con el fin de hidrolizar para liberar azúcar de la materia prima licuada. En esta etapa, el material lignocelulósico opcionalmente pretratado y opcionalmente lavado se mantiene, tras la licuefacción, en contacto con la segunda composición enzimática.

- 20 Dependiendo del material lignocelulósico, la etapa de pretratamiento y licuefacción, las diferentes condiciones de reacción, por ejemplo temperatura, enzima presente u opcionalmente dosificada, el tiempo de la reacción de hidrólisis y la concentración de materia seca, se pueden adaptar por la persona experta a fin de lograr una conversión deseada de la lignocelulosa en azúcar. Aquí más adelante se dan algunas indicaciones.

- 25 En la etapa de sacarificación, se añade una segunda composición enzimática para formar azúcares oligoméricos y/o monoméricos; y la segunda composición enzimática comprende una celulasa. La segunda composición comprende preferiblemente al menos dos celobiohidrolasas diferentes, y opcionalmente una beta-glucosidasa y/o GH61.

Según la invención, la sacarificación se lleva a cabo a una temperatura de 60°C o más, 65°C o más, o 70°C o más. La temperatura elevada durante la hidrólisis tiene muchas ventajas, que incluyen trabajar a la temperatura óptima de la composición enzimática, la reducción del riesgo de contaminación (bacteriana), menor cantidad de agua refrigerante requerida, uso de agua refrigerante con mayor temperatura, reutilización de las enzimas, y más.

- 30 La cantidad de la segunda composición enzimática añadida (también denominada aquí dosis de enzima o carga de enzima) puede ser baja. Por ejemplo, la cantidad de enzima añadida en la etapa de sacarificación es 6 mg de proteína/g de peso de materia seca o menor, 5 mg de proteína/g de materia seca o menor, 4 mg de proteína/g de materia seca o menor, 3 mg de proteína/g de materia seca o menor, 2 mg de proteína/g de materia seca o menor, o 1 mg de proteína/g de materia seca o menor (expresado como proteína en mg de proteína/g de materia seca). En una realización, la cantidad de enzima es 0,5 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,4 mg de composición enzimática/g de peso de materia seca o menor, 0,3 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,25 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,20 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,18 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,15 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, o 0,10 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor (expresado como total de enzimas de celulasa en mg de enzima/g de materia seca). Es posible una dosis baja de enzima, puesto que, debido a la actividad y estabilidad de las enzimas, es posible incrementar el tiempo de la reacción de sacarificación.

- 35 En un aspecto adicional de la invención, el tiempo de la reacción de sacarificación en la etapa de sacarificación es 40 horas o más, 50 horas o más, 60 horas o más, 70 horas o más, 80 horas o más, 90 horas o más, 100 horas o más, 120 horas o más, 130 h o más. En otro aspecto, el tiempo de la reacción de hidrólisis es 40-130 horas, 50-120 horas, 60-120 horas, 60-110 horas, 60-100 horas, 70-100 horas, 70-90 horas o 70-80 horas. Debido a la estabilidad de la composición enzimática, son posibles tiempos más prolongados de la reacción de hidrólisis, con los correspondientes mayores rendimientos de azúcar.

- 40 El pH durante la hidrólisis en la etapa de sacarificación puede ser escogido por la persona experta. El pH durante la hidrólisis puede ser 3,0-6,4. Las enzimas estables para uso en el procedimiento de la invención pueden tener un intervalo amplio de pH de hasta 2 unidades de pH, hasta 3 unidades de pH, hasta 5 unidades de pH. El pH óptimo puede estar dentro de los límites de pH 2,0 a 8,0, 3,0-8,0, 3,5-7,0, 3,5-6,0 3,5-5,0, 3,5-4,5, 4,0-4,5, o es alrededor de 4,2.

Opcionalmente, la etapa de sacarificación se lleva a cabo hasta que se libera el 70% o más, el 80% o más, el 85% o más, el 90% o más, el 92% o más, el 95% o más del azúcar disponible en el material lignocelulósico.

- 55 De forma significativa, un procedimiento de la invención se puede llevar a cabo usando niveles elevados de materia seca (del material lignocelulósico) en la etapa de sacarificación. De este modo, la invención se puede llevar a cabo

con un contenido de materia seca de 5% en peso o mayor, 8% en peso o mayor, 10% en peso o mayor, 11% en peso o mayor, 12% en peso o mayor, 13% en peso o mayor, 14% en peso o mayor, 15% en peso o mayor, 20% en peso o mayor, 25% en peso o mayor, 30% en peso o mayor, 35% en peso o mayor o 40% en peso o mayor, y preferiblemente menos de 42% en peso, en la etapa de sacarificación. Por ejemplo, el contenido de materia seca en la etapa de sacarificación es 14% en peso, 15% en peso, 16% en peso, 17% en peso, 18% en peso, 19% en peso, 20% en peso, 21% en peso, 22% en peso, 23% en peso, 24% en peso, 25% en peso, 26% en peso, 27% en peso, 28% en peso, 29% en peso, 30% en peso, 31% en peso, 32% en peso, 33% en peso o más, o 14-33% en peso.

Preferiblemente, el reactor de sacarificación tiene un volumen de 1 m<sup>3</sup> o más, preferiblemente de más de 10 m<sup>3</sup>, y lo más preferible, de 50 m<sup>3</sup> o más. En general, el reactor de sacarificación será menor que 3000 m<sup>3</sup> o 5000 m<sup>3</sup>.

#### 10 Uso de enzimas termoestables en condiciones óptimas de temperatura

En una realización, la invención se refiere al uso de una enzima termoestable, tal como enzima celulolítica de *Talaromyces*, en procedimientos de licuefacción y sacarificación separadas (SLS), para la producción de azúcares reductores a partir de materia prima lignocelulósica pretratada en, pero sin limitarse a, la producción de etanol. Las enzimas celulolíticas de *Talaromyces* aplicadas a la materia prima lignocelulósica pretratada mostraron velocidades de conversión máximas a temperatura en el intervalo de 50-70°C. La enzima sigue siendo activa en estas circunstancias durante 14 días o más, sin cese total de la actividad.

Usando condiciones óptimas de temperatura, se puede liberar la cantidad máxima de azúcares reductores a partir de la materia prima (hidrólisis total) en el tiempo de hidrólisis más corto posible. De esta manera, se logra una conversión del 100% de celulosa en glucosa en menos de 5 días en un procedimiento de SLS con una dosis de enzima de 0,175 ml (6 mg de proteína)/g de materia seca de materia prima. En condiciones SSF a 33°C, la conversión total de la celulosa en la materia prima lignocelulósica tardará aproximadamente 168 h, y en la presente estas condiciones mesófilas determinan el tiempo del procedimiento requerido para la producción máxima de etanol a partir de materia prima.

En el caso de que se usen enzimas celulolíticas termoestables, tales como las procedentes de *Talaromyces*, en un procedimiento SSF con microorganismos termófilos productores de etanol, los tiempos de fermentación serán más cortos, ya que las enzimas celulolíticas de *Talaromyces* liberan más rápidamente los azúcares reductores a mayores temperaturas que a temperaturas mesófilas.

En la operación SSF, la concentración del producto (g/l) depende de la cantidad de glucosa producida, pero ésta no es visible puesto que los azúcares se convierten en producto en la SSF, y las concentraciones de producto se pueden relacionar con la concentración subyacente de glucosa mediante multiplicación por el rendimiento máximo teórico.

*Rasamsonia* es un nuevo género que comprende especies *Talaromyces* y *Geosmithia* termotolerantes y termófilas (J. Houbraken et al, véase más arriba). En base a datos fenotípicos, fisiológicos y moleculares, Houbraken et al propusieron transferir las especies *T. emersonii*, *T. byssochlamydoides*, *T. eburneus*, *G. argillacea* y *G. cylindrospora* a *Rasamsonia* gen. nov. *Talaromycesemersonii*, *Penicilliumgeosmithiaemersonii* y *Rasamsoniaemersonii* se usan aquí de forma intercambiable.

En un aspecto de la invención, la segunda composición enzimática comprende una celulasa, preferiblemente al menos 2 celulasas, más preferiblemente dos celobiohidrolasas diferentes, y opcionalmente GH61. Preferiblemente, al menos una, más preferiblemente al menos dos, incluso más preferiblemente al menos tres, de las al menos tres enzimas diferentes, son termoestables.

