

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 754**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2013 PCT/EP2013/073250**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14072390**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2013 E 13792865 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2917359**

54 Título: **Procedimiento para la hidrólisis enzimática de material lignocelulósico mediante el uso de oxígeno**

30 Prioridad:

09.11.2012 EP 12191957

02.07.2013 EP 13174656

15.07.2013 EP 13176500

17.09.2013 EP 13184702

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.03.2020

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

Het Overloon 1

6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

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 2 745 754 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 mediante el uso de oxígeno

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un procedimiento para la hidrólisis enzimática de material lignocelulósico con un alto contenido en materia seca, 10-33% en peso, mediante el uso de oxígeno.

Antecedentes de la invención

10 El material vegetal lignocelulósico, en este documento también denominado material de alimentación, es una fuente renovable de energía en forma de azúcares que se pueden convertir en productos valiosos, p. ej., azúcares o biocombustible, tal como el bioetanol. Durante este proceso, (ligno o hemi)-celulosa presente en el material de alimentación, tal como la cascarilla de trigo, rastrojo de maíz, la cascarilla de arroz, etc., se convierte en azúcares reductores mediante enzimas (hemi)-celulolíticas, que luego se convierten opcionalmente en valiosos productos, tales como el etanol, por microorganismos tales 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 material de alimentación no tratado produce azúcares < 20% de la cantidad teórica. Al aplicar un pretratamiento químico y termofísico, la (hemi)-celulosa es más accesible para las enzimas (hemi)-celulolíticas y, por lo tanto, las conversiones son más rápidas y con mayores rendimientos.

20 Un rendimiento de etanol típico a partir de glucosa, derivado de rastrojo de maíz pre-tratado, es de 40 galones (152 litros) de etanol por cada 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 y A. Whipkey (eds.) ASHS Press, Alexandria, VA) o 0,3 g de etanol por g de material de alimentación. El rendimiento máximo de etanol sobre la base de celulosa es aproximadamente del 90%.

25 Las enzimas celulolíticas - la mayoría de ellas son producidas por especies tales como *Trichoderma*, *Humicola* y *Aspergillus* - se utilizan comercialmente para convertir material de alimentación pre-tratado en un puré que contiene (hemi)celulosa insoluble, azúcares reductores hechos a partir de la misma y lignina. Las enzimas celulolíticas termoestables derivadas de *Rasamsonia* se han utilizado para degradar el material de alimentación lignocelulósico y estas enzimas son conocidas por su termoestabilidad, véase el documento WO2007091231. El puré producido se utiliza en una fermentación durante la cual los azúcares reductores se convierten en biomasa (células) de levadura, dióxido de carbono y etanol. El etanol producido de esta manera se denomina bioetanol.

30 La producción común de azúcares a partir de material de alimentación lignocelulósico pre-tratado, la hidrólisis también denominada licuefacción, pre-sacarificación o sacarificación, tiene lugar típicamente durante un proceso que dura de 6 a 168 horas (Kumar, S., Chem. Eng. Technol. 32 (2009) 517-526) a temperaturas elevadas de 45 a 50°C y en condiciones no estériles. Durante esta hidrólisis, la celulosa presente se convierte en parte (típicamente 30 a 95%, dependiendo de la actividad enzimática y de las condiciones de hidrólisis) en azúcares reductores. En el caso de inhibición de enzimas por compuestos presentes en el material de alimentación pre-tratado y por azúcares liberados; y para minimizar la inactivación térmica, este período de temperatura elevada se minimiza tanto como sea posible.

40 La fermentación después de la hidrólisis tiene lugar en una etapa del proceso preferiblemente anaerobio separada, ya sea en el mismo o en un recipiente diferente, en el que se ajusta la temperatura a 30 a 33°C (proceso mesófilo) para acomodar el crecimiento y la producción de etanol por biomasa microbiana, comúnmente levaduras. Durante este proceso de fermentación, el material (hemi)celulósico restante se convierte en azúcares reductores por parte de las enzimas ya presentes en la etapa de hidrólisis, mientras que se producen biomasa microbiana y etanol. La fermentación finaliza 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. Esto puede prolongarse hasta 6 días. En general, el tiempo total del proceso de hidrólisis y fermentación puede ser de hasta 13 días.

45 El mosto fermentado, así obtenido, consiste en azúcares no fermentables, material (hemi)celulósico no hidrolizable, lignina, células microbianas (células de levadura más común), agua, etanol, dióxido de carbono disuelto. Durante las etapas sucesivas, el etanol se destila a partir del puré y se purifica aún más. La suspensión sólida restante se seca y se utiliza, por ejemplo, para quemar combustible, fertilizante o pienso para el ganado.

El documento WO2010080407 sugiere tratar el material celulósico con una composición de celulasa en condiciones anaerobias. La separación o exclusión de especies reactivas de oxígeno puede mejorar el comportamiento de los sistemas de enzimas hidrolizantes de celulosa. La hidrólisis de material celulósico, p. ej., lignocelulosa, por una composición enzimática puede reducirse por daño oxidativo a componentes de la composición enzimática y/u la oxidación del material celulósico, por ejemplo, por parte de oxígeno molecular.

El documento WO2009046538 describe un método para tratar materiales vegetales de material de alimentación lignocelulósico para liberar azúcares fermentables utilizando un proceso de hidrólisis enzimática para tratar los materiales realizado en vacío y producir una corriente del proceso rica en azúcares que comprende cantidades reducidas de azúcares volátiles/compuestos inhibidores de la fermentación, tales como furfural y ácido acético. Además de separar compuestos inhibidores volátiles, otros compuestos y/o moléculas que también se separan incluyen nitrógeno, oxígeno, argón y dióxido de carbono.

Podkaminer et al., *Biotechnology for Biofuels* 5 (2012) 43-51, discuten el papel de GH61 en tSSWF; Cannella et al., *Biotechnology for Biofuels* 5 (2012) 26-35, discuten la producción de ácidos aldónicos durante la hidrólisis enzimática de lignocelulosa con alto contenido en materia seca; y Cannella et al, *Biotechnology and Bioengineering* 111 (septiembre de 2013, en línea) 59-68 discuten nuevas preparaciones de enzimas celulolíticas para la producción de etanol lignocelulósico con alto contenido en sólidos. Además, loelovich et al. *Bioresources* 7 (2012) 4672-4682 discuten la hidrólisis enzimática con un aumento de la carga de sólidos.

Con cada lote de material de alimentación, se añaden enzimas para maximizar el rendimiento y la tasa de azúcares fermentables liberados del material de alimentación lignocelulósico pretratada durante el tiempo del proceso dado. En general, los costos para la producción de enzimas, los rendimientos del material de alimentación para el etanol y las inversiones son los principales factores de costo en los costos generales de producción (Kumar, S. *Chem. Eng. Technol.* 32 (2009) 517-526). Hasta ahora, el costo de la reducción del uso de enzimas se logra mediante la aplicación de productos enzimáticos de una sola fuente o de múltiples fuentes microbianas (documento WO 2008/008793) con una actividad hidrolítica más amplia y/o más alta (específica), cuyo uso apunta a una menor necesidad de enzimas, tasas de conversión más rápidas y/o rendimientos de conversión más altos y, por lo tanto, a costos de producción de bioetanol en general más bajos. Esto requiere grandes inversiones en investigación y desarrollo de estos productos enzimáticos. En el caso de un producto enzimático compuesto por enzimas de múltiples fuentes microbianas, se necesitan grandes inversiones de capital para la producción de cada uno de los compuestos enzimáticos individuales.

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

Sumario de la invención

Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar un procedimiento, en el que la etapa de hidrólisis se realice en condiciones mejoradas. Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento que implique hidrólisis y que tenga un tiempo de proceso reducido. Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento, en el que la dosificación de enzima puede reducirse y al mismo tiempo la producción de producto de hidrólisis útil se mantiene al mismo nivel o incluso aumenta. Otro objeto es proporcionar un procedimiento que implique hidrólisis, en el que se optimicen las condiciones del proceso de la hidrólisis. Todavía otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento que implique hidrólisis, en el que la producción de producto de hidrólisis útil se incrementa utilizando la misma dosis de enzima. Uno o más de estos objetos se alcanzan de acuerdo con la invención.

La presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de un producto de azúcar a partir de material lignocelulósico, que comprende las siguientes etapas:

- a) opcionalmente, pretratamiento del material lignocelulósico;
- b) opcionalmente, lavar el material lignocelulósico opcionalmente pre-tratado;
- c) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pre-tratado utilizando una composición enzimática que comprende al menos dos celulasas y en donde la composición enzimática comprende al menos GH61; y
- d) opcionalmente recuperación de un producto de azúcar;

en el que durante la etapa de hidrólisis enzimática (c) se añade oxígeno al material lignocelulósico, el reactor para la hidrólisis enzimática tiene un volumen de 1 m³ o más y el contenido de materia seca en la etapa de hidrólisis (c) es de 10 a 33% en peso.

Además, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de un producto de fermentación a partir de material lignocelulósico, que comprende las siguientes etapas:

- a) opcionalmente, pretratamiento del material lignocelulósico;
- b) opcionalmente, lavar el material lignocelulósico opcionalmente pre-tratado;

c) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/o pre-tratado, opcionalmente utilizando una composición enzimática que comprende al menos dos celulasas y en donde la composición enzimática comprende al menos GH61;

d) fermentación del material lignocelulósico hidrolizado para producir un producto de fermentación; y

5 e) opcionalmente, recuperación de un producto de fermentación;

en el que durante la etapa de hidrólisis enzimática (c) se añade oxígeno al material lignocelulósico, el reactor para la hidrólisis enzimática tiene un volumen de 1 m³ o más y el contenido de materia seca en la etapa de hidrólisis (c) es de 10 a 33% en peso.

En una realización preferida, el oxígeno se añade en forma de burbujas (en estado gaseoso).

10 Sorprendentemente, de acuerdo con la invención, mediante la adición de oxígeno es posible lograr muchas ventajas del procedimiento, que incluyen condiciones de temperatura óptimas, tiempo de proceso reducido, dosificación reducida de enzima, reutilización de enzimas, mayores rendimientos y otras optimizaciones del procedimiento, resultando costos reducidos.

15 En una realización de este procedimiento, el tiempo de fermentación es de 5 a 120 horas. En una realización, la composición enzimática estable utilizada conserva la actividad durante 30 horas o más. De acuerdo con una realización adicional, la hidrólisis se realiza preferiblemente a una temperatura de 45°C o más, más preferiblemente a una temperatura de 50°C o más y aún más preferiblemente a una temperatura de 55°C o más. En una realización preferida, las enzimas se derivan de un hongo, preferiblemente un microorganismo del género *Rasamsonia*, o la composición enzimática comprende una enzima fúngica, preferiblemente una enzima *Rasamsonia*.

20 **Breve descripción de las figuras.**

Fig. 1: El efecto de rociar nitrógeno o aire a través de un material de alimentación de aCS al 10% antes de la hidrólisis, sobre la cantidad total de glucosa (g/l) liberada por la mezcla TEC-210 (1), la mezcla 4E-GH61 (2) y la mezcla 4E-EG (3); para TEC-210, véase el documento WO 2011/000949.

25 Fig. 2: La hidrólisis enzimática en un reactor de 270 litros (escala de planta piloto) mediante el cual la conversión de glucano (%) se muestra en aCS al 20% como función del tiempo de proceso (horas) para 3,75 mg de TEC-210/g de material de alimentación DM para DO baja (—□—) y DO alta (—■—)

Fig. 3: El efecto de la concentración de oxígeno disuelto (DO) en la hidrólisis de glucano en el material de alimentación lignocelulósico pretratada como función del tiempo de hidrólisis para 2.5 mg/g de enzima y DO = 0,030 mol/m³ (—◆—) y 3,5 mg/g de enzima y DO = 0,005 mol/m³ (—■—).