Una enzima "termoestable" significa que la enzima tiene un óptimo de temperatura de 60°C o mayor, por ejemplo 70°C o mayor, tal como 75°C o mayor, por ejemplo 80°C o mayor, tal como 85°C o mayor. La persona experta puede seleccionar polinucleótidos adecuados usando conocimiento normal. Por ejemplo, se pueden aislar a partir de microorganismos termófilos, o se pueden diseñar por la persona experta y se pueden sintetizar artificialmente. En una realización, los polinucleótidos se pueden aislar a partir de hongos filamentosos termófilos o termotolerantes, o se pueden aislar a partir de hongos no termófilos o no termotolerantes, pero se encuentra que son termoestables.

Aquí, una celulasa es un polipéptido que es capaz de degradar o modificar la celulosa. Un polipéptido que es capaz de degradar la celulosa es aquel que es capaz de catalizar el proceso de ruptura de la celulosa en unidades más pequeñas, ya sea parcialmente, por ejemplo en celodextrinas, o completamente en monómeros de glucosa. Una celulasa según la invención puede dar lugar a una población mixta de celodextrinas y monómeros de glucosa cuando se pone en contacto con la celulasa. Tal degradación tendrá lugar típicamente por medio de una reacción de hidrólisis.

Las proteínas GH61 (familia 61 de glucósido hidrolasas, o algunas veces denominada EGIV) son polisacárido monooxigenasas (PMO) dependientes de oxígeno según la bibliografía más reciente. A menudo, en la bibliografía, estas proteínas se mencionan para potenciar la acción de celulasas sobre sustratos lignocelulósicos. GH61 fue clasificado originalmente como endogluconasa en base a la medida de actividad de endo-1,4-β-d-glucanasa muy débil en un miembro de la familia. El término "GH61", como se usa aquí, se ha de entender como una familia de

enzimas, que comparten porciones de secuencias conservadas comunes y plegamientos para ser clasificadas en la familia 61 del sistema de clasificación de GH CAZY bien establecido (<http://www.cazy.org/GH61.html>). La familia 61 de glicósido hidrolasas es un miembro de la familia de glicósido hidrolasas EC 3.2.1. GH61 se usa aquí como parte de las celulasas.

5 Aquí, una hemicelulasa es cualquier polipéptido que es capaz de degradar o modificar la hemicelulosa. Es decir, una hemicelulasa puede ser capaz de degradar o modificar uno o más de xilano, glucuronoxilano, arabinoxilano, glucomanano y xiloglucano. Un polipéptido que es capaz de degradar una hemicelulosa es aquel que es capaz de catalizar el proceso de ruptura de la hemicelulosa en polisacáridos más pequeños, ya sea parcialmente, por ejemplo en oligosacáridos, o totalmente en monómeros de azúcar, por ejemplo monómeros de azúcar de hexosa o de  
10 pentosa. Una hemicelulasa según la invención puede dar lugar a una población mixta de oligosacáridos y monómeros de azúcar cuando se pone en contacto con la hemicelulasa. Tal degradación tendrá lugar típicamente por medio de una reacción de hidrólisis.

Aquí, una pectinasa es cualquier polipéptido que es capaz de degradar o modificar la pectina. Un polipéptido que es capaz de degradar la pectina es aquel que es capaz de catalizar el proceso de ruptura de la pectina en unidades más pequeñas, ya sea parcialmente, por ejemplo en oligosacáridos, o totalmente en monómeros de azúcar. Una pectinasa según la invención puede dar lugar a una población mixta de oligosacáridos y monómeros de azúcar cuando se pone en contacto con la pectinasa. Tal degradación tendrá lugar típicamente por medio de una reacción de hidrólisis.  
15

Aquí, una celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de enlaces 1,4-β-D-glucosídicos en celulosa o celotetraosa, liberando celobiosa de los extremos de las cadenas. Esta enzima también se puede denominar como celulasa 1,4-β-celobiosidasa, 1,4-β-celobiohidrolasa, 1,4-β-D-glucano celobiohidrolasa, avicelasa, exo-1,4-β-D-glucanasa, exocelobiohidrolasa o exoglucanasa.  
20

Aquí, una endo-β-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,4-β-D-glucosídicos en celulosa, liquenina o β-D-glucanos de cereales. Tal polipéptido también puede ser capaz de hidrolizar enlaces 1,4 en β-D-glucanos que también contienen enlaces 1,3. Esta enzima también se puede denominar como celulasa, avicelasa, β-1,4-endoglucano hidrolasa, β-1,4-glucanasa, carboximetilcelulasa, celudextrinasa, endo-1,4-β-D-glucanasa, endo-1,4-β-D-glucanohidrolasa, endo-1,4-β-glucanasa o endoglucanasa.  
25

Aquí, una β-glucosidasa (EC 3.2.1.21) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de restos terminales de β-D-glucosa no reductora, con liberación de β-D-glucosa. Tal polipéptido puede tener una amplia especificidad por β-D-glucósidos, y también puede hidrolizar uno o más de los siguientes: un β-D-galactósido, un α-L-arabinósido, un β-D-xilósido o un β-D-fucósido. Esta enzima también se puede denominar como amigdalasa, β-D-glucósido glucohidrolasa, celobiasa o gentobiasa.  
30

Aquí, una β-(1,3)(1,4)-glucanasa (EC 3.2.1.73) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de enlaces 1,4-β-D-glucosídicos en β-D-glucanos que contienen enlaces 1,3 y 1,4. Tal polipéptido puede actuar sobre liquenina y β-D-glucanos de cereales, pero no sobre β-D-glucanos que contienen solamente enlaces 1,3 o 1,4. Esta enzima también se puede denominar como liqueninasa, 1,3-1,4-β-D-glucano 4-glucanohidrolasa, β-glucanasa, endo-β-1,3-1,4-glucanasa, liquenasa, o β-glucanasa con enlaces mixtos. Una alternativa para este tipo de enzima es EC 3.2.1.6, que se describe como endo-1,3(4)-beta-glucanasa. Este tipo de enzima hidroliza enlaces 1,3 o 1,4 en beta-D-glucanasa cuando el resto de glucosa, cuyo grupo reductor está implicado en el enlace a hidrolizar, está sustituido él mismo en C-3. Nombres alternativos incluyen endo-1,3-beta-glucanasa, laminarinasa, 1,3-(1,3;1,4)-beta-D-glucano 3 (4) glucanohidrolasa; los sustratos incluyen laminarina, liquenina y beta-D-glucanos de cereales.  
35  
40

En el procedimiento de la invención se puede usar una hemicelulasa, por ejemplo una endoxilanasas, una β-xilosidasa, una α-L-arabinofuranosidasa, una α-D-glucuronidasa, una acetil xilano esterasa, una feruloil esterasa, una cumaroil esterasa, una α-galactosidasa, una β-galactosidasa, una β-mananasa o una β-manosidasa.

45 Aquí, una endoxilanasas (EC 3.2.1.8) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,4-β-D-xilosídicos en xilanos. Esta enzima también se puede denominar como endo-1,4-β-xilanasas o 1,4-β-D-xilano xilanohidrolasa. Una alternativa es EC 3.2.1.136, una glucuronoarabinoxilano endoxilanasas, una enzima que es capaz de hidrolizar enlaces 1,4-xilosídicos en glucuronoarabinoxilanos.