30 **Descripción detallada de la invención**

A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las palabras "comprenden" e "incluyen" y variaciones, tales como "comprende", "que comprende", "incluye" y "que incluye" se han de interpretar de forma inclusiva. Es decir, estas palabras pretenden transmitir la posible inclusión de otros elementos o números enteros no específicamente reseñados, donde el contexto lo permita. Los artículos "un" y "una" se utilizan en esta memoria para referirse a uno o más de uno (es decir, a uno o al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" puede significar un elemento o más de un elemento.

35 En el contexto de la presente invención "mejorado", "incrementado", "reducido" se utiliza para indicar que la presente invención muestra una ventaja en comparación con la misma situación, procedimiento o condiciones de procedimiento, excepto que no se añade oxígeno extra. Dentro del contexto de la presente invención, "medido en las mismas condiciones" o "analizado en las mismas condiciones", etc. significa que el procedimiento de la invención y el mismo procedimiento sin la adición de oxígeno se realizan en las mismas condiciones (excepto la adición de oxígeno) y que los resultados del presente procedimiento, si se comparan con el procedimiento sin la adición de oxígeno, se miden utilizando las mismas condiciones, preferiblemente utilizando el mismo ensayo y/o la misma metodología, más preferiblemente dentro del mismo experimento o en paralelo. Las condiciones de la hidrólisis son un ejemplo de este tipo de condiciones.

40 En la técnica anterior se sugiere mejorar la hidrólisis de material celulolítico utilizando condiciones anaerobias (documento WO2010/080407) o de vacío (documento WO2009/046538) durante la hidrólisis enzimática. En los procedimientos de ambos documentos, el nivel de oxígeno disminuyó. Se ha encontrado ahora, sorprendentemente, que la hidrólisis de la presente invención muestra resultados en un producto de reacción mejorado que proporciona mayores cantidades de productos de azúcar (reducidos) y/o productos de fermentación deseados en la fermentación después de la hidrólisis en comparación con un procedimiento en el que no se añade oxígeno. En general, se observa un aumento de la conversión de glucosa de 5 a 15% p/p.

El oxígeno se puede añadir de varias maneras. Por ejemplo, el oxígeno se puede añadir como gas oxígeno, gas enriquecido con oxígeno, tal como aire enriquecido con oxígeno o aire. El oxígeno se puede añadir continuamente o de forma discontinua. Por "se añade" oxígeno se entiende que se añade oxígeno a la fase líquida (que comprende el material lignocelulósico) en el reactor de hidrólisis y no que el oxígeno esté presente en el espacio de cabeza del reactor por encima de la fase líquida, con lo que el oxígeno tiene que difundirse desde el espacio de cabeza a la fase líquida. Entonces, preferiblemente, el oxígeno se añade en forma de burbujas, lo más preferiblemente en forma de pequeñas burbujas.

En caso de que la enzima puede ser dañada por la presencia o adición de oxígeno, se puede utilizar el suministro más suave de oxígeno. En ese caso, se puede encontrar un equilibrio entre la producción mejorada de glucosa y el comportamiento de la enzima. La adición del oxígeno al material lignocelulósico se realiza durante la hidrólisis enzimática. En caso de que se añada oxígeno en forma gaseosa, se puede introducir gas que contiene oxígeno, por ejemplo soplando, en el contenido del reactor de hidrólisis líquida del material celulolítico. En otra realización de la invención, la fase gaseosa presente en la parte superior del reactor (espacio de cabeza) se renueva continuamente o de forma discontinua con el gas que contiene oxígeno. En este último caso, es necesario mezclar o agitar (vigorosamente) para obtener el oxígeno en forma de burbujas y/o por difusión en el contenido líquido del reactor, preferiblemente en combinación con sobrepresión en el reactor. En general, purgar el espacio de cabeza con aire en combinación con una mezcladura o agitación (vigorosa) puede introducir suficiente oxígeno en el material celulósico en el reactor de hidrólisis para reactores de hasta un tamaño de 1 m³. A mayor escala, como en el procedimiento de la invención, por ejemplo en un reactor de 50 m³ o más, por ejemplo 100 m³, se necesita tanta energía para una agitación vigorosa que desde el punto de vista económico esto no se aplicará en un procedimiento comercialmente operativo.

De acuerdo con la presente invención, el oxígeno se añade durante parte de la etapa de hidrólisis, o durante toda la etapa de hidrólisis. Ventajosamente, el oxígeno se añade durante la primera mitad del tiempo de la etapa de hidrólisis. La adición de oxígeno durante solo una parte de la hidrólisis se puede hacer, por ejemplo, en caso de que se produzca un daño por oxidación de la o las enzimas. En caso de que el oxígeno presente en el contenido del reactor de hidrólisis o el producto de azúcar o el hidrolizado formado en la etapa de hidrólisis pueda influir o perturbar en la etapa de fermentación posterior, se puede realizar la adición de oxígeno, excepto la última parte de la hidrólisis y, por lo tanto, (la mayoría del) oxígeno se consume antes de que la biomasa hidrolizada ingrese en el reactor de fermentación.

En los Ejemplos se dan varios ejemplos de ventilación durante el proceso de hidrólisis enzimática para demostrar el efecto beneficioso de la presente invención. Este efecto beneficioso se encuentra para varios sustratos o materiales de alimentación y, por lo tanto, se cree que está presente para la hidrólisis de todo tipo de sustratos o materiales de alimentación.

En los Ejemplos se dan varios ejemplos de composiciones de enzimas para el proceso de hidrólisis enzimática para demostrar el efecto beneficioso de la presente invención. Este efecto beneficioso se encuentra para varias composiciones enzimáticas y, por lo tanto, se cree que está presente para todo tipo de composiciones enzimáticas hidrolizantes.

Para una forma de realización preferida adicional de la invención, la concentración de oxígeno en la fase líquida (DO), en donde el material lignocelulósico está presente durante la hidrólisis enzimática, es de al menos 0,001 mol/m³, preferiblemente de al menos 0,002 mol/m³, más preferiblemente al menos 0,003 mol/m³ e incluso más preferiblemente más de 0,01 mol/m³, por ejemplo más de 0,02 mol/m³ o 0,03 mol/m³. La mezcladura o agitación vigorosa a una escala de este tipo introduce parte de la fase gaseosa del espacio de cabeza en el líquido de reacción. Por ejemplo, la mezcladura o la agitación pueden crear un remolino que atrae oxígeno al líquido. En general, el purgar el espacio de cabeza con aire en combinación con una mezcladura o agitación (vigorosa) introducirá suficiente oxígeno en el material celulósico en el reactor de hidrólisis para reactores de hasta un tamaño de 1 m³. A mayor escala, como en el procedimiento de la invención, por ejemplo en un reactor de 50 m³ o más, por ejemplo 100 m³, se necesita tanta energía para una agitación vigorosa que desde el punto de vista económico esto no se aplicará en un procedimiento comercialmente operativo. En general, en reactores grandes, agitar o mezclar sin introducir aire u oxígeno dará como resultado valores de DO inferiores a 0,01 mol/m³.

En otra realización preferida de la invención, durante la generación de oxígeno o la producción de la concentración de oxígeno en la fase líquida (ventilación o adición de oxígeno), la concentración de oxígeno en la fase líquida en la que el material lignocelulósico está presente durante la hidrólisis enzimática, es preferiblemente como máximo el 80% de la concentración de saturación de oxígeno en las condiciones de reacción de hidrólisis, más preferiblemente como máximo 0,12 mol/m³, aún más preferiblemente como máximo 0,09 mol/m³, incluso más preferiblemente como máximo 0,06 mol/m³, incluso aún más preferiblemente como máximo 0,045 mol/m³ y lo más preferiblemente como máximo 0,03 mol/m³. La temperatura y la presión influirán en la DO. Los valores mol/m³ preferidos e ilustrativos

datos anteriormente se refieren a la presión atmosférica normal y a una temperatura de aproximadamente 62 °C. La persona experta en la técnica apreciará valores favorables de DO en base a las presentes enseñanzas.

La adición de oxígeno en forma de aire u otro gas que contiene oxígeno de acuerdo con el procedimiento de la invención también se puede utilizar para agitar o mezclar al menos parcialmente el contenido del reactor de hidrólisis. El presente procedimiento de la invención se muestra ventajas especialmente en la planta piloto y a escala industrial. El reactor de hidrólisis tiene un volumen de 1 m³ o más, preferiblemente de más de 10 m³ y lo más preferiblemente de 50 m³ o más. En general, el reactor de hidrólisis será más pequeño que 3000 m³ o 5000 m³. El autor de la invención plantea la teoría de que, especialmente a gran escala, no hay suficiente oxígeno disponible para la hidrólisis que podría deberse a limitaciones de transferencia de oxígeno en el reactor, por ejemplo, en la biomasa celulolítica. En experimentos a escala de laboratorio, esta insuficiencia de oxígeno puede desempeñar un papel menos importante. La relación del área superficial (o área de contacto de oxígeno del contenido del reactor) al volumen del reactor es más favorable para experimentos a pequeña escala que en experimentos a gran escala. Además, la mezclado en experimentos a pequeña escala es relativamente más fácil que a gran escala. Durante esos experimentos a pequeña escala, también el transporte de oxígeno desde el espacio de cabeza del reactor de hidrólisis es más rápido en comparación con la situación en experimentos a gran escala. Esta teoría solo se da como una posible explicación del efecto observado por los autores de la invención, y la presente invención no cae ni se mantiene con la exactitud de esta teoría. De acuerdo con otra realización de la invención, la adición de oxígeno puede utilizarse para controlar al menos parcialmente el proceso de hidrólisis.

El procedimiento de la invención se aplica ventajosamente en combinación con el uso de enzimas termoestables.

Una enzima "termoestable" significa que la enzima tiene una temperatura óptima de 60°C o superior, por ejemplo 70°C o superior, tal como 75°C o superior, por ejemplo 80°C o superior, tal como 85°C o superior. Por ejemplo, pueden aislarse de microorganismos termófilos, o pueden ser diseñadas por un experto y sintetizadas artificialmente. En una realización, los polinucleótidos pueden aislarse u obtenerse de hongos filamentosos termófilos o termotolerantes o pueden aislarse de hongos no termófilos o no termotolerantes, pero se encuentra que son termoestables. Por "hongo termófilo" se entiende un hongo que crece a una temperatura de 50°C o más. Por "hongos termotolerantes" se entiende un hongo que crece a una temperatura de 45°C o superior, con un máximo cercano a 50°C.

Ejemplos de cepas de hongos termófilos son *Rasamsonia emersonii* (anteriormente conocido como *Talaromyces emersonii*; *Talaromyces emersonii*; *Penicillium geosmithia emersonii* y *Rasamsonia emersonii* se utilizan indistintamente en esta memoria).

Células de hongos termófilos o termotolerantes adecuadas pueden ser una célula de *Humicola*, *Rhizomucor*, *Myceliophthora*, *Rasamsonia*, *Talaromyces*, *Thermomyces*, *Thermoascus* o *Thielavia*, preferiblemente una célula de *Rasamsonia emersonii*. Hongos termófilos o termotolerantes preferidos son *Humicola grisea* var. *thermoidea*, *Humicola lanuginosa*, *Myceliophthora thermophila*, *Papulaspora thermophila*, *Rasamsonia byssochlamydoides*, *Rasamsonia emersonii*, *Rasamsonia argillacea*, *Rasamsonia eburnean*, *Rasamsonia brevistipitata*, *Rasamsonia cylindrospora*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizomucor miehei*, *Talaromyces bacillisporus*, *Talaromyces leycettanus*, *Talaromyces thermophilus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thermoascus crustaceus*, *Thermoascus thermophilus* *Thermoascus aurantiacus* y *Thielavia terrestris*.