Aquí, una β-xilosidasa (EC 3.2.1.37) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de 1,4-β-D-xilanos, para eliminar restos sucesivos de D-xilosa de los términos no reductores. Tales enzimas también pueden hidrolizar xilobiosa. Esta enzima también se puede denominar como xilano 1,4-β-xilosidasa, 1,4-β-D-xilano xilohidrolasa, exo-1,4-β-xilosidasa o xilobiasa.  
50

Aquí, una α-L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) es cualquier polipéptido que es capaz de actuar sobre α-L-arabinofuranósidos, α-L-arabinanos que contienen enlaces (1,2) y/o (1,3) y/o (1,5), arabinoxilanos y arabinogalactanos. Esta enzima también se puede denominar como α-N-arabinofuranosidasa, arabinofuranosidasa o arabinosidasa.  
55

- 5 Aquí, una  $\alpha$ -D-glucuronidasa (EC 3.2.1.139) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar una reacción de la siguiente forma:  $\alpha$ -D-glucuronósido + H(2)O = un alcohol + D-glucuronato. Esta enzima también se puede denominar como  $\alpha$ -glucuronidasa o  $\alpha$ -glucosiduronasa. Estas enzimas también pueden hidrolizar ácido glucurónico 4-O-metilado, que también puede estar presente como un sustituyente en xilanos. La alternativa es EC 3.2.1.131: xilano  $\alpha$ -1,2-glucuronosidasa, que cataliza la hidrólisis de enlaces  $\alpha$ -1,2-(4-O-metil)glucuronosilo.
- 10 Aquí, una acetil xilano esterasa (EC 3.1.1.72) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la desacetilación de xilanos y xilo-oligosacáridos. Tal polipéptido puede catalizar la hidrólisis de grupos acetilo de xilano polimérico, xilosa acetilada, glucosa acetilada,  $\alpha$ -naftil acetato o p-nitrofenil acetato, pero, típicamente, no de triacetilglicerol. Tal polipéptido no actúa típicamente sobre manano acetilado o pectina.
- 15 Aquí, una feruloil esterasa (EC 3.1.1.73) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar una reacción de la forma: feruloil-sacárido + H(2)O = ferulato + sacárido. El sacárido puede ser, por ejemplo, un oligosacárido o un polisacárido. Puede catalizar típicamente la hidrólisis del grupo 4-hidroxi-3-metoxicinamoilo (feruloilo) de un azúcar esterificado, que es habitualmente arabinosa en sustratos "naturales". El acetato de p-nitrofenilo y el ferulato de metilo son típicamente sustratos más pobres. Esta enzima también se puede denominar como cinamoil éster hidrolasa, ácido ferúlico esterasa, o hidroxicinamoil esterasa. También se puede denominar como una enzima accesoria de hemicelulasas, puesto que puede ayudar a xilanasas y pectinasas a romper la hemicelulosa y la pectina de las paredes celulares de las plantas.
- 20 Aquí, una cumaroil esterasa (EC 3.1.1.73) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar una reacción de la forma: cumaroil-sacárido + H(2)O = cumarato + sacárido. El sacárido puede ser, por ejemplo, un oligosacárido o un polisacárido. Esta enzima también se puede denominar como trans-4-cumaroil esterasa, trans-p-cumaroil esterasa, p-cumaroil esterasa o ácido p-cumárico esterasa. Esta enzima también cae dentro de EC 3.1.1.73, de manera que también se puede denominar como una feruloil esterasa.
- 25 Aquí, una  $\alpha$ -galactosidasa (EC 3.2.1.22) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de restos terminales de  $\alpha$ -D-galactosa no reductora en  $\alpha$ -D-galactósidos, incluyendo oligosacáridos de galactosa, galactomananos, galactanos y arabinogalactanos. Tal polipéptido también puede ser capaz de hidrolizar  $\alpha$ -D-fucósidos. Esta enzima también se puede denominar como melibiasa.
- 30 Aquí, una  $\beta$ -galactosidasa (EC 3.2.1.23) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de restos terminales no reductores de  $\beta$ -D-galactosa en  $\beta$ -D-galactósidos. Tal polipéptido también puede ser capaz de hidrolizar  $\alpha$ -L-arabinósidos. Esta enzima también se puede denominar como exo-(1->4)- $\beta$ -D-galactanasa, o lactasa.
- 35 Aquí, una  $\beta$ -mananasa (EC 3.2.1.78) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis al azar de enlaces 1,4- $\beta$ -D-manosídicos en mananos, galactomananos y glucomananos. Esta enzima también se puede denominar como manano endo-1,4- $\beta$ -manosidasa, o endo-1,4-mananasa.
- 40 Aquí, una  $\beta$ -manosidasa (EC 3.2.1.25) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de restos terminales no reductores de  $\beta$ -D-manosa en  $\beta$ -D-manósidos. Esta enzima también se puede denominar como mananasa o manasa.
- Una composición enzimática puede comprender cualquier pectinasa, por ejemplo una endo-poligalacturonasa, una pectina metil esterasa, una endo-galactanasa, una beta-galactosidasa, una pectina acetil esterasa, una endo-pectina liasa, pectato liasa,  $\alpha$ -ramnosidasa, una exo-galacturonasa, una expoligalacturonato liasa, una ramnogalacturonano hidrolasa, una ramnogalacturonano liasa, una ramnogalacturonano acetil esterasa, una ramnogalacturonano galacturonohidrolasa, una xilogalacturonasa.
- 45 Aquí, una endo-poligalacturonasa (EC 3.2.1.15) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis al azar de enlaces 1,4- $\alpha$ -D-galactosidurónicos en pectato y otros galacturonanos. Esta enzima también se puede denominar como poligalacturonasa, pectina despolimerasa, pectinasa, endopoligalacturonasa, pectolasa, pectina hidrolasa, pectina poligalacturonasa, poli- $\alpha$ -1,4-galacturónido glicanohidrolasa, endogalacturonasa; endo-D-galacturonasa o poli(1,4- $\alpha$ -D-galacturónido) glicanohidrolasa.
- 50 Aquí, una pectin metil esterasa (EC 3.1.1.11) es cualquier enzima que es capaz de catalizar la reacción: pectina + n H<sub>2</sub>O = n metanol + pectato. La enzima también se puede conocer como pectinesterasa, pectina desmetoxilasa, pectina metoxilasa, pectina metilesterasa, pectasa, pectinoesterasa o pectina pectilhidrolasa.
- Aquí, una endo-galactanasa (EC 3.2.1.89) es cualquier enzima que es capaz de catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,4- $\beta$ -D-galactosídicos en arabinogalactanos. La enzima también se puede conocer como arabinogalactano endo-1,4- $\beta$ -galactosidasa, endo-1,4- $\beta$ -galactanasa, galactanasa, arabinogalactanasa o arabinogalactano 4- $\beta$ -D-galactanohidrolasa.
- Aquí, una pectina acetil esterasa se define aquí como cualquier enzima que tiene actividad de acetil esterasa, que cataliza la desacetilación de los grupos acetilo en los grupos hidroxilo de restos GalUA de pectina.