Los hongos termófilos no se limitan a un orden taxonómico específico y se dan en todo el árbol de la vida fúngica. Ejemplos son *Rhizomucor* en Mucorales, *Myceliophthora* en Sordariales y *Talaromyces*, *Thermomyces* y *Thermoascus* en Eurotiales (Mouchacca 1997). La mayoría de las especies de *Talaromyces* son mesófilas, pero las excepciones son especies dentro de las secciones *Emersonii* y *Thermophila*. La sección *Emersonii* incluye *Talaromyces emersonii*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Talaromyces bacillisporus* y *Talaromyces leycettanus*, todas las cuales crecen bien a 40°C. *Talaromyces bacillisporus* es termotolerante, *T. leycettanus* es termotolerante a termófilo y *T. emersonii* y *T. byssochlamydoides* son verdaderamente termófilos (Stolk y Samson 1972). El único miembro de la sección de *Talaromyces Thermophila*, *T. thermophilus*, crece rápidamente a 50°C (Evans y Stolk 1971; Evans 1971; Stolk y Samson 1972). La clasificación actual de estas especies termófilas de *Talaromyces* se basa principalmente en caracteres fenotípicos y fisiológicos, tales como su capacidad para crecer por encima de 40°C, color de ascosporas, la estructura del recubrimiento ascornatal y la formación de un determinado tipo de anamorfo. Stolk y Samson (1972) establecieron que los miembros de la sección *Emersonii* tienen anamorfos de *Paecilomyces* (*T. byssochlamydoides* y *T. leycettanus*) o de la serie *Penicillium cylindrosporum* (*T. emersonii* y *T. bacillisporus*). Más tarde, Pitt (1979) transfirió las especies pertenecientes a la serie *Penicillium cylindrosporum* al género *Geosmithia*, basándose en diversos caracteres, tales como la formación de conidios a partir de poros terminales en lugar de collula (cuellos), un carácter de *Penicillium* y *Paecilomyces*. Dentro del género *Geosmithia*, solo *G. argillacea* es termotolerante, y Stolk et al. (1969) y Evans (1971) propusieron una conexión con miembros de

Talaromyces sect. Emersonii. Se desconoce la relación filogenética de las especies de *Talaromyces* termófilas dentro de *Talaromyces* y *Trichocomaceae*. Véase J. Houbraken, Antonie van Leeuwenhoek febrero de 2012; 101 (2): 403-21.

5 *Rasamsonia* es un nuevo género que comprende especies termotolerantes y termófilas de *Talaromyces* y *Geosmithia* (J. Houbraken et al. *vida supra*). Basándose en 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. *Talaromyces emersonii*, *Penicillium geosmithia emersonii* y *Rasamsonia emersonii* se utilizan indistintamente en esta memoria.

10 Hongos termófilos preferidos son *Rasamsonia byssochlamydoides*, *Rasamsonia emersonii*, *Thermomyces lenuginosus*, *Talaromyces thermophilus*, *Thermoascus crustaceus*, *Thermoascus thermophilus* y *Thermoascus aurantiacus*.

15 "Hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (según se definen por Hawksworth et al., En, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido). Los hongos filamentosos se caracterizan por una pared micelial compuesta de quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y el catabolismo del carbono es obligatoriamente aerobio. Cepas de hongos filamentosos incluyen, pero no se limitan a las cepas de *Acremonium*, *Agaricus*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Geosmithia*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Panerochaete*, *Pleurotus*, *Rasamsonia*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thermomyces*, *Thielavia*, *Tolypocladium* y *Trichoderma*.

25 Varias cepas de hongos filamentosos son fácilmente accesibles al público en un cierto número de colecciones de cultivos, tales como American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL). Ejemplos de cepas de este tipo incluyen *Aspergillus niger* CBS 513.88, *Aspergillus oryzae* ATCC 20423, IFO 4177, ATCC 1011, ATCC 9576, ATCC 14488-14491, ATCC 11601, ATCC 12892, *P. chrysogenum* CBS 455.95, *Penicillium citrinum* ATCC 38065, *Penicillium chrysogenum* P2, *Talaromyces emersonii* CBS 393.64, *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225 o ATCC 48272, *Trichoderma reesei* ATCC 26921 o ATCC 56765 o ATCC 26921, *Aspergillus sojae* ATCC11906, *Chrysosporium lucknowense* C1, Garg 27K, VKM F-3500-D, ATCC44006 y sus derivados.

30 Una ventaja de la expresión y la producción de las enzimas (por ejemplo al menos dos, tres o cuatro celulasas diferentes) en un microorganismo adecuado puede ser un alto rendimiento de composición de enzima que se puede utilizar en el procedimiento de la presente invención.

35 De acuerdo con la invención, mediante la adición de oxígeno es posible alcanzar muchas ventajas de procedimiento, incluyendo las condiciones óptimas de temperatura, reducción del tiempo de procedimiento, la reducción de la dosis de enzima, el uso renovado de enzimas y otras optimizaciones del procedimiento, lo que resulta en costes reducidos. Ventajosamente, la invención proporciona un procedimiento en el que la etapa de hidrólisis se realiza en condiciones mejoradas. La invención también proporciona un procedimiento que implica hidrólisis que tiene un tiempo de procedimiento reducido. Además, la invención proporciona un procedimiento, en el que la dosificación de enzima puede reducirse y al mismo tiempo la producción de producto de hidrólisis útil se mantiene al mismo nivel.

40 Otra ventaja de la invención es que el presente procedimiento que implica hidrólisis puede dar como resultado condiciones de procedimiento que están optimizadas. Aún una ventaja adicional de la invención es que la producción de producto de hidrólisis útil del procedimiento que implica hidrólisis aumenta utilizando la misma dosis de enzima.

Composición enzimática estable

45 Composición enzimática estable en esta memoria significa que la composición enzimática conserva la actividad después de 30 horas de tiempo de reacción de hidrólisis, preferiblemente al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75 %, 80% 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de su actividad inicial después de 30 horas de tiempo de reacción de hidrólisis. Preferiblemente, la composición enzimática conserva la actividad después de 40, 50, 60, 70, 80, 90 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 horas de tiempo de reacción de hidrólisis.

50 La composición enzimática puede ser preparada por fermentación de un sustrato adecuado con un microorganismo adecuado, p. ej., *Rasamsonia emersonii* o *Aspergillus niger*, en donde la composición enzimática es producida por el microorganismo. El microorganismo puede alterarse para mejorar o hacer la composición de celulasas. Por ejemplo, el microorganismo puede mutar mediante procesos clásicos de mejora de la cepa o mediante técnicas de ADN

recombinante. Por lo tanto, los microorganismos mencionados en esta memoria pueden utilizarse como tales para producir la composición de celulasa o pueden alterarse para aumentar la producción o para producir una composición de celulasa alterada que podría incluir celulasas heterólogas, por lo tanto, enzimas que originalmente no son producidas por ese microorganismo. Preferiblemente se utiliza un hongo, más preferiblemente un hongo filamentoso para producir la composición de celulasa. Ventajosamente se utiliza un microorganismo termofílico o termotolerante. Opcionalmente se utiliza un sustrato que induce la expresión de las enzimas en la composición enzimática durante la producción de la composición enzimática.

La composición enzimática se utiliza para liberar los azúcares a partir de lignocelulosa, que comprende polisacáridos. Los principales polisacáridos son celulosa (glucanos), hemicelulosas (xilanos, heteroxilanos y xiloglucanos). Además, algo de hemicelulosa puede estar presente como glucomananos, por ejemplo en materiales de alimentación derivados de la madera. La hidrólisis enzimática de estos polisacáridos a azúcares solubles, incluidos monómeros y multímeros, por ejemplo, glucosa, celobiosa, xilosa, arabinosa, galactosa, fructosa, manosa, ramnosa, ribosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico y otras hexosas y pentosas se produce bajo la acción de diferentes enzimas que actúan en concierto. Por producto de azúcar se entiende el producto de hidrólisis enzimática del material de alimentación o material lignocelulósico. El producto de azúcar comprenderá azúcares solubles, que incluyen tanto monómeros como multímeros, preferiblemente comprenderá glucosa. Ejemplos de otros azúcares son celobiosa, xilosa, arabinosa, galactosa, fructosa, manosa, ramnosa, ribosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico y otras hexosas y pentosas. El producto de azúcar puede utilizarse como tal o puede procesarse adicionalmente, por ejemplo, purificarse.

Además, pectinas y otras sustancias pécticas, tales como arabinanos, puede constituir una proporción considerable de la masa seca de típicamente paredes celulares de tejidos vegetales no leñosos (aproximadamente un cuarto a la mitad de la masa seca puede ser pectinas).

La celulosa es un polisacárido lineal compuesto de residuos de glucosa enlazados por enlaces β -1,4. La naturaleza lineal de las fibras de celulosa, así como la estequiometría de la glucosa unida a β (con relación a α) genera estructuras más propensas a la unión de hidrógeno entre cadenas que las estructuras de almidón α -enlazadas altamente ramificadas. Por lo tanto, los polímeros de celulosa son generalmente menos solubles y forman fibras más fuertemente unidas que las fibras que se encuentran en el almidón.

Enzimas que son o pueden ser incluidos en la composición enzimática estable utilizada en la invención se describen ahora con más detalle:

GH61, endoglucanasas (EG) y exo-celobiohidrolasas (CBH) catalizan la hidrólisis de celulosa insoluble a productos tales como celo-oligosacáridos (celobiosa como un producto principal), mientras que las β -glucosidasas (BG) convierten los oligosacáridos, principalmente celobiosa y celotriosa, en glucosa. La familia GH61 también se conoce como la familia AA9 (familia de actividad auxiliar 9).

La hemicelulosa es un polímero complejo, y su composición varía a menudo ampliamente de un organismo a otro y de un tipo de tejido a otro. En general, un componente principal de hemicelulosa es xilosa β -1,4-enlazada, un azúcar de cinco carbonos. Sin embargo, esta xilosa a menudo se ramifica en 0 a 3 y/o 0 a 2 átomos de xilosa, y se puede sustituir con enlaces a arabinosa, galactosa, manosa, ácido glucurónico, ácido galacturónico o por esterificación a ácido acético (y esterificación de ácido ferúlico a arabinosa). La hemicelulosa también puede contener glucano, que es un término general para los azúcares de seis carbonos β -enlazados (tales como los β -(1,3)(1,4) glucanos y heteroglucanos mencionados anteriormente) y adicionalmente glucomananos (en los que tanto glucosa como manosa están presentes en la cadena principal lineal, unidos entre sí por enlaces β).

Xilanasas, junto con otras enzimas accesorias, por ejemplo α -L-arabinofuranosidasas, feruloil y acetilxilano esterases, glucuronidasas y β -xilosidasas) catalizan la hidrólisis de hemicelulosas.

Sustancias pécticas incluyen pectinas, arabinanos, galactanos y arabinogalactanos. Las pectinas son los polisacáridos más complejos en la pared de la célula vegetal. Se construyen alrededor de una cadena central de unidades de ácido D-galacturónico con enlaces α (1,4) intercaladas en algún grado con L-ramnosa. En cualquier pared celular existe un cierto número de unidades estructurales que se ajustan a esta descripción y generalmente se ha considerado que en una sola molécula péctica, las cadenas centrales de diferentes unidades estructurales son continuas entre sí.

Los principales tipos de unidad estructural son: galacturonano (homogalacturonano), que puede estar sustituido con metanol en el grupo carboxilo y acetato en O-2 y O-3; ramnogalacturonano I (RGI), en el que unidades de ácido galacturónico se alternan con unidades de ramnosa que portan cadenas laterales de galactano (1,4)-enlazadas y de arabinano (1,5)-enlazadas. Las cadenas laterales de arabinano pueden estar unidas directamente a ramnosa o

indirectamente a través de las cadenas de galactano; xilogalacturonano, con unidades individuales de xilosilo en O-3 de ácido galacturónico (estrechamente asociado con RGI); y ramnogalacturonano II (RGII), una unidad menor particularmente compleja que contiene azúcares inusuales, por ejemplo, apiosa. Una unidad de RGII puede contener dos residuos de apiosilo que, bajo condiciones iónicas adecuadas, pueden formar reversiblemente ésteres con borato.

Una composición para uso en un método de la invención comprende al menos tres actividades, al menos dos celulasas y GH61, por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más. Típicamente, una composición de la invención puede comprender al menos dos celulasas diferentes y al menos una hemicelulasa. Una composición para uso en la invención puede comprender las dos celulasas, pero no xilanasas. Además, una composición de la invención puede comprender actividad enzimática auxiliar, es decir, actividad adicional que, directa o indirectamente, conduce a la degradación de la lignocelulosa. Ejemplos de actividades auxiliares de este tipo se mencionan en esta memoria.

Por lo tanto, una composición para uso en la invención comprende la actividad de GH61 y puede comprender la actividad de endoglucanasa y/o actividad de celobiohidrolasa y/o actividad de β -glucosidasa. Una composición para uso en la invención puede comprender más de una actividad enzimática en una o más de esas clases. Por ejemplo, una composición para uso en la invención puede comprender dos actividades de endoglucanasa, por ejemplo, actividad de endo-1,3(1,4)- β glucanasa y actividad de endo- β -1,4-glucanasa. Dicha composición también puede comprender una o más actividades de xilanasas. Una composición de este tipo puede comprender una actividad enzimática auxiliar.

Una composición para uso en la invención se puede derivar de *Rasamsonia emersonii*. En la invención, se anticipa que un conjunto central de actividades enzimáticas (degradantes de lignocelulosa) puede derivarse de *Rasamsonia emersonii*. *Rasamsonia emersonii* puede proporcionar un conjunto altamente efectivo de actividades, tal como se demuestra en esta memoria para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica. Esa actividad puede complementarse con actividades enzimáticas adicionales de otras fuentes. Dichas actividades adicionales pueden derivarse de fuentes clásicas y/o producirse por un organismo genéticamente modificado.

Las actividades en una composición para uso en la invención pueden ser termoestables. En esta memoria, esto significa que la actividad tiene un óptimo de temperatura de aproximadamente 60°C o superior, por ejemplo, aproximadamente 70°C o superior, tal como aproximadamente 75°C o superior, por ejemplo, aproximadamente 80°C o superior, tal como 85°C o superior. Las actividades en una composición para uso en la invención no tendrán, típicamente, los mismos óptimos de temperatura, pero preferiblemente, sin embargo, serán termoestables.

Además, las actividades enzimáticas en una composición para uso en la invención pueden ser capaces de trabajar a un pH bajo. Para los fines de esta invención, un pH bajo indica un pH de aproximadamente 5,5 o inferior, de aproximadamente 5 o inferior, de aproximadamente 4,9 o inferior, de aproximadamente 4,8 o inferior, de aproximadamente 4,7 o inferior, de aproximadamente 4,6 o inferior, de aproximadamente 4,5 o inferior, de aproximadamente 4,4 o inferior, de aproximadamente 4,3 o inferior, de aproximadamente 4,2 o inferior, de aproximadamente 4,1 o inferior, de aproximadamente 4,0 o inferior, de aproximadamente 3,9 o inferior, o de aproximadamente 3,8 o inferior, de aproximadamente 3,7 o inferior, de aproximadamente 3,6 o inferior o de aproximadamente 3,5 o inferior.

Las actividades en una composición para uso en la invención pueden definirse mediante una combinación de cualquiera de los óptimos de temperatura y valores de pH anteriores.

La composición utilizada en un método de la invención puede comprender, además de las actividades derivadas de *Rasamsonia*, al menos dos celulasas (por ejemplo, una derivada de una fuente distinta de *Rasamsonia*) y una hemicelulasa (por ejemplo, una derivada de una fuente distinta de *Rasamsonia*) y una pectinasa, así como GH61.

Una composición para uso en la invención puede comprender tres, cuatro clases o más de celulasa, dos, tres o cuatro o todas las de un GH61, una endoglucanasa (EG), una o dos exo-celobiohidrolasa (CBH) y una β -glucosidasa (BG). Una composición para uso en la invención puede comprender dos o más de cualquiera de estas clases de celulasa.

Una composición para uso en la invención puede comprender una actividad que tiene un tipo diferente de actividad de celulasa y/o actividad de hemicelulasa y/o actividad de pectinasa que la proporcionada por la composición para uso en un método de la invención. Por ejemplo, una composición para uso en la invención puede comprender un tipo de actividad de celulasa y/o hemicelulasa y/o actividad de pectinasa proporcionada por una composición tal como se describe en esta memoria y un segundo tipo de actividad de celulasa y/o hemicelulasa y/o actividad de

pectinasa proporcionada por una celulosa/hemicelulosa/pectinasa adicional, siempre que se cumplan las condiciones de las reivindicaciones.

5 En esta memoria, una celulasa es cualquier polipéptido que es capaz de degradar o modificar la celulosa. Un polipéptido que es capaz de degradar la celulosa es uno que es capaz de catalizar el proceso de descomponer la celulosa en unidades más pequeñas, ya sea parcialmente, por ejemplo en celodextrinas, o completamente en monómeros de glucosa. Una celulasa para uso en la invención puede dar lugar a una población mixta de celodextrinas y monómeros de glucosa cuando se pone en contacto con la celulasa. Dicha degradación tendrá lugar típicamente mediante una reacción de hidrólisis.

10 Las proteínas GH61 (familia de la glucósido hidrolasa 61 o a las que se alude algunas veces como EGIV) son polisacáridos monooxigenasas (PMOs) dependientes de oxígeno de acuerdo con la última bibliografía. A menudo en la bibliografía se menciona que estas proteínas potencian la acción de las celulasas en sustratos de lignocelulosa. GH61 se clasificó originalmente como endoglucanasa en base a la medición de la actividad de la actividad endo-1,4-β-d-glucanasa muy débil en un miembro de la familia. El término "GH61", tal como se utiliza en esta memoria, debe entenderse como una familia de enzimas, que comparten porciones de secuencia conservadas comunes y plegamientos para ser clasificado en la familia 61 del sistema de clasificación CAZY GH bien establecido (http://www.cazy.org/GH61.html). La familia de glucósido hidrolasas 61 es un miembro de la familia de glucósido hidrolasas EC 3.2.1. GH61 se utiliza en esta memoria como parte de las celulasas.

20 En esta memoria, una hemicelulasa es cualquier polipéptido que es capaz de degradar o modificar 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 uno que es capaz de catalizar el proceso de descomposición de la hemicelulosa en polisacáridos más pequeños, ya sea parcialmente, por ejemplo en oligosacáridos, o completamente en monómeros de azúcar, por ejemplo, monómeros de azúcar hexosa o pentosa. Una hemicelulasa para uso en la invención puede dar lugar a una población mixta de oligosacáridos y monómeros de azúcar cuando se pone en contacto con la hemicelulasa. Dicha degradación tendrá lugar típicamente mediante una reacción de hidrólisis.

30 En esta memoria, una pectinasa es cualquier polipéptido que es capaz de degradar o modificar pectina. Un polipéptido que es capaz de degradar pectina es uno que es capaz de catalizar el proceso de descomponer la pectina en unidades más pequeñas, ya sea parcialmente, por ejemplo en oligosacáridos, o completamente en monómeros de azúcar. Una pectinasa para uso en la invención puede dar lugar a una población mixta de oligosacáridos y monómeros de azúcar cuando se pone en contacto con la pectinasa. Dicha degradación tendrá lugar típicamente mediante una reacción de hidrólisis.

Por consiguiente, una composición para uso en la invención puede comprender dos celulasas, GH61 y, por ejemplo, una celobiohidrolasa, una endo-β-1,4-glucanasa, una β-glucosidasa o una β-(1,3)(1,4)-glucanasa.

35 En esta memoria, 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. A esta enzima también se la puede aludir 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.

40 En esta memoria, 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 los cereales. Un polipéptido de este tipo también puede ser capaz de hidrolizar enlaces 1,4 en β-D-glucanos que también contienen enlaces 1,3. A esta enzima también se la puede aludir 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.

45 En esta memoria, una β-glucosidasa (EC 3.2.1.21) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de residuos de β-D-glucosa terminales, no reductoras, con la liberación de β-D-glucosa. Un polipéptido de este tipo puede tener una amplia especificidad para los 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. A esta enzima también se la puede aludir como amigdalasa, β-D-glucósido glucohidrolasa, celobiosa o gentobiasa.

50 En esta memoria 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. Un polipéptido de este tipo puede actuar sobre liquenina y β-D-glucanos de los cereales, pero no sobre los β-D-glucanos que contienen solo enlaces 1,3 o 1,4. A esta enzima también se la puede aludir como liqueninasa, 1,3-1,4-β-D-glucano 4-glucanohidrolasa, β-glucanasa, endo-β-1,3-1,4 glucanasa, liquenasa o β- glucanasa de enlace mixto. Una alternativa

- 5 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 residuo de glucosa, cuyo grupo reductor está implicado en el enlace que se va a hidrolizar está en sí mismo sustituido en C-3. Nombres alternativos incluyen endo-1,3-beta-glucanasa, laminarinasa, 1,3-(1,3;1,4)-beta-D-glucano 3(4) glucanohidrolasa; sustratos incluyen laminarina, liquenina y beta-D-glucanos de los cereales.
- Una composición para uso en la invención puede comprender cualquier hemicelulasa, por ejemplo, una endoxilanasas, una β -xilosidasa, una α -L-arabinofuranosidasa, una α -D-glucuronidasa, una xilano acetil esterasa, una feruloil esterasa, una coumaroil esterasa, una α -galactosidasa, una β -galactosidasa, una β -mananasa o una β -manosidasa.
- 10 En esta memoria, 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. A esta enzima también se la puede aludir como endo-1,4- β -xilanasas o 1,4- β -D-xilano xilano hidrolasa. Una alternativa es EC 3.2.1.136, una glucuronoarabinoxilano endoxilanasas, una enzima que es capaz de hidrolizar enlaces 1,4 xilosídicos en glucuronoarabinoxilanos.
- 15 En esta memoria, 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 separar residuos sucesivos de D-xilosa a partir de los extremos no reductores. Enzimas de este tipo también pueden hidrolizar xilobiosa. A esta enzima también se la puede aludir como xilano 1,4- β -xilosidasa, 1,4- β -D-xilano xilohidrolasa, exo-1,4- β -xilosidasa o xilobiasas.
- 20 En esta memoria, 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. A esta enzima también se la puede aludir como α -N-arabinofuranosidasa, arabinofuranosidasa o arabinosidasa.
- 25 En esta memoria, una α -D-glucuronidasa (CE 3.2.1.139) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar una reacción de la siguiente forma: alfa-D-glucuronósido + H(2)O = un alcohol + D-glucuronato. A esta enzima también se la puede aludir como alfa-glucuronidasa o alfa-glucosiduronasa. Estas enzimas también pueden hidrolizar el ácido glucurónico 4-O-metilado, que también puede estar presente como un sustituyente en xilanos. La alternativa es EC 3.2.1.131: xilano alfa-1,2-glucuronosidasa, que cataliza la hidrólisis de los enlaces alfa-1,2-(4-O-metil)glucuronosilo.
- 30 En esta memoria, una acetil xilano esterasa (EC 3.1.1.72) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la desacetilación de xilanos y xilo-oligosacáridos. Un polipéptido de este tipo puede catalizar la hidrólisis de grupos acetilo a partir de xilano polimérico, xilosa acetilada, glucosa acetilada, acetato de alfa-naftilo o acetato de p-nitrofenilo pero, típicamente, no a partir de triacetilglicerol. Un polipéptido de este tipo típicamente no actúa sobre manano acetilado o pectina.
- 35 En esta memoria, 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. Por lo general, puede catalizar la hidrólisis del grupo 4-hidroxi-3-metoxicinamoilo (feruloilo) a partir de un azúcar esterificado, que habitualmente es arabinosa en sustratos 'naturales'. Acetato de p-nitrofenol y ferulato de metilo son típicamente sustratos más pobres. A esta enzima también se la puede aludir como cinnamoil éster hidrolasa, ácido ferúlico esterasa o hidroxicinamoil esterasa. También se la puede aludir como enzima accesoria de hemicelulasa, ya que puede ayudar a las xilanasas y pectinasas a descomponer la hemicelulosa y la pectina de la pared de células vegetales.
- 40 En esta memoria, una cumaroil esterasa (CE 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. A esta enzima también se la puede aludir como trans-4-cumaroil esterasa, trans-p-cumaroil esterasa, p-cumaroil esterase o ácido p-coumárico esterasa. Esta enzima también se encuentra dentro de EC 3.1.1.73, por lo que también se la puede aludir como feruloil esterasa.
- 45 En esta memoria, una α -galactosidasa (EC 3.2.1.22) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de residuos de α -D-galactosa terminales no reductores en α -D-galactósidos, incluyendo oligosacáridos de galactosa, galactomananos, galactanos y arabinogalactanos. Un polipéptido de este tipo también puede ser capaz de hidrolizar α -D-fucósidos. Esta enzima también puede denominarse melibiasas.
- 50 En esta memoria, una β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de residuos terminales de β -D-galactosa no reductores en β -D-galactósidos. Un polipéptido de este tipo también