- 5 Aquí, una endo-pectina liasa (EC 4.2.2.10) es cualquier enzima capaz de catalizar la escisión eliminativa de éster metílico de (1→4)- $\alpha$ -D-galacturonano para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi-6-O-metil- $\alpha$ -D-galact-4-enuronosilo en sus extremos reductores. La enzima también se puede conocer como pectina liasa, pectina trans-eliminasa; endo-pectina liasa, transeliminasa polimetilgalacturónica, pectina metiltranseliminasa, pectoliasa, PL, PNL o PMGL o (1→4)-6-O-metil- $\alpha$ -D-galacturonano liasa.
- 10 Aquí, una pectato liasa (EC 4.2.2.2) es cualquier enzima capaz de catalizar la escisión eliminativa de (1→4)- $\alpha$ -D-galacturonano para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi- $\alpha$ -D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. La enzima también se puede conocer como transeliminasa poligalacturónica, ácido péctico transeliminasa, poligalacturonato liasa, endopectina metiltranseliminasa, pectato transeliminasa, endogalacturonato transeliminasa, ácido péctico liasa, liasa péctica, ácido  $\alpha$ -1,4-D-endopoligalacturónico liasa, PGA liasa, PPasa-N, ácido endo- $\alpha$ -1,4-poligalacturónico liasa, ácido poligalacturónico liasa, pectina *trans*-eliminasa, ácido poligalacturónico *trans*-eliminasa, o (1→4)- $\alpha$ -D-galacturonano liasa.
- 15 Aquí, una alfa ramnosidasa (EC 3.2.1.40) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de restos terminales no reductores de  $\alpha$ -L-ramnosa en  $\alpha$ -L-ramnósidos, o como alternativa, en ramnogalacturonano. Esta enzima también se puede conocer como  $\alpha$ -L-ramnosidasa T,  $\alpha$ -L-ramnosidasa N o  $\alpha$ -L-ramnósido ramnohidrolasa.
- Aquí, una exo-galacturonasa (EC 3.2.1.82) es cualquier polipéptido capaz de hidrolizar ácido péctico del extremo no reductor, liberando digalacturonato. La enzima también se puede conocer como exo-poli- $\alpha$ -galacturonosidasa, exopoligalacturonosidasa o exopoligalacturanosidasa.
- 20 Aquí, una exo-galacturonasa (EC 3.2.1.67) es cualquier polipéptido capaz de catalizar:  $(1,4\text{-}\alpha\text{-D-galacturónido})_n + \text{H}_2\text{O} = (1,4\text{-}\alpha\text{-D-galacturónido})_{n-1} + \text{D-galacturonato}$ . La enzima también se puede conocer como galacturano 1,4- $\alpha$ -galacturonidasa, exopoligalacturonasa, poli(galacturonato) hidrolasa, exo-D-galacturonasa, exo-D-galacturonanasa, exopoli-D-galacturonasa o poli(1,4- $\alpha$ -D-galacturónido) galacturonohidrolasa.
- 25 Aquí, una exopoligalacturonato liasa (EC 4.2.2.9) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la escisión eliminativa de 4-(4-desoxi- $\alpha$ -D-galact-4-enuronosil)-D-galacturonato del extremo reductor de pectato, es decir, pectina desesterificada. Esta enzima se puede conocer como pectato disacárido-liasa, pectato exo-liasa, ácido exopéctico transeliminasa, exopectato liasa, ácido exopoligalacturónico *trans*-eliminasa, PATE, exo-PATE, exo-PGL o (1→4)- $\alpha$ -D-galacturonano disacárido de extremo reductor liasa.
- 30 Aquí, una ramnogalacturonano hidrolasa es cualquier polipéptido que es capaz de hidrolizar el enlace entre ácido galactosilurónico y ramnopiranosilo de una forma endo en estructuras de ramnogalacturonano estrictamente alternantes, que consisten en el disacárido [ácido [(1,2-alfa-L-ramnoil-(1,4)-alfa-galactosilurónico)].
- Aquí, una ramnogalacturonano liasa es cualquier polipéptido que es capaz de escindir los enlaces  $\alpha$ -L-Rhap-(1→4)- $\alpha$ -D-GalpA de una forma endo en ramnogalacturonano mediante eliminación beta.
- Aquí, una ramnogalacturonano acetil esterasa es cualquier polipéptido que cataliza la desacetilación de la cadena principal de restos alternantes de ramnosa y ácido galacturónico en ramnogalacturonano.
- 35 Aquí, una ramnogalacturonano galacturonohidrolasa es cualquier polipéptido que es capaz de hidrolizar ácido galacturónico del extremo no reductor de estructuras de ramnogalacturonano estrictamente alternantes, de una manera exo.
- Aquí, una xilogalacturonasa es cualquier polipéptido que actúa sobre xilogalacturonano escindiendo de manera endo la cadena principal del ácido galacturónico sustituido con  $\beta$ -xilosa. Esta enzima también se puede conocer como xilogalacturonano hidrolasa.
- 40 Aquí, una  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) es cualquier polipéptido que es capaz de actuar sobre  $\alpha$ -L-arabinofuranósidos,  $\alpha$ -L-arabinanos que contienen enlaces (1,2) y/o (1,3) y/o (1,5), arabinoxilanos y arabinogalactanos. Esta enzima también se puede denominar como  $\alpha$ -N-arabinofuranosidasa, arabinofuranosidasa o arabinosidasa.
- 45 Aquí, una endo-arabinanasa (EC 3.2.1.99) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,5- $\alpha$ -arabinofuranosídicos en 1,5-arabinanos. La enzima también se puede conocer como endo-arabinasa, arabinano endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinosidasa, endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinanasa, endo- $\alpha$ -1,5-arabanasa; endo-arabanasa o 1,5- $\alpha$ -L-arabinano 1,5- $\alpha$ -L-arabinanohidrolasa.
- 50 Una composición enzimática puede comprender al menos una celulasa y opcionalmente al menos una hemicelulasa y opcionalmente al menos una pectinasa (una de las cuales es un polipéptido según la invención). Una segunda composición enzimática puede comprender una GH61, una celobiohidrolasa, una endoglucanasa y/o una  $\beta$ -glucosidasa. Tal composición también puede comprender una o más hemicelulasas y/o una o más pectinasas.

Además, en el procedimiento de la invención se pueden usar una o más (por ejemplo dos, tres, cuatro, o todas) de una amilasa, una proteasa, una lipasa, una ligninasa, una hexosiltransferasa, una glucuronidasa, o una expansina o una proteína inducida por celulosa, o una proteína que integra celulosa, o una proteína similar (éstas se denominan como actividades auxiliares antes).

5 “Proteasa” incluye enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos (peptidasas), así como enzimas que hidrolizan enlaces entre péptidos y otros restos, tales como azúcares (glucopeptidasas). Muchas proteasas se caracterizan bajo EC 3.4, y son adecuadas para uso en la invención incorporada aquí como referencia. Algunos tipos específicos de proteasas incluyen cisteína proteasas, incluyendo pepsina, papaína, y serina proteasas, incluyendo quimiotripsinas, carboxipeptidasas y metaloendopeptidasas.

10 “Lipasa” incluye enzimas que hidrolizan lípidos, ácidos grasos, y acilglicéridos, incluyendo fosfoglicéridos, lipoproteínas, diacilgliceroles, y similares. En plantas, los lípidos se usan como componentes estructurales para limitar la pérdida de agua y la infección por patógenos. Estos lípidos incluyen ceras derivadas de ácidos grasos, así como cutina y suberina.

15 “Ligninasa” incluye enzimas que pueden hidrolizar o romper la estructura de polímeros de lignina. Las enzimas que pueden romper lignina incluyen lignina peroxidasas, manganeso peroxidasas, lacasas y feruloil esterases, y otras enzimas descritas en la técnica que se sabe que despolimerizan o rompen de otro modo polímeros de lignina. También se incluyen enzimas capaces de hidrolizar enlaces formados entre azúcares hemicelulósicos (principalmente arabinosa) y lignina. Las ligninasas incluyen, pero no se limitan a, el siguiente grupo de enzimas:  
20 lignina peroxidasas (EC 1.11.1.14), manganeso peroxidasas (EC 1.11.1.13), lacasas (EC 1.10.3.2) y feruloil esterases (EC 3.1.1.73).

“Hexosiltransferasa” (2.4.1-) incluye enzimas que son capaces de catalizar una reacción de transferasa, pero que también pueden catalizar una reacción de hidrólisis, por ejemplo de celulosa y/o productos de la degradación de celulosa. Un ejemplo de una hexosiltransferasa que se puede usar en la invención es una  $\beta$ -glucanosiltransferasa. Tal enzima puede ser capaz de catalizar la degradación de (1,3)(1,4)glucano y/o celulosa y/o un producto de la  
25 degradación de celulosa.

“Glucuronidasa” incluye enzimas que catalizan la hidrólisis de un glucuronósido, por ejemplo  $\beta$ -glucuronósido, para producir un alcohol. Se han caracterizado muchas glucuronidasas, y pueden ser adecuadas para uso en la invención, por ejemplo  $\beta$ -glucuronidasa (EC 3.2.1.31), hialurono-glucuronidasa (EC 3.2.1.36), glucuronosil-  
30 disulfoglucosamina glucuronidasa (3.2.1.56), glicirrizinato  $\beta$ -glucuronidasa (3.2.1.128), o  $\alpha$ -D-glucuronidasa (EC 3.2.1.139).

Una composición para uso en la invención puede comprender una expansina o proteína similar a expansina, tal como una swollenina (véase Salheimo et al., Eur. J. Biochem. 269, 4202-4211, 2002) o una proteína similar a swollenina.

35 Las expansinas están implicadas en la pérdida de la estructura de la pared celular durante el crecimiento celular de las plantas. Se ha propuesto que las expansinas rompen el enlace de hidrógeno entre celulosa y otros polisacáridos de la pared celular, sin que tenga actividad hidrolítica. De esta manera, se piensa que permiten el deslizamiento de las fibras de celulosa y el alargamiento de la pared celular. La swollenina, una proteína similar a expansina, contiene un dominio N-terminal de la Familia 1 del Módulo de Unión de Hidratos de Carbono (CBD) y un dominio C-terminal similar a expansina. Para los fines de esta invención, una proteína similar a expansina o una proteína similar a  
40 swollenina puede comprender uno o ambos de tales dominios, y/o puede destruir la estructura de las paredes celulares (tal como la destrucción de la estructura de celulosa), opcionalmente sin producir cantidades detectables de azúcares reductores.

En el procedimiento de la invención, se puede usar un miembro de cada una de las clases de enzimas mencionadas anteriormente, varios miembros de una clase de enzimas, o una combinación de estas clases de enzimas o  
45 proteínas auxiliares (es decir, aquellas proteínas mencionadas aquí que no tienen actividad enzimática *per se*, pero no obstante ayudan en la degradación lignocelulósica).