puede ser capaz de hidrolizar α -L-arabinósidos. A esta enzima también se la puede aludir como exo-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactanasa o lactasa.

5 En esta memoria, una β -mananasa (EC 3.2.1.78) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis al azar de enlaces 1,4- β -D-manosídicos en mananos, galactomananos y glucomanos. A esta enzima también se la puede aludir como manano endo-1,4- β -manosidasa o endo-1,4-mananasa.

En esta memoria, una β -manosidasa (EC 3.2.1.25) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de residuos de β -D-manosa terminales, no reductores en β -D-manósidos. A esta enzima también se la puede aludir como mananasa o manasa.

10 Una composición para uso en la invención 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, alfa ramnosidasa, una exo-galacturonasa, una expoligalacturonato liasa, una ramnogalacturonano hidrolasa, una ramnogalacturonano liasa, una ramnogalacturonano acetil esterasa, una ramnogalacturonano galacturonohidrolasa, una xilogalacturonasa.

15 En esta memoria, una endo-poligalacturonasa (EC 3.2.1.15) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis al azar de enlaces 1,4- α -D-galactósidos en pectato y otros galacturonanos. A esta enzima también se la puede aludir como poligalacturonasa pectina despilimerasa, pectinasa, endopoligalacturonasa, pectolasa, pectina hidrolasa, pectina poligalacturonasa, poli- α -1,4-galacturonida glicanohidrolasa, endogalacturonasa; endo-D-galacturonasa o poli (1,4- α -D-galacturonida) glicanohidrolasa.

20 En esta memoria, una pectina metil esterasa (CE 3.1.1.11) es cualquier enzima que es capaz de catalizar la reacción: pectina + n H₂O = n metanol + pectato. La enzima también puede conocerse como pectinesterasa, pectina desmetoxilasa, pectina metoxilasa, pectina metilesterasa, pectasa, pectinoesterasa o pectina pectilhidrolasa.

25 En esta memoria, una endo-galactanasa (EC 3.2.1.89) es cualquier enzima que es capaz de catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,4- β -D-galactosídicos en arabinogalactanos. La enzima también se puede conocer como arabinogalactano endo-1,4- β -galactosidasa, endo-1,4- β -galactanasa, galactanasa, arabinogalactanasa o arabinogalactano 4- β -D-galactanohidrolasa.

En esta memoria, una pectina acetil esterasa se define en esta memoria como cualquier enzima que tiene una actividad acetil esterasa que cataliza la desacetilación de los grupos acetilo en los grupos hidroxilo de los residuos GalUA de pectina.

30 En esta memoria, una endo-pectina liasa (EC 4.2.2.10) es cualquier enzima que es capaz de catalizar la escisión eliminadora de éster metílico de (1 \rightarrow 4)- α -D-galacturonano para dar oligosacáridos con 4-desoxi-6-O-metil- α -D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. La enzima también se puede conocer como pectina liasa, pectina *trans*-eliminasa; endopectina liasa, transeeliminasa polimetilgalacturónica, pectina metiltranseeliminasa, pectoliasa, PL, PNL o PMGL o (1 \rightarrow 4)-6-O-metil- α -D-galacturonano liasa.

35 En esta memoria, una pectato liasa (EC 4.2.2.2) es cualquier enzima que es capaz de catalizar la escisión eliminadora de (1 \rightarrow 4)- α -D-galacturonano para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi- α -D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. La enzima también se puede conocer como transeeliminasa poligalacturónica, ácido péctico transeeliminasa, poligalacturonato liasa, endopectina metiltranseeliminasa, pectato transeeliminasa, endogalacturonato transeeliminasa, ácido péctico liasa, liasa péctica, ácido α -1,4-D-endopoligalacturónico liasa, PGA liasa, PPasa-N, ácido endo- α -1,4-poligalacturónico liasa, ácido poligalacturónico liasa, pectina *trans*-eliminasa, ácido poligalacturónico *trans*-eliminasa o (1 \rightarrow 4)- α -D-galacturonano liasa.

40

En esta memoria, una alfa ramnosidasa (EC 3.2.1.40) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de residuos de α -L-ramnosa terminales no reductores en α -L-ramnosidasa o, alternativamente, en ramnogalacturonano. Esta enzima también se puede conocer como α -L-ramnosidasa T, α -L-ramnosidasa N o α -L-ramnósido ramnoidrolasa.

45 En esta memoria, exo-galacturonasa (EC 3.2.1.82) es cualquier polipéptido que es capaz de hidrólisis de ácido péctico desde el extremo no reductor, liberando digalacturonato. La enzima también se puede conocer como exo-poli- α -galacturonosidasa, expoligalacturonosidasa o expoligalacturanosidasa.

En esta memoria, exo-galacturonasa (EC 3.2.1.67) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar: (1,4- α -D-galacturónido)_n + H₂O = (1,4- α -D-galacturónido)_{n-1} + D-galacturonato. La enzima también se puede conocer como

galacturan 1,4- α -galacturonidasa, exopoligalacturonasa, poli(galacturonato) hidrolasa, exo-D-galacturonasa, exo-D-galacturonanasa, exopoli-D-galacturonasa o poli (1,4- α -D-galacturónido)galacturonohidrolasa.

5 En esta memoria, exopoligalacturonato liasa (EC 4.2.2.9) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la escisión eliminadora de 4-(4-desoxi- α -D-galact-4-enuronosil)-D-galacturonato desde el 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 \rightarrow 4)- α -D-galacturonano extremo reductor-disacárido-liasa.

10 En esta memoria, la ramnogalacturonano hidrolasa es cualquier polipéptido que es capaz de hidrolizar el enlace entre el ácido galactosilurónico y el ramnopiranosilo de una manera endo en estructuras de ramnogalacturonano estrictamente alternantes, que consisten en el disacárido [(ácido 1,2- α -L-ramnoil-(1,4)- α -galactosilurónico)].

En esta memoria, la ramnogalacturonano liasa es cualquier polipéptido que es capaz de escindir los enlaces α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalpA de manera endo en ramnogalacturonano por eliminación beta.

En esta memoria, ramnogalacturonano acetil esterasa es cualquier polipéptido que cataliza la desacetilación de la cadena principal de residuos alternantes de ácido galacturónico y ramnosa en ramnogalacturonano.

15 En esta memoria, la ramnogalacturonano galacturonohidrolasa es cualquier polipéptido que es capaz de hidrolizar el ácido galacturónico del extremo no reductor de estructuras de ramnogalacturonano estrictamente alternantes de una manera exo.

20 En esta memoria, xilogalacturonasa es cualquier polipéptido que actúa sobre xilogalacturonano escindiendo la cadena principal del ácido galacturónico sustituido con β -xilosa de una manera *endo*. Esta enzima también se puede conocer como xilogalacturonano hidrolasa.

En esta memoria, 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. A esta enzima también se la puede aludir como α -N-arabinofuranosidasa, arabinofuranosidasa o arabinosidasa.

25 En esta memoria, la endo-arabinanasa (EC 3.2.1.99) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,5- α -arabinofuranosídicos en 1,5-arabinanos. La enzima también se puede conocer como endo-arabinasa, arabinano endo-1,5- α -L-arabinosidasa, endo-1,5- α -L-arabinanasa, endo- α -1,5-arabanasa; endo-arabanasa o 1,5- α -L-arabinano 1,5- α -L-arabinanohidrolasa.

30 Una composición para uso en la invención comprenderá al menos dos celulasas y GH61, y típicamente al menos una hemicelulasa y/o al menos una pectinasa. Una composición para uso en la invención comprende una GH61 y al menos dos celulasas, y puede comprender una celobiohidrolasa, una endoglucanasa y/o una β -glucosidasa. Una composición de este tipo también puede comprender una o más hemicelulasas y/o una o más pectinasas.

35 Además, puede estar presente 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 integrante de celulosa o proteína similar (a esto se alude arriba como actividades auxiliares).

40 "Proteasa" incluye enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos (peptidasas), así como enzimas que hidrolizan enlaces entre péptidos y otros restos, tales como azúcares (glicopeptidasas). Muchas proteasas se caracterizan bajo EC 3.4, y son adecuadas para su uso en el procedimiento de la invención. Algunos tipos específicos de proteasas incluyen cisteína proteasas que incluyen pepsina, papaína y serina proteasas, que incluyen quimotripsinas, carboxipeptidasas y metaloendopeptidasas.

"Lipasa" incluye enzimas que hidrolizan lípidos, ácidos grasos y acilglicéridos, que incluyen fosfoglicéridos, lipoproteínas, diacilglicérols y similares. En plantas, los lípidos se utilizan 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.

45 "Ligninasa" incluye enzimas que pueden hidrolizar o descomponer la estructura de polímeros de lignina. Las enzimas que pueden descomponer la lignina incluyen lignina peroxidadas, manganeso peroxidadas, lacasas y feruloil esterases, y otras enzimas descritas en la técnica que se sabe despolimerizan o rompen de otra manera los polímeros de lignina. También se incluyen enzimas capaces de hidrolizar enlaces formados entre azúcares hemicelulósicos (especialmente arabinosa) y lignina. Ligninasas incluyen, pero no se limitan al siguiente grupo de

enzimas: lignina peroxidasas (EC 1.11.1.14), manganeso peroxidasas (EC 1.11.1.13), lacasas (EC 1.10.3.2) y feruloil esterasas (EC 3.1.1.73).

5 "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 productos de degradación de celulosa y/o celulosa. Un ejemplo de una hexosiltransferasa que se puede utilizar en el procedimiento de la invención es una β -glucanosiltransferasa. Una enzima de este tipo puede ser capaz de catalizar la degradación de (1,3)(1,4)glucano y/o celulosa y/o un producto de degradación de celulosa.

10 "Glucuronidasa" incluye enzimas que catalizan la hidrólisis de un glucuronósido, por ejemplo, β -glucuronósido para producir un alcohol. Se han caracterizado muchas glucuronidasas y pueden ser adecuadas para su uso en la invención, por ejemplo, β -glucuronidasa (EC 3.2.1.31), hialurono-glucuronidasa (EC 3.2.1.36), glucuronosil-disulfoglucosamina glucuronidasa (3.2.1.56), glicirricinato β -glucuronidasa (3.2.1.128) o α -D-glucuronidasa (EC 3.2.1.139).

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

20 Las expansinas están implicadas en el aflojamiento de la estructura de la pared celular durante el crecimiento de la célula vegetal. Se ha propuesto que las expansinas interrumpen la unión de hidrógeno entre la celulosa y otros polisacáridos de la pared celular, sin tener actividad hidrolítica. De esta manera, se cree que permiten el deslizamiento de las fibras de celulosa y el agrandamiento de la pared celular. Swolenina, una proteína similar a la expansina, contiene un dominio de la Familia 1 del Módulo de Unión a Hidratos de Carbono N-terminal (CBD) y un dominio similar a expansina C-terminal. Una proteína similar a expansina o una proteína similar a swolenina puede comprender uno o ambos de dichos dominios y/o puede alterar la estructura de las paredes celulares (tal como alterar la estructura de la celulosa), opcionalmente sin producir cantidades detectables de azúcares reductores.

25 Una composición para uso en la invención puede comprender proteína inducida por celulosa, por ejemplo, el producto polipéptido del gen *cip1* o *cip2* o genes similares (véase Foreman *et al.*, J. Biol. Chem. 278(34), 31988-31997, 2003), una proteína integradora de celulosa/celulosoma, por ejemplo, el producto polipéptido del gen *cipA* o *cipC*, o una escafoldina o una proteína similar a escafoldina. Las escafoldinas y las proteínas integradoras de celulosa son subunidades integradoras multifuncionales que pueden organizar subunidades celulolíticas en un complejo multienzimático. Esto se logra mediante la interacción de dos clases complementarias de dominio, es decir, un dominio de cohesión en escafoldina y un dominio de ataque en cada una de las unidades enzimáticas. La subunidad escafoldina también porta un módulo de unión a celulosa (CBM) que media en la unión del celulosoma a su sustrato. Una proteína escafoldina o integradora de celulosa para los fines de esta invención puede comprender uno o ambos de estos dominios.

35 Una composición para uso en un método de la invención puede estar compuesta por un miembro de cada una de las clases de enzimas arriba mencionadas, varios miembros de una clase de enzimas, o cualquier combinación de estas clases de enzimas o proteínas auxiliares (es decir, las proteínas mencionadas en esta memoria que no tienen actividad enzimática *per se*, pero que, sin embargo, ayudan en la degradación lignocelulósica).

40 Una composición para uso en un método de la invención puede estar compuesta de enzimas de (1) proveedores comerciales; (2) genes clonados que expresan enzimas; (3) caldo complejo (como el que resulta del crecimiento de una cepa microbiana en medios, en donde las cepas secretan proteínas y enzimas en los medios; (4) lisados celulares de cepas cultivadas como en (3); y/o (5) enzimas que expresan material vegetal. Se pueden obtener diferentes enzimas en una composición para uso en la invención a partir de diferentes fuentes.

45 Las enzimas pueden producirse de manera exógena en microorganismos, levaduras, hongos, bacterias o plantas, luego aislarse y añadirse, por ejemplo, a material de alimentación lignocelulósico. Alternativamente, las enzimas se producen, pero no se aíslan, y el caldo de fermentación en masa de células bruto o el material vegetal (tal como rastrojo de maíz o rastrojo de trigo), y similares se pueden añadir, por ejemplo, al material de alimentación. Alternativamente, el medio de producción de masa celular o enzima bruta o el material vegetal puede tratarse para evitar un mayor crecimiento microbiano (por ejemplo, por calentamiento o adición de agentes antimicrobianos), y luego añadirse, por ejemplo, a un material de alimentación. Estas mezclas de enzimas brutas pueden incluir el organismo que produce la enzima. Alternativamente, la enzima se puede producir en una fermentación que utiliza material de alimentación (pretratado) (tal como rastrojo de maíz o rastrojo de trigo) para proporcionar nutrición a un organismo que produce una o más enzimas. De esta manera, las plantas que producen las enzimas pueden servir como material de alimentación lignocelulósico y añadirse al material de alimentación lignocelulósico.

50

En los usos y métodos descritos en esta memoria, los componentes de las composiciones arriba descritas se pueden proporcionar de forma concomitante (es decir, como una composición única *per se*) o por separado o secuencialmente.

Material lignocelulósico

- 5 El material lignocelulósico en esta memoria incluye cualquier material lignocelulósico y/o hemicelulosa. Material lignocelulósico adecuado para su uso como material de alimentación en la invención incluye biomasa, p. ej., biomasa virgen y/o biomasa no virgen, tal como biomasa agrícola, componentes orgánicos comerciales, escombros de construcción y demolición, residuos sólidos municipales, residuos de papel y residuos de jardín. Formas comunes de biomasa incluyen árboles, arbustos y pastos, trigo, rastrojo de trigo, bagazo de caña de azúcar, pasto varilla, 10 miscanto, maíz, rastrojo de maíz, hojas de maíz, mazorcas de maíz, tallos de canola, tallos de soja, sorgo dulce, grano de maíz, incluida la fibra de granos, productos y subproductos de la molienda de granos, tales como maíz, trigo y cebada (incluida la molienda húmeda y la molienda en seco) a menudo denominados "salvado o fibra", así como los residuos sólidos municipales, papel de desecho y desechos de jardín. La biomasa también puede ser, pero no se limita a material herbáceo, residuos agrícolas, residuos forestales, residuos sólidos municipales, residuos de 15 papel y residuos de fábricas de pasta y papel. La "biomasa agrícola" incluye ramas, arbustos, cañas, maíz y hojas de maíz, cultivos energéticos, bosques, frutos, flores, granos, hierbas, cultivos herbáceos, hojas, corteza, agujas, troncos, raíces, plantones, cultivos leñosos de rotación corta, arbustos, pastos de varilla, árboles, vegetales, cáscaras de frutos, vides, pulpa de remolacha azucarera, harinillas de trigo, cáscaras de avena y maderas duras y blandas (sin incluir maderas con materiales nocivos). Además, la biomasa agrícola incluye materiales de desecho 20 orgánicos generados a partir de procesos agrícolas, incluidas las actividades agrícolas y forestales, específicamente los desechos forestales de madera. La biomasa agrícola puede ser cualquiera de las mencionadas anteriormente de forma individual o en cualquier combinación o mezcla de las mismas.

Pretratamiento

- 25 El material de alimentación puede estar opcionalmente pre-tratado con calor, modificación mecánica y/o química o cualquier combinación de dichos métodos con el fin de potenciar 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 realiza tratando la lignocelulosa con explosión de vapor, tratamiento con agua caliente o tratamiento con ácido diluido o base diluida.

Etapa de lavado

- 30 Opcionalmente, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende una etapa de lavado. La etapa de lavado opcional puede utilizarse para separar compuestos solubles en agua que pueden actuar como inhibidores para la etapa de fermentación. La etapa de lavado puede realizarse de manera conocida.

Hidrólisis enzimática

- 35 La composición enzimática utilizada en el procedimiento de la invención puede hidrolizar de manera extremadamente eficaz el material lignocelulolítico, por ejemplo, el rastrojo de maíz o el rastrojo de trigo, que luego se puede convertir en un producto útil, tal como etanol, biogás, butanol, ácido láctico, un plástico, un ácido orgánico, un disolvente, un suplemento alimenticio para animales, un producto farmacéutico, una vitamina, un aminoácido, una enzima o un material de alimentación químico. Adicionalmente, productos intermedios de un proceso que sigue a la hidrólisis, por ejemplo, el ácido láctico como compuesto intermedio en la producción de biogás, se pueden utilizar 40 como componentes básicos para otros materiales. La presente invención se ejemplifica con la producción de etanol, pero esto se hace solo como un ejemplo y no como una limitación, los otros productos útiles mencionados se pueden producir igualmente bien.

- El procedimiento de acuerdo con la invención comprende una etapa de hidrólisis enzimática, tal como se define en las reivindicaciones. La hidrólisis enzimática incluye, pero no se limita a hidrólisis con el fin de licuación del material de alimentación e hidrólisis con el fin de liberar azúcar del material de alimentación o ambas. En esta etapa, el material lignocelulósico opcionalmente pre-tratado y opcionalmente lavado se pone en contacto con la composición enzimática tal como se define en las reivindicaciones. Dependiendo del material lignocelulósico y del pretratamiento, la persona experto puede adaptar las diferentes condiciones de reacción, p. ej., temperatura, dosificación enzimática, tiempo de reacción de hidrólisis y concentración de materia seca, para lograr la conversión deseada de 50 lignocelulosa en azúcar. Algunas indicaciones se dan a continuación.

En un aspecto de la invención, la hidrólisis se realiza a una temperatura de 45°C o más, 50°C o más, 55°C o más, 60°C o más, 65°C o más, o 70°C o más. La alta temperatura durante la hidrólisis tiene muchas ventajas, que

incluyen trabajar a la temperatura óptima de la composición enzimática, reducir el riesgo de contaminación (bacteriana), reducir la viscosidad, requerir una menor cantidad de agua de enfriamiento, utilizar agua de refrigeración con una temperatura más alta, re-utilizar las enzimas y más.

5 En un aspecto adicional de la invención, la cantidad de composición enzimática añadida (en esta memoria también denominada dosis enzimática o carga enzimática) es baja. En una realización, la cantidad de enzima es 6 mg de proteína / g de materia seca en peso o inferior, 5 mg de proteína / g de materia seca o inferior, 4 mg de proteína / g de materia seca o inferior, 3 mg de proteína / g de materia seca o inferior, 2 mg de proteína / g de materia seca o inferior o 1 mg de proteína / g de materia seca o inferior (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 inferior, 0,4 mg de composición de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,3 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,25 mg de enzima / g de materia seca peso o inferior, 0,20 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,18 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,15 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior o 0,10 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior (expresado como total de enzimas de celulosa en mg de enzima / g de materia seca). Es posible una dosis baja de enzimas, ya que debido a la actividad y la estabilidad de las enzimas, es posible aumentar el tiempo de reacción de hidrólisis.

20 En un aspecto adicional de la invención, el tiempo de reacción de hidrólisis es de 5 horas o más, 10 horas o más, 20 horas o más, 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 reacción de hidrólisis es de 5 a 150 horas, de 40 a 130 horas, de 50 a 120 horas, de 60 a 120 horas, de 60 a 110 horas, de 60 a 100 horas, de 70 a 100 horas, de 70 a 90 horas o de 70 a 80 horas. Debido a la estabilidad de la composición enzimática, son posibles tiempos de reacción de hidrólisis más largos con rendimientos de azúcar más altos correspondientes.

25 El pH durante la hidrólisis puede ser elegido por la persona experta. En un aspecto adicional de la invención, el pH durante la hidrólisis puede ser de 3,0 a 6,4. Las enzimas estables de la invención pueden tener un amplio intervalo de pHs 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 a 8,0, 3,5 a 7,0, 3,5 a 6,0, 3,5 a 5,0, 3,5 a 4,5, 4,0 a 4,5 o es aproximadamente 4,2.

En un aspecto adicional de la invención, la etapa de hidrólisis se realiza hasta 70% o más, 80% o más, 85% o más, 90% o más, 92% o más, 95% o más de azúcar disponible se libere en material lignocelulósico.

30 Significativamente, un procedimiento de la invención se lleva a cabo utilizando altos niveles de materia seca (del material lignocelulósico) en la reacción de hidrólisis. Así, la invención se lleva a cabo con un contenido en materia seca de 10% en peso a 33% en peso.