En el procedimiento de la invención, se pueden usar enzimas procedentes de (1) proveedores comerciales; (2) genes clonados que expresan enzimas; (3) caldo complejo (tal como el que resulta del crecimiento de una cepa  
50 microbiana en medios, en los que las cepas segregan proteínas y enzimas en los medios; (4) lisados celulares de cepas que se hacen crecer como en (3); y/o (5) material vegetal que expresa enzimas. Diferentes enzimas en una composición de la invención se pueden obtener a partir de fuentes diferentes.

Las enzimas se pueden producir ya sea exógenamente en microorganismos, levaduras, hongos, bacterias o plantas, después se pueden aislar y se pueden añadir, por ejemplo, a la materia prima lignocelulósica. Como alternativa, las  
55 enzimas se producen, pero no se aíslan, y el caldo de fermentación de la masa celular bruta, o el material vegetal (tal como rastrojo de maíz o paja de trigo), y similar, se puede añadir a, por ejemplo, la materia prima. Como alternativa, la masa celular bruta, o el medio de producción de las enzimas, o el material vegetal, se puede tratar para prevenir el crecimiento microbiano posterior (por ejemplo, mediante calentamiento o adición de agentes

antimicrobianos), después se añade a, por ejemplo, una materia prima. Estas mezclas enzimáticas brutas pueden incluir el organismo productor de la enzima. Como alternativa, la enzima se puede producir en una fermentación que usa materia prima (pretratada) (tal como rastrojo de maíz o paja de trigo) para proporcionar nutrición a un organismo que produce una enzima o enzimas. De esta manera, las propias plantas que producen las enzimas pueden servir como una materia prima lignocelulósica y se pueden añadir a la materia prima lignocelulósica.

#### Fermentación

El procedimiento según la invención puede comprender además una etapa de fermentación. En un aspecto adicional, la invención incluye opcionalmente un procedimiento de fermentación en el que se usa un microorganismo para la fermentación de una fuente de carbono que comprende azúcar o azúcares, por ejemplo glucosa, L-arabinosa y/o xilosa. La fuente de carbono puede incluir cualquier oligo- o polímero de hidrato de carbono que comprenda unidades de L-arabinosa, xilosa o glucosa, tal como, por ejemplo, lignocelulosa, xilanos, celulosa, almidón, arabinano, y similares. Para la liberación de unidades de xilosa o de glucosa a partir de tales hidratos de carbono, se pueden añadir carbohidrasas apropiadas (tales como xilanasas, glucanasas, amilasas, y similares) al medio de fermentación, o se pueden producir por la célula hospedante modificada. En este último caso, la célula hospedante modificada se puede manipular genéticamente para producir y excretar tales carbohidrasas. Una ventaja adicional de usar fuentes oligo- o poliméricas de glucosa es que permite mantener una baja (menor) concentración de glucosa libre durante la fermentación, por ejemplo usando cantidades limitantes de la velocidad de las carbohidrasas. A su vez, esto evitará la represión de sistemas requeridos para el metabolismo y transporte de azúcares que no son de glucosa, tal como xilosa. En un procedimiento preferido, la célula hospedante modificada fermenta tanto la L-arabinosa (opcionalmente xilosa) como la glucosa, preferiblemente de forma simultánea, en cuyo caso preferiblemente se usa una célula hospedante modificada que es insensible a la represión de glucosa, para evitar el crecimiento diáxico. Además de una fuente de L-arabinosa, opcionalmente xilosa (y glucosa) como fuente de carbono, el medio de fermentación comprenderá además el ingrediente apropiado requerido para el crecimiento de la célula hospedante modificada. En la técnica son bien conocidas las composiciones de medios de fermentación para el crecimiento de microorganismos tales como levaduras u hongos filamentosos.

El tiempo de fermentación puede ser más corto que en la fermentación convencional en las mismas condiciones, en el que parte de la hidrólisis enzimática todavía tiene que tomar parte durante la fermentación. En una realización, el tiempo de fermentación es 100 horas o menos, 90 horas o menos, 80 horas o menos, 70 horas o menos, o 60 horas o menos, para una composición de azúcar de 50 g/l de glucosa y otros azúcares correspondientes procedentes de la materia prima lignocelulósica (por ejemplo 50 g/l de xilosa, 35 g/l de L-arabinosa, y 10 g/l de galactosa. Para composiciones de azúcar más diluidas, el tiempo de fermentación se puede reducir correspondientemente.

El procedimiento de fermentación puede ser un procedimiento de fermentación aerobio o anaerobio. Un procedimiento de fermentación anaerobio se define aquí como un procedimiento de fermentación que se lleva a cabo en ausencia de oxígeno, o en el que no se consume sustancialmente nada de oxígeno, preferiblemente menos de 5, 2,5 o 1 mmol/l/h, más preferiblemente se consume 0 mmol/l/h (es decir, el consumo de oxígeno no es detectable), y en el que las moléculas orgánicas sirven tanto como dadores de electrones como aceptores de electrones. En ausencia de oxígeno, el NADH, producido en la glicolisis y la formación de biomasa, no se puede oxidar por fosforilación oxidativa. Para resolver este problema, muchos organismos usan piruvato o uno de sus derivados como un aceptor de electrones y de hidrógeno, regenerando de ese modo NAD<sup>+</sup>. De este modo, en un procedimiento de fermentación anaerobio preferido, se usa piruvato como un aceptor de electrones (y de hidrógeno), y se reduce a productos de fermentación tales como etanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico, un aminoácido, 1,3-propano-diol, etileno, glicerol, butanol, metano o biogas, un antibiótico β-lactámico y una cefalosporina. En una realización preferida, el procedimiento de fermentación es anaerobio. Un procedimiento anaerobio es ventajoso puesto que es más barato que los procedimientos aerobios: se necesita un equipo menos especial. Además, se espera que los procedimientos anaerobios den un mayor rendimiento de producto que los procedimientos aerobios. En condiciones aerobias, habitualmente el rendimiento de la biomasa es mayor que en condiciones anaerobias. Como consecuencia, habitualmente en condiciones aerobias, el rendimiento de producto esperado es menor que en condiciones anaerobias.

En otra opción, el procedimiento de fermentación es en condiciones limitadas de oxígeno. Más preferiblemente, el procedimiento de fermentación es aerobio y en condiciones limitadas de oxígeno. Un procedimiento de fermentación limitado en oxígeno es un procedimiento en el que el consumo de oxígeno está limitado por la transferencia de oxígeno desde el gas al líquido. El grado de limitación de oxígeno está determinado por la cantidad y composición del caudal gaseoso entrante, así como de las propiedades reales de mezclado/transferencia de masas del equipo de fermentación usado. Preferiblemente, en un procedimiento en condiciones limitadas de oxígeno, la velocidad de consumo de oxígeno es al menos 5,5, más preferiblemente al menos 6, e incluso más preferiblemente al menos 7 mmoles/l/h.

El procedimiento de fermentación se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura que es óptima para la célula modificada. De este modo, para la mayoría de las levaduras o células fúngicas, el procedimiento de fermentación se lleva a cabo a una temperatura que es menor que 42°C, preferiblemente menor que 38°C. Para células hospedantes

de levadura o fúngicas filamentosas, el procedimiento de fermentación se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura que es menor que 35, 33, 30 o 28°C, y a una temperatura que es mayor que 20, 22, o 25°C.