Fermentación

35 El procedimiento de acuerdo con la invención puede comprender una etapa de fermentación. En un aspecto adicional, la invención incluye, por lo tanto, en procesos de fermentación en etapas en los que se utiliza un microorganismo para la fermentación de una fuente de carbono que comprende azúcar o azúcares, p. ej., glucosa, L-arabinosa y/o xilosa. La fuente de carbono puede incluir cualquier oligómero o polímero de hidratos de carbono que comprenda unidades de L-arabinosa, xilosa o glucosa, tales como, p. ej., lignocelulosa, xilanos, celulosa, almidón, arabinano y similares. Para la liberación de unidades de xilosa o glucosa de hidratos de carbono de este tipo, carbohidrasas apropiadas (tales como xilanasas, glucanasas, amilasas y similares) pueden añadirse al medio de fermentación o pueden ser producidas por la célula huésped modificada. En este último caso, la célula huésped modificada puede modificarse genéticamente para producir y excretar tales carbohidrasas. Una ventaja adicional del uso de fuentes oligoméricas o poliméricas de glucosa es que permite mantener una concentración baja (más baja) de glucosa libre durante la fermentación, p. ej., utilizando cantidades limitantes de la velocidad de las carbohidrasas. Esto, a su vez, evitará la represión de los sistemas requeridos para el metabolismo y el transporte de azúcares sin glucosa, tales como xilosa. En un procedimiento preferido, la célula huésped modificada fermenta tanto L-arabinosa (opcionalmente xilosa) como glucosa, de preferencia simultáneamente, en cuyo caso preferiblemente se utiliza una célula huésped modificada que es insensible a la represión de la 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 huésped modificada. Composiciones de medios de fermentación para el crecimiento de microorganismos tales como levaduras u hongos filamentosos son bien conocidas en la técnica.

45 El tiempo de fermentación puede ser más corto que en la fermentación convencional en las mismas condiciones, en donde parte de la hidrólisis enzimática todavía tiene que tomar parte durante la fermentación. En una realización, el tiempo de fermentación es de 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 del material

de alimentación lignocelulósico (p. ej., 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 puede reducirse correspondientemente.

El proceso de fermentación puede ser un proceso de fermentación aerobio o anaerobio. Un proceso de fermentación anaerobio se define en esta memoria como un proceso de fermentación realizado en ausencia de oxígeno o en el que no se consume sustancialmente 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 donantes de electrones como aceptores de electrones. En ausencia de oxígeno, el NADH producido en la glucólisis y la formación de biomasa no puede oxidarse por fosforilación oxidativa. Para resolver este problema, muchos microorganismos utilizan piruvato o uno de sus derivados como un aceptor de electrones e hidrógeno, regenerando así NAD⁺. Por lo tanto, en un proceso de fermentación anaerobio preferido, el piruvato se utiliza como un electrón (y aceptor 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, antibióticos de β-lactama y una cefalosporina. En una realización preferida, el proceso de fermentación es anaerobio. Un proceso anaerobio es ventajoso, ya que es más barato que los procesos aerobios: se necesita menos equipo especial. Además, se espera que los procesos anaerobios den un mayor rendimiento del producto que los procesos aerobios. En condiciones aerobias, habitualmente el rendimiento de biomasa es mayor que en condiciones anaerobias. Como consecuencia, habitualmente en condiciones aerobias, el rendimiento esperado del producto es menor que en condiciones anaerobias.

En otra realización, el proceso de fermentación está bajo condiciones limitadas de oxígeno. Más preferiblemente, el proceso de fermentación es aerobio y bajo condiciones limitadas de oxígeno. Un proceso de fermentación limitado en oxígeno es un proceso en el que el consumo de oxígeno está limitado por la transferencia de oxígeno del gas al líquido. El grado de limitación de oxígeno está determinado por la cantidad y la composición del flujo de gas entrante, así como por las propiedades reales de mezclado/transferencia de masa del equipo de fermentación utilizado. Preferiblemente, en un proceso en condiciones limitadas de oxígeno, la tasa de consumo de oxígeno es al menos 5,5, más preferiblemente al menos 6 e incluso más preferiblemente al menos 7 mmol/L/h.

El proceso de fermentación se realiza preferiblemente a una temperatura que es óptima para la célula modificada. Por lo tanto, para la mayoría de las levaduras o células fúngicas, el proceso de fermentación se realiza a una temperatura que es menor que 42°C, preferiblemente menor que 38°C. Para las células huésped de hongos filamentosos o de levadura, el proceso de fermentación se realiza preferiblemente a una temperatura inferior a 35, 33, 30 o 28°C y a una temperatura superior a 20, 22 o 25°C.

En una realización de la invención, la etapa de fermentación se realiza con un microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar C5. En una realización, el proceso es un proceso para la producción de etanol, en donde el proceso comprende la etapa que comprende fermentar un medio que contiene azúcar o azúcares con un microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar C5, por lo que la célula huésped es capaz de fermentar glucosa, L-arabinosa y xilosa a etanol. En una realización del mismo, el microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar C5 es una levadura. En una realización, la levadura pertenece al género *Saccharomyces*, preferiblemente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, en la que se han realizado modificaciones genéticas. Un ejemplo de un microorganismo de este tipo y su preparación se describe con más detalle en el documento WO 2008/041840.

En una realización, el proceso de fermentación para la producción de etanol es anaerobio. Anaerobio ya se ha definido anteriormente en esta memoria. En otra realización preferida, el proceso de fermentación para la producción de etanol es aerobio. En otra realización preferida, el proceso de fermentación para la producción de etanol se realiza en condiciones limitadas de oxígeno, más preferiblemente en condiciones aerobias y limitadas de oxígeno. Las condiciones limitadas de oxígeno ya se han definido anteriormente en esta memoria.

En dicho proceso, 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 proceso preferiblemente es al menos 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 98%. El rendimiento de etanol se define en esta memoria 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.

En un aspecto, el proceso de fermentación que conduce a la producción de etanol tiene varias ventajas en comparación con los procesos de fermentación de etanol conocidos:

- son posibles procesos anaerobios;
- también son posibles condiciones limitadas de oxígeno;
- se pueden obtener mayores rendimientos de etanol y tasas de producción de etanol;
- la cepa utilizada es capaz de utilizar L-arabinosa y opcionalmente xilosa.

Alternativamente a los procesos de fermentación arriba descritos, se pueden utilizar al menos dos células distintas, esto significa que este proceso es un proceso de co-fermentación. Todas las realizaciones preferidas de los procesos de fermentación tal como se describió anteriormente también son realizaciones preferidas de este proceso de co-fermentación: identidad del producto de fermentación, identidad de la fuente de L-arabinosa y fuente de xilosa, condiciones de fermentación (condiciones aerobias o anaerobias, condiciones limitadas de oxígeno, temperatura a la que se lleva a cabo el proceso, productividad de etanol, rendimiento de etanol).

El proceso de fermentación puede llevarse a cabo sin ningún requisito para ajustar el pH durante el proceso. Es decir, el proceso es uno que puede llevarse a cabo sin la adición de ningún ácido o ácidos o base o bases. Sin embargo, esto excluye una etapa de pretratamiento, en donde se puede añadir ácido. El punto 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 del ácido de un material de alimentación pretratado con ácido para que pueda tener lugar la sacarificación o hidrólisis. Por consiguiente, un método de la invención puede ser un método de cero residuos que usa solo productos orgánicos sin requerir aporte químico inorgánico.

Tiempo global de reacción

De acuerdo con la invención, el tiempo global de reacción (o el tiempo de reacción de la etapa de hidrólisis y la etapa de fermentación juntas) puede reducirse. En una realización, el tiempo global de reacción es de 300 horas o menos, 200 horas o menos, 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 aproximadamente 72 horas con un rendimiento de glucosa del 90%. Se pueden alcanzar tiempos globales correspondientes más bajos con un rendimiento de glucosa más bajo.

Productos de fermentación

Los productos de fermentación que se pueden producir de acuerdo con el procedimiento de la invención incluyen aminoácidos, vitaminas, productos farmacéuticos, complementos alimenticios para animales, productos químicos especiales, materiales de alimentación químicos, plásticos, solventes, combustibles u otros polímeros orgánicos, ácido láctico y etanol, incluyendo etanol combustible (el término "etanol" se entiende que incluye alcohol etílico o mezclas de alcohol etílico y agua).

Productos de valor añadido específicos que pueden ser producidos por el procedimiento de la invención incluyen, pero no se limitan a los biocombustibles (incluyendo biogás, etanol y butanol); ácido láctico; ácido 3-hidroxipropiónico; ácido acrílico; ácido acético; 1,3-propano-diol; etileno; glicerol; un plástico; un producto químico especializado; un ácido orgánico, incluyendo ácido cítrico, ácido succínico y ácido maleico; un disolvente; un complemento alimenticio para animales; un producto farmacéutico tal como un antibiótico de β -lactama o una cefalosporina; una vitamina; un aminoácido, tal como lisina, metionina, triptófano, treonina y ácido aspártico; una enzima, tal como una proteasa, una celulasa, una amilasa, una glucanasa, una lactasa, una lipasa, una liasa, una oxidorreductasa, una transferasa o una xilanasas; un material de alimentación químico; o un complemento alimenticio para animales.

Separación del producto de fermentación

El procedimiento de acuerdo con la invención comprende opcionalmente la recuperación del producto de fermentación. Un producto de fermentación puede separarse del caldo de fermentación de cualquier manera conocida. Para cada uno de los productos de fermentación, la persona experta podrá seleccionar, por lo tanto, una técnica de separación adecuada. Por ejemplo, el etanol puede separarse de un caldo de fermentación de levadura mediante destilación, por ejemplo, destilación al vapor/destilación en vacío de manera convencional.

Uso de enzimas termoestables en condiciones óptimas de temperatura

En una realización, la invención se refiere al uso de enzimas termoestables tales como enzimas celulolíticas de *Rasamsonia* para la producción de azúcares reductores a partir de material de alimentación lignocelulósico pre-tratado en, pero sin limitar a la producción de etanol. Enzimas celulolíticas de *Rasamsonia* aplicadas en material de alimentación lignocelulósico pre-tratado mostraron tasas de conversión máximas a temperatura dentro del intervalo de 50 a 70°C. La enzima permanece activa en estas circunstancias durante 14 días y más sin cesar por completo la actividad.

Mediante el uso de condiciones de temperatura óptimas, la cantidad máxima de azúcares reductores puede liberarse del material de alimentación (hidrólisis total) dentro del tiempo de hidrólisis más corto posible. De esta forma, se logra una conversión del 100% de la celulosa en glucosa en menos de 5 días.

El rendimiento máximo teórico (Yps máx en g de producto por gramo de glucosa) de un producto de fermentación se pueden derivar del libro de texto de bioquímica. Para etanol, 1 mol de glucosa (180 g) proporciona de acuerdo con la ruta normal de fermentación de la glucólisis en levadura 2 moles de etanol (= 2 x 46 = 92 g de etanol. El rendimiento máximo teórico de etanol en glucosa es, por lo tanto, $92/180 = 0,511$ g de etanol / g de glucosa.

- 5 Para butanol (PM 74 g/mol) o isobutanol, el rendimiento máximo teórico es 1 mol de butanol por mol de glucosa. Entonces Yps máx para (iso-)butanol = $74/180 = 0,411$ g de (iso-)butanol/g de glucosa.

Para el ácido láctico, el rendimiento de fermentación para la fermentación homoláctica es de 2 moles de ácido láctico (PM = 90 g/mol) por mol de glucosa. De acuerdo con esta estequiometría, el Yps máx = 1 g de ácido láctico/g de glucosa.

- 10 Para otros productos de fermentación se puede hacer un cálculo similar.

La reducción de costes conseguida con la aplicación de enzimas celulolíticas de *Rasamsonia* será el resultado de una reducción global del tiempo de procedimiento.