- 5 En una realización de la invención, la fermentación se realiza con un microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar de C5. En una realización, el procedimiento es un procedimiento para la producción de etanol, con lo que el procedimiento comprende la etapa d) que comprende fermentar un medio que contiene azúcar o azúcares con un microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar de C5, con lo que la célula hospedante es capaz de fermentar glucosa, L-arabinosa, y xilosa, a etanol. En una realización de la misma, el microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar de C5 es una levadura. En una realización, la levadura pertenece al género *Saccharomyces*, preferiblemente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.
- 10 Opcionalmente, el procedimiento de fermentación para la producción de etanol es anaerobio. Anaerobio ya se ha definido previamente aquí. En otra realización preferida, el procedimiento de fermentación para la producción de etanol es aerobio. En otra realización preferida, el procedimiento de fermentación para la producción de etanol es en condiciones limitadas de oxígeno, más preferiblemente aerobio en condiciones limitadas de oxígeno. Las condiciones limitadas de oxígeno ya se han definido previamente aquí.
- 15 En tal procedimiento, la productividad volumétrica de etanol es preferiblemente al menos 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 5,0 o 10,0 g de etanol por litro por hora. El rendimiento de etanol en L-arabinosa y opcionalmente xilosa y/o glucosa en el procedimiento es preferiblemente al menos 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 98%. El rendimiento de etanol se define aquí como un porcentaje del rendimiento máximo teórico, que, para glucosa y L-arabinosa y opcionalmente xilosa, es 0,51 g de etanol por g de glucosa o xilosa.
- 20 En un aspecto, el procedimiento de fermentación opcional que conduce a la producción de etanol tiene varias ventajas en comparación con los procedimientos de fermentación del etanol:
- son posibles procedimientos anaerobios;
  - también son posibles condiciones limitadas de oxígeno;
  - se pueden obtener mayores rendimientos de etanol y velocidades de producción de etanol;
- 25 - la cepa usada puede ser capaz de usar L-arabinosa y opcionalmente xilosa.

Como alternativa a los procedimientos de fermentación descritos anteriormente, se pueden usar al menos dos células distintas; esto significa que este procedimiento es un procedimiento de cofermentación. Todas las realizaciones preferidas de los procedimientos de fermentación como se describen anteriormente también son realizaciones preferidas de este procedimiento de cofermentación: la identidad del producto de fermentación, la identidad de la fuente de L-arabinosa y fuente de xilosa, las condiciones de fermentación (condiciones aerobias o anaerobias, condiciones limitadas de oxígeno, temperatura a la cual se esté llevando a cabo el procedimiento, la productividad de etanol, rendimiento de etanol).

30

El procedimiento de fermentación se puede llevar a cabo sin necesidad de ajustar el pH durante el procedimiento. Es decir, el procedimiento es aquel que se puede llevar a cabo sin adición de ningún ácido o ácidos o base o bases. Sin embargo, esto excluye una etapa de pretratamiento, en la que se puede añadir ácido. El hecho es que la composición de la invención es capaz de actuar a pH bajo, y por lo tanto no hay necesidad de ajustar el pH de ácido de una materia prima pretratada con ácido, a fin de que pueda tener lugar la sacarificación. En consecuencia, un método de la invención puede ser un método con cero residuos que usa solamente productos orgánicos sin la necesidad de aporte de sustancias químicas inorgánicas.

35

40 Tiempo de reacción global

El tiempo de reacción global (es decir, el tiempo de reacción de la etapa de licuefacción y de hidrólisis, y opcionalmente la etapa de fermentación juntas se puede reducir. En una realización, el tiempo de reacción global es 150 horas o menos, 140 horas o menos, 130 o menos, 120 horas o menos, 110 horas o menos, 100 horas o menos, 90 horas o menos, 80 horas o menos, 75 horas o menos, o alrededor de 72 horas a 90% de rendimiento de glucosa. Correspondientemente, se pueden lograr menores tiempos globales a un menor rendimiento de glucosa. Esto es independiente del modo en el que se lleven a cabo los procedimientos en el modo de SLH.

45

Productos de fermentación

Los productos de fermentación que se pueden producir según la invención incluyen aminoácidos, vitaminas, sustancias farmacéuticas, suplementos de piensos para animales, sustancias químicas de especialidad, materias primas químicas, plásticos, disolventes, combustibles, tales como metano o biogas y etanol, u otros polímeros orgánicos, ácido láctico, incluyendo etanol para combustible (entendiéndose el término "etanol" que incluye alcohol etílico o mezclas de alcohol etílico y agua).

50

Los productos específicos de valor añadido que se pueden producir mediante los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, biocombustibles (incluyendo etanol y butanol); ácido láctico; ácido 3-hidroxi-propiónico; ácido

acrílico; ácido acético; 1,3-propanodiol; etileno; glicerol; un plástico; una sustancia química de especialidad; un ácido orgánico, incluyendo ácido cítrico, ácido succínico y ácido maleico; un disolvente; un suplemento de piensos para animales; una sustancia farmacéutica tal como un antibiótico  $\beta$ -lactámico o una cefalosporina; una vitamina; un aminoácido, tal como lisina, metionina, triptófano, treonina, y ácido aspártico; una enzima, tal como proteasa, una celulasa, una amilasa, una glucanasa, una lactasa, una lipasa, una liasa, una oxidorreductasa, una transferasa o una xilanasas; una materia prima química; o un suplemento de piensos para animales.

#### Separación de producto de fermentación

El procedimiento comprende opcionalmente recuperar un producto de fermentación. Un producto de fermentación se puede separar del caldo de fermentación de cualquier manera conocida. Para cada producto de fermentación, la persona experta será capaz así de seleccionar una técnica de separación apropiada. Por ejemplo, el etanol se puede separar del caldo de fermentación de levadura mediante destilación, por ejemplo mediante destilación a vapor/destilación a vacío, de manera convencional.

#### Reciclaje de la enzima tras la hidrólisis con enzimas estables

Al final de la hidrólisis, las actividades enzimáticas parecen ser bajas, puesto que se liberan azúcares poco reductores una vez que se convierte casi toda la celulosa. Sin embargo, la cantidad de actividad enzimática presente ha disminuido solamente un poco, suponiendo que es debido principalmente a la absorción de las enzimas al sustrato. Aplicando la separación sólido-líquido tras la hidrólisis, tal como centrifugación, filtración, sedimentación, etcétera, 60% o más, por ejemplo 70%, de la actividad enzimática en disolución se puede reconvertir y reusar para la licuefacción o hidrólisis de una nueva materia prima lignocelulósica pretratada, durante la siguiente hidrólisis.

Además, tras la separación sólido-líquido, la enzima en disolución se puede separar de la disolución que contiene azúcares reductores y otros productos de hidrólisis procedentes de las acciones enzimáticas. Esta separación se puede realizar mediante, pero sin limitarse a, (ultra y micro)filtración, centrifugación, sedimentación, con o sin una primera adsorción de la enzima a un portador de cualquier tipo.

Por ejemplo, tras la hidrólisis de la materia prima pretratada con 0,175 ml de carga enzimática/g de materia seca de materia prima, durante 20 h, se libera el 50% de la cantidad máxima teórica de azúcares reductores, y tras la misma hidrólisis durante 72 h, se libera el 90% de la cantidad máxima teórica de azúcares reductores. Mediante centrifugación y ultrafiltración, se recuperó el 60-70% de la actividad enzimática como retentato, mientras que el filtrado contenía más de 80% de los azúcares reductores liberados. Reutilizando el retentato, ya sea como tal o tras la purificación y/o concentración posteriores, la dosis de enzima durante la siguiente etapa de hidrólisis se puede reducir con 60-70%. La reducción de costes lograda usando enzimas celulolíticas estables, tales como de *Talaromyces*, resulta de este modo de una menor necesidad de dosis de enzima.

#### Reciclaje de la enzima tras la licuefacción con enzimas estables

Al final de la licuefacción, las enzimas usadas en la licuefacción se pueden reciclar de forma similar a como se describe aquí anteriormente para el reciclaje tras la hidrólisis (licuefacción y sacarificación).

Reciclaje de la enzima tras la hidrólisis en combinación con la producción de enzima y reciclaje de células de levadura con enzimas estables

El procedimiento que incluye el reciclaje de la enzima tras la hidrólisis, como se describe anteriormente, se puede combinar con el reciclaje del microorganismo productor de etanol tras la fermentación, y con el uso del filtrado que contiene azúcares reductores como sustrato (purificado y/o concentrado o diluido) en la fermentación de la producción de enzima y como sustrato para el cultivo del microorganismo productor de etanol.

#### Reciclaje de la enzima tras la destilación a vacío con enzimas estables

La termoestabilidad de las enzimas, como aquellas procedentes de *Talaromyces*, provoca que siga habiendo actividad celulolítica tras la hidrólisis, fermentación y destilación a vacío en la fracción líquida producida tras la centrifugación de los fondos de las operaciones de rectificación y destilación del etanol. La actividad total de la enzima se reduce durante las tres etapas del procedimiento sucesivas con 10-15 unidades de sustrato por g de materia seca de materia prima, independientemente de la dosis inicial de enzima. La fracción líquida obtenida tras la destilación a vacío se puede así reusar como una fuente de enzima para un nuevo ciclo del procedimiento de hidrólisis-fermentación-destilación iniciado nuevamente de conversión en etanol de paja de trigo pretratada. La fracción líquida se puede usar ya sea en forma concentrada o (sin) diluir y/o purificada, y con o sin suplementación adicional de enzima. La fracción líquida, opcionalmente purificada, se puede reutilizar para la licuefacción o hidrólisis de material celulósico.

La invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención.

## Ejemplos

### Materiales y métodos

#### Determinación de la viscosidad

- 5 Las medidas de RVA (Rapid ViscoAnalyser) se llevaron a cabo usando el analizador de viscosidad rápido Newport RVA-4, equipado con una paleta de plástico (véase: D. L. Goode et al, Journal of the Institute of Brewing, Vol. 111, No. 2, 2005).

#### Enzimas

La composición de celulasa TEC-210 se hizo fermentar según los procedimientos de inoculación y fermentación descritos en el documento WO2011/000949.

- 10 La cepa de *Rasamsonia (Talaromyces) emersonii* se depositó en CENTRAAL BUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES, Uppsalalaan 8, P.O. Box 85167, NL-3508 AD Utrecht, Países Bajos en diciembre de 1964, que tiene el número de acceso CBS 393.64. Para mostrar el efecto y las ventajas de la invención, en los presentes ejemplos se pueden usar igualmente otras cepas adecuadas. Por ejemplo, TEC-101, TEC-147, TEC-192, TEC-201 o TEC-210 son cepas adecuadas de *Rasamsonia*, que se describen en el documento WO2011/000949.

- 15 La endoglucanasa (EG) se produce mediante sobreexpresión de EBA8 en *Aspergillus niger*, como se describe en el documento WO2011/098577, seguido de la fermentación del transformante de *Aspergillus niger*. EBA8 es una endoglucanasa de *Rasamsoniaemersonii (Talaromycesemersonii)*, y se identifica en el documento WO2011/098577 como *T. emersonii* beta-glucanasa CEA (EG), y se representa mediante SEQ ID NO: 3 en el documento WO2011/098577.

- 20 Preparación de sustrato de rastrojo de maíz pretratado con ácido.

El rastrojo de maíz pretratado con ácido diluido (aCS) se obtuvo como se describió en Schell, D.J., Applied Biochemistry and Biotechnology (2003), vol. 105-108, p. 69-85. Se usó un reactor de pretratamiento a escala piloto que opera en unas condiciones de estado estacionario de 190°C, un tiempo de residencia de 1 min., y una concentración efectiva de ácido H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 1,45% (p/p) en la fase líquida.

### 25 Ejemplo 1

Efecto de la endoglucanasa durante la hidrólisis de la materia prima lignocelulósica

- 30 El efecto de la endoglucanasa durante la hidrólisis de la materia prima de lignocelulosa se describe según los procedimientos descritos más abajo. Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo con materia prima de rastrojo de maíz pretratado con ácido (aCS). El pH de la materia prima se ajustó a pH 4,5 con una disolución de NaOH 4M. La reacción de hidrólisis se llevó a cabo en dos etapas:

1. Una etapa de licuefacción, que funciona en un modo semicontinuo.
2. Una etapa de sacarificación, que funciona en modo discontinuo.

- 35 La licuefacción se llevó a cabo como sigue: se llenó un reactor de licuefacción con 1 kg de materia prima de rastrojo de maíz pretratada al 10% (p/p). El reactor se hizo funcionar con agitación constante, con control de pH (pH 4,5, NaOH 4N) y 62°C. Directamente tras el llenado, la enzima se dosificó (véase la Tabla 1) para comenzar la reacción de hidrólisis. A continuación, cada 10 minutos se añadió una cantidad adicional de 55 g de materia prima de 30% de materia seca al reactor de licuefacción con purgado constante del contenido del reactor, a fin de mantener constante el nivel de llenado del reactor en 1 litro. Además, se dosificó enzima extra junto con la materia prima adicional, para mantener una relación constante de enzima/sustrato durante la reacción. Después de alrededor de 3 horas, se alcanzó en el reactor un nivel de materia seca de alrededor de 20% (p/p), y la materia seca de la materia prima a añadir se redujo hasta 20% (p/p), para mantener el nivel de materia seca en el reactor en alrededor de 20% (p/p). 6 horas después del comienzo de la licuefacción, el purgado del reactor de licuefacción se introdujo en un reactor de sacarificación, para el procesamiento posterior. El tiempo de residencia en el reactor de licuefacción fue, de media, alrededor de 3 horas.

- 45 La sacarificación se llevó a cabo como sigue: se llenó un reactor de sacarificación con el purgado procedente del reactor de licuefacción, hasta un volumen de reacción total de alrededor de 1 litro. Esto tardó alrededor de 3 horas. El reactor se hizo funcionar con agitación constante, con control de pH (pH 4,5, NaOH 4N) y 62°C. Durante el llenado, la enzima se añadió simultáneamente en uno de los experimentos como se visualiza en la Tabla 1. La reacción de sacarificación se llevó a cabo durante alrededor de 70 horas.

50

Tabla 1: Esquema de dosificación de la enzima

Experimento	Licuefacción		Sacarificación	
	Endoglucanasa	Cóctel de celulasas	Endoglucanasa	Cóctel de celulasas
1	1 mg/g	-	-	4 mg/g
2	1 mg/g	4 mg/g	-	-

- Cóctel de celulasas: TEC-210

- Endoglucanasa: EBA8

- 5 • Dosis de enzima: mg de proteína de TCA por gramo de materia seca de materia prima

Tras la hidrólisis, las muestras se enfriaron en hielo, e inmediatamente se diluyeron 50 µl de cada sobrenadante en 1450 µl de agua grado I. El sobrenadante diluido se filtró subsiguientemente (filtro de 0,45 µm, Pall PN 454), y los filtrados se analizaron para determinar el contenido de azúcar como se describe más abajo.

- 10 Las concentraciones de azúcar de las muestras diluidas se midieron usando un HPLC equipado con una columna Aminex HPX-87P (Biorad #1250098) mediante elución con agua a 85°C a un caudal de 0,6 ml por minuto, y se cuantificaron mediante integración de las señales de glucosa a partir de la detección del índice de refracción (R.I.) calibradas con disoluciones patrón de glucosa.

- 15 Los datos presentados en la Figura 1 muestran que la liberación de glucosa a partir de la materia prima pretratada con endoglucanasa es más rápida, y da como resultado un mayor nivel (por ejemplo tras 72 horas) que la glucosa liberada a partir de la materia prima en la que la endoglucanasa y el cóctel de enzimas de celulasas TEC-210 se añadieron al mismo tiempo.

En base a estos resultados, se concluyó que la licuefacción de la materia prima de lignocelulosa con una composición enzimática que contiene endoglucanasa mejora el comportamiento celulolítico de mezclas de celulasas.

### Ejemplo 2

- 20 Efecto de la endoglucanasa en la etapa de licuefacción

Muestras de materia prima pretratada con 20% de materia seca (rastroyo de maíz pretratado con ácido) de pH 4,5 en agua se precalentaron a 62°C en el Newport RVA-4 durante una hora a una velocidad de agitación lenta. La enzima se añadió en el tiempo = 0 de la medida, y la disminución de la viscosidad se registró a 62°C durante las dos horas siguientes, y se registró mediante un ordenador adjunto.

- 25 Los resultados presentados en la Tabla 2 muestran que EG (EBA8) mejoró la reducción de viscosidad para el sustrato biomásico, así como también que se puede usar un procedimiento de comienzo por lotes para comenzar el procedimiento de la invención.

Tabla 2

	Tiempo cuando se alcanzan 4000 cP (s)	Tiempo cuando se alcanzan 2000 cP (s)	Tiempo cuando se alcanzan 1000 cP (s)	Tiempo cuando se alcanzan 500 cP (s)
1,0 mg TEC-210 / g TS		3000	4000	
(0,5 mg TEC-210 + 0,5 mg EG) / g TS		500	2500	3620
2,0 mg TEC-210 / g TS	500	2000		
(1,0 mg TEC-210 + 1,0 mg EG) / g TS	100	400		

- 30 **Ejemplo 3**

Efecto de la temperatura sobre la licuefacción de la materia prima lignocelulósica

El efecto de la temperatura sobre la licuefacción de la materia prima lignocelulósica mediante endoglucanasa se demuestra mediante este experimento. Los experimentos de licuefacción se llevaron a cabo usando materia prima de rastroyo de maíz pretratada con ácido (aCS) obtenida de NREL (National Renewable Energy Laboratory).

## ES 2 738 514 T3

Muestras de materia prima pretratada con 24% de materia seca de pH 4,5 en agua se precalentaron en el Newport RVA-4 durante una hora a una velocidad de agitación lenta. Se añadió enzima (0,2 mg de EG [EBA8] por gramo de materia seca) en el tiempo = 0 de la medida, y la disminución de la viscosidad se registró durante los 60 minutos sucesivos, y se registró mediante un ordenador adjunto. Las incubaciones se llevaron a cabo a 62, 70 y 75°C.

- 5 Los resultados presentados en la Figura 2 muestran que EG (EBA8) puede licuar materia prima lignocelulósica a temperaturas de hasta 75°C, y que mayores temperaturas dan como resultado una menor viscosidad.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la hidrólisis de biomasa que contiene celulosa, que comprende
- una etapa de licuefacción en la que se añade una primera enzima o una primera composición enzimática para licuar al menos parte de los sólidos presentes en la biomasa y obtener un factor de reducción de la viscosidad de al menos 2 en la etapa de licuefacción; seguido de
  - una etapa de sacarificación, en la que se añade una segunda composición enzimática para formar azúcares oligoméricos y/o monoméricos; y
- en el que la primera enzima o primera composición enzimática es diferente de la segunda composición enzimática;
- en el que la primera enzima o primera composición enzimática comprende una endoglucanasa;
- en el que la segunda composición enzimática comprende una celulasa; y
- en el que la primera enzima o primera composición enzimática comprende más endoglucanasa que la segunda composición enzimática (expresado en % en peso de proteína),
- en el que el contenido de materia seca en la etapa de licuefacción es 15% en peso o mayor,
- en el que la etapa de licuefacción se lleva a cabo a una temperatura de 60°C o más, y
- en el que la etapa de sacarificación se lleva a cabo a una temperatura de 60°C o más.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de licuefacción tiene lugar en un reactor (reactor de licuefacción) que tiene un volumen más pequeño que el volumen del reactor (reactor de sacarificación) en el que tiene lugar la etapa de sacarificación
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que la relación del volumen del reactor de licuefacción al volumen del reactor de sacarificación está entre 1:2 y 1:50.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el reactor de licuefacción y/o el reactor de sacarificación tienen un volumen de más de 1 m<sup>3</sup>.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la segunda composición enzimática comprende al menos dos celobiohidrolasas diferentes, y opcionalmente una beta-glucosidasa y/o GH61.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que, en la etapa de licuefacción o en el reactor de licuefacción, se añade menos enzima (sobre materia seca proteica) por volumen de reactor que en la etapa en la que se forma el azúcar oligomérico y/o monomérico o en el reactor de hidrólisis del azúcar monomérico.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la primera enzima o primera composición enzimática y/o la segunda enzima o segunda composición enzimática comprenden una enzima termoestable.
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la etapa de licuefacción se realiza en modo discontinuo alimentado, semicontinuo, o continuo.
9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la etapa de licuefacción se realiza en modo discontinuo alimentado, semicontinuo, o continuo.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el contenido de materia seca en la etapa de licuefacción es 20% en peso o mayor.
11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la etapa de licuefacción se realiza a una temperatura de 65°C o más.
12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el tiempo de licuefacción es 10 horas o menos.
13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el tiempo de sacarificación es 40 horas o más.
14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende además una etapa de fermentación.
15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que la fermentación se realiza con un microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar de C5.

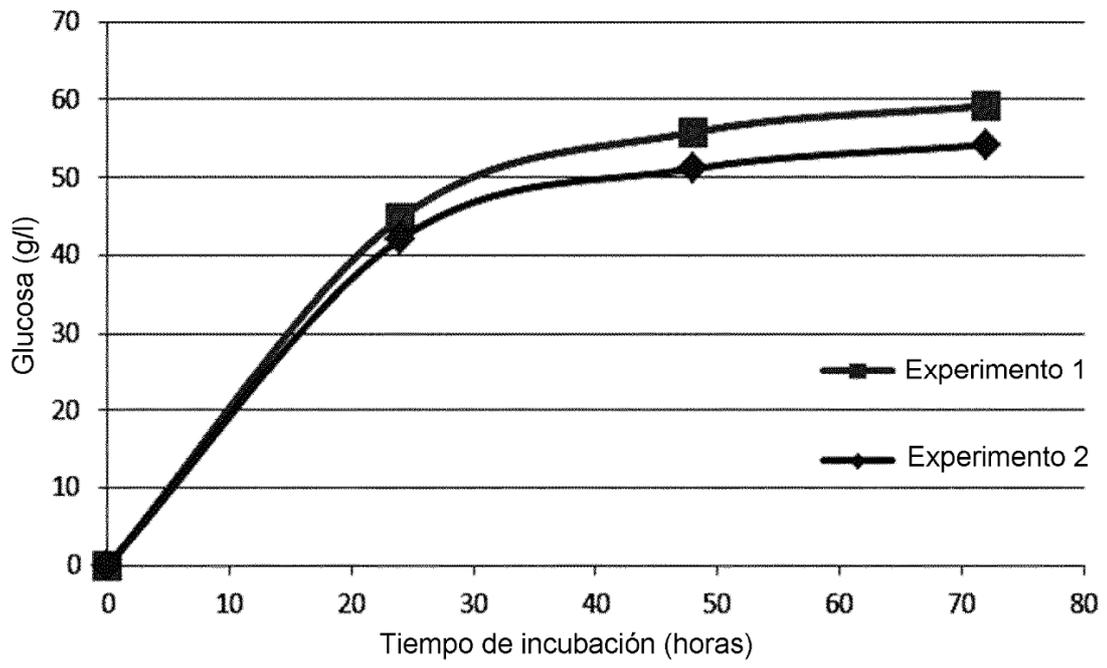


Fig.1

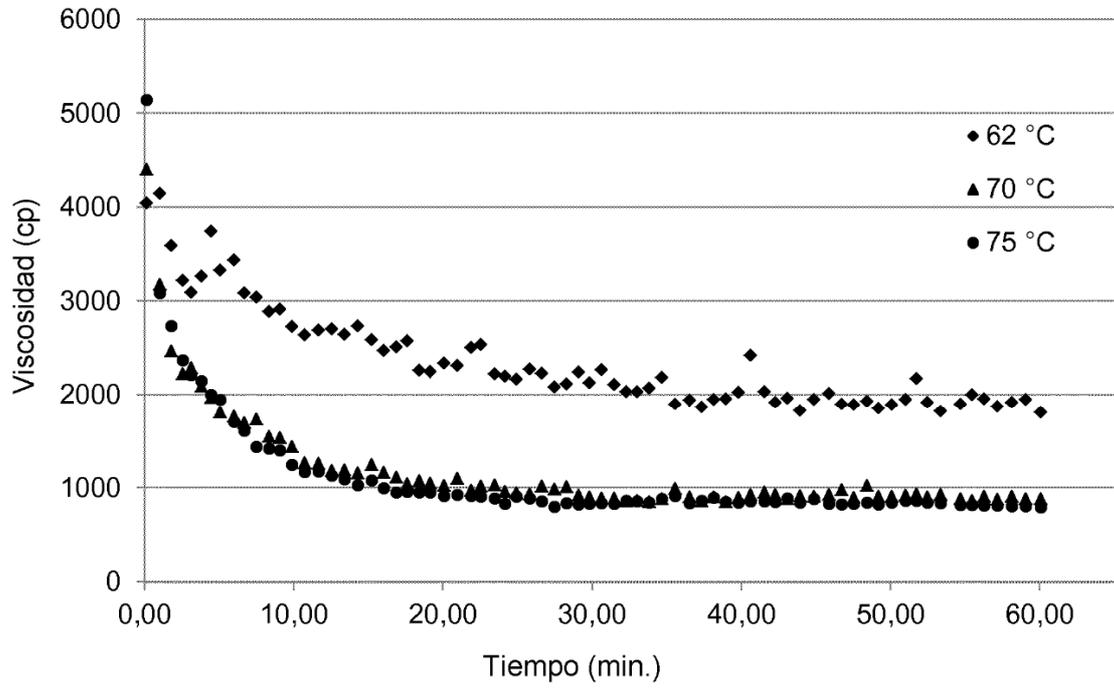


Fig. 2