Compensación de dosis más bajas de enzimas con tiempo de hidrólisis prolongados utilizando enzimas *Rasamsonia*

- 15 Debido a la alta estabilidad de las enzimas estables, las actividades no cesan en el tiempo, aunque se liberan menos azúcares reductores en el curso de la hidrólisis. Es posible reducir la dosis de la enzima y extender el uso de la enzima prolongando los tiempos de hidrólisis para obtener niveles similares de azúcares reductores liberados. Por ejemplo, 0,175 mL de enzima/g de materia seca de material de alimentación resultó en la liberación de aproximadamente el 90% del máximo teórico de azúcares reductores del material de alimentación pre-tratado en el espacio de 72 h. Cuando se utilizan 0,075 mL de enzima/g de materia seca de material de alimentación, se logra aproximadamente un 90% de conversión del máximo teórico en el espacio de 120 h. Los resultados demuestran que, debido a la estabilidad de la actividad enzimática, la reducción de la dosis de la enzima se puede compensar extendiendo el tiempo de hidrólisis para obtener la misma cantidad de azúcares reductores. Lo mismo es válido para la hidrólisis de material de alimentación pre-tratado con contenidos de materia seca superiores al 10% demuestra que el efecto compensador del tiempo de hidrólisis extendido a un material de alimentación de materia seca del 15%.

La reducción de costes lograda mediante el uso de enzimas celulolíticas estables, tales como *Rasamsonia*, resulta de requerir una menor dosis de enzima, dando como resultado rendimientos de conversión de hidrólisis similares.

Disminuir el riesgo de contaminación con enzimas estables

- 30 En un procedimiento común para convertir material lignocelulósico en etanol, las etapas del procedimiento se realizan preferiblemente en condiciones sépticas para reducir los costes operativos. Por lo tanto, pueden producirse una contaminación y el crecimiento de microorganismos contaminantes y pueden dar lugar a efectos secundarios indeseables, tales como la producción de ácido láctico, ácido fórmico y ácido acético, pérdidas de rendimiento de etanol en el sustrato, producción de toxinas y polisacáridos extracelulares, que pueden afectar significativamente a los costos de producción. Una temperatura de procedimiento alta y/o un tiempo de procedimiento corto limitarán el riesgo de contaminación durante la hidrólisis y la fermentación. Enzimas termoestables, tales como las de *Rasamsonia*, son capaces de hidrolizar material de alimentación lignocelulósico a temperaturas superiores a 60°C. A estas temperaturas, el riesgo de que un microorganismo contaminante provoque efectos secundarios no deseados será de poco a casi cero.

- 40 Durante la etapa de fermentación, en la que se produce etanol, las temperaturas están típicamente entre 30 y 37°C y preferiblemente no se elevarán debido a pérdidas de producción. Al aplicar tiempos de proceso de fermentación lo más cortos posible, los riesgos y efectos de la contaminación y/o el crecimiento de contaminantes se reducirán tanto como sea posible. Con enzimas estables, tales como las de *Rasamsonia*, se puede aplicar un tiempo de fermentación lo más corto posible (véase la descripción más arriba) y, por lo tanto, los riesgos de contaminación y/o de crecimiento de contaminantes se reducirán tanto como sea posible. La reducción de costos lograda con la aplicación de enzimas celulolíticas termoestables de *Rasamsonia* de esta manera resultará de un menor riesgo de fallos en el proceso debido a la contaminación.

Enzimas estables reducen los costos de enfriamiento y aumentan la productividad de las plantas de etanol

- 50 La primera etapa después del pretratamiento térmico será enfriar el material de alimentación pre-tratado a temperaturas en las que las enzimas sean activas óptimamente. A gran escala, esto generalmente se hace añadiendo agua (enfriada) que, además de disminuir la temperatura, reducirá el contenido de materia seca. Al

5 utilizar enzimas termoestables, tales como las de *Rasamsonia*, se puede lograr una reducción de costos por el hecho de que (i) se requiere menos enfriamiento del material de alimentación pre-tratado, ya que se permiten temperaturas más altas durante la hidrólisis, y (ii) se añadirá menos agua, lo que aumentará el contenido de materia seca durante la hidrólisis y la fermentación y, por lo tanto, aumentará la capacidad de producción de etanol (cantidad producida por unidad de tiempo por volumen) de una planta de etanol. Además, mediante el uso de enzimas termoestables en el procedimiento de la invención, tales como las de *Rasamsonia*, la reducción de costos también se puede lograr mediante el uso de agua de enfriamiento que tiene una temperatura más alta que el agua que se utiliza en un procedimiento con enzima no termoestable.

Reciclaje de enzimas después de la hidrólisis con enzimas estables

10 Al final de la hidrólisis, las actividades enzimáticas parecen ser bajas, ya que se liberan pocos azúcares reductores una vez que se ha convertido casi toda la celulosa. Sin embargo, la cantidad de actividad enzimática presente ha disminuido solo un poco, suponiendo que se ha debido principalmente a la absorción de las enzimas en el sustrato. Al aplicar la separación sólido-líquido después de la hidrólisis, tal como centrifugación, filtración, sedicantación, etcétera, se puede recuperar y reutilizar el 60% o más, por ejemplo, el 70% de la actividad enzimática en solución para la hidrólisis de un nuevo material de alimentación lignocelulósico pre-tratado durante la siguiente hidrólisis.

15 Además, después de la separación sólido-líquido, la enzima en solución puede separarse de la solución que contiene azúcares reductores y otros productos de la hidrólisis de las acciones enzimáticas. Esta separación puede realizarse por, pero sin limitarse a, (ultra y micro)filtración, centrifugación, sedicantación, sedimentación, con o sin la primera adsorción de la enzima a un portador de cualquier tipo.

20 Por ejemplo, después de la hidrólisis del material de alimentación pre-tratado con 0,175 mL/g de carga de enzima de materia seca de material de alimentación durante 20 h, se libera el 50% de la cantidad máxima teórica de azúcares reductores y después de la misma hidrólisis durante 72 h, se libera el 90% de la cantidad máxima teórica de azúcares reductores. Por centrifugación y ultrafiltración, el 60-70% de la actividad enzimática se recuperó en el retenido, mientras que el filtrado contenía más del 80% de los azúcares reductores liberados. Al reutilizar el retenido, ya sea como está o después de una purificación y/o concentración adicional, la dosis de enzima durante la siguiente etapa de hidrólisis puede reducirse del 60 al 70%. La reducción de costos lograda mediante el uso de enzimas celololíticas estables, tales como de *Rasamsonia*, de esta manera resulta de requerir menos dosis de enzima.

25 Reciclaje de enzimas después de la hidrólisis en combinación con la producción de enzimas y el reciclaje de células de levadura con enzimas estables

30 El proceso incluyendo el reciclaje de enzima después de la hidrólisis, tal como se describe arriba, se puede combinar con el reciclaje del microorganismo productor de etanol después de la fermentación y con el uso de los azúcares reductores que contienen filtrado como un sustrato (purificado y/o concentrado o diluido) en fermentación de producción enzimática y como sustrato para el cultivo del microorganismo productor de etanol.

Reciclaje de enzimas después de la destilación en vacío con enzimas estables

35 La termoestabilidad de enzimas, tales como de *Rasamsonia*, provoca actividad celololítica después de la hidrólisis, fermentación y destilación en vacío en los residuos finos. La actividad total de la enzima se reduce durante las tres etapas sucesivas del proceso. Por lo tanto, los residuos finos obtenidos después de la destilación en vacío se puede reutilizar como fuente de enzima para un nuevo ciclo de proceso de hidrólisis-fermentación-destilación de conversión de paja de trigo pretratada en etanol. Los residuos finos pueden utilizarse en forma concentrada o (no) diluida y/o purificarse y con o sin complemento enzimático adicional.

40 Reciclaje de enzimas en combinación con complementos enzimáticos después de la destilación en vacío con enzimas termoestables

45 En un procedimiento óptimo, se complementa una cantidad de enzima en los residuos finos, antes de su reutilización en un nuevo ciclo de proceso, igual a la cantidad de actividad perdida durante las tres etapas sucesivas del proceso del ciclo de proceso previo. De esta manera se evita la sobredosis de enzima y, por lo tanto, se obtiene el uso más eficiente de la enzima.

50 Además, al proporcionar una alta dosis de enzima en el primer ciclo del proceso, y complementar la enzima igual a la cantidad de actividad perdida durante las tres etapas sucesivas del proceso en los siguientes ciclos de proceso, se pueden obtener las tasas de hidrólisis más altas posibles en cada ciclo de proceso, resultando tiempos de hidrólisis cortos de menos de 48 h en combinación con el uso más eficiente de enzimas.

Uso de enzimas estables en sistemas mixtos

- Al aplicar la mezcla durante la hidrólisis, las enzimas entran más a menudo en contacto con sustratos, lo que da como resultado un uso más eficiente de la actividad catalítica. Esto dará como resultado una menor dosis de enzimas y, por lo tanto, menores costos, a menos que la mezcla tenga un efecto negativo sobre las enzimas.
- 5 Enzimas estables, tales como las enzimas termoestables de *Rasamsonia*, son robustas y pueden resistir circunstancias de cizallamiento y temperaturas (localmente) altas, que es el caso durante la mezcla intensa de suspensiones. Por lo tanto, su uso en sistemas mixtos es beneficioso y conducirá a la dosificación y, por lo tanto, a la reducción de costos.

EJEMPLOS10 **Información experimental****Cepas**

La cepa *Rasamsonia (Talaromyces) emersonii* se depositó en CENTRAAL BUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES, Uppsalalaan 8, PO Box 85167, NL-3508 AD Utrecht, Países Bajos en diciembre de 1964 con el Número de Acceso CBS 393.64.

- 15 Otras cepas adecuadas pueden utilizarse igualmente en los presentes ejemplos. Por ejemplo, TEC-101, TEC-147, TEC-192, TEC-201 o TEC-210 son cepas de *Rasamsonia* adecuadas que se describen en el documento WO2011/000949.

Preparación de sustrato de rastrojo de maíz pre-tratado con ácido

- 20 El rastrojo de maíz pre-tratado con ácido diluido (aCS) se obtuvo tal como se describe en Schell, D.J., Applied Biochemistry and Biotechnology (2003), vol. 105-108, pp 69-85. Se utilizó un reactor de pretratamiento a escala piloto que funcionaba en condiciones estables de 190°C, 1 minuto de tiempo de permanencia y una concentración efectiva de ácido H₂SO₄ de 1,45% (p/p) en la fase líquida.

Ensayos de medición de proteínas.1. Proteína total25 TCA Biuret

- El método era una combinación de la precipitación de proteína utilizando ácido tricloroacético (TCA) para separar las sustancias perturbadoras y permitir la determinación de la concentración de proteína con la reacción de Biuret colorimétrica. En la reacción de Biuret, un ion cobre (II) se reduce a cobre (I), que forma un complejo con los nitrógenos y los carbonos de los enlaces peptídicos en una solución alcalina. Un color violeta indica la presencia de proteínas. La intensidad del color y, por lo tanto, la absorción a 546 nm, es directamente proporcional a la concentración de proteínas, de acuerdo con la ley de Beer-Lambert. La estandarización se realizó utilizando BSA (albúmina de suero bovino) y el contenido de proteína se expresó en g de proteína como equivalente de BSA/L o mg de proteína como equivalente de BSA/ml. El contenido de proteína se calculó utilizando protocolos de cálculo estándar conocidos en la técnica, trazando la DO₅₄₆ frente a la concentración de muestras con concentración conocida, seguido del cálculo de la concentración de las muestras desconocidas utilizando la ecuación generada a partir de la línea de calibración.
- 35

2. Proteínas individuales utilizando PAGEPretratamiento de muestra por SDS-PAGE

- 40 En base a la concentración de proteína estimada de las muestras, se realizó la siguiente preparación de muestras. A 10 µl de muestra se añadieron 40 µl de agua MilliQ y 50 µl de TCA (al 20%) para diluir la muestra cinco veces (~ 1 mg/ml) y precipitar las proteínas. Después de 1 hora en hielo, la muestra se centrifugó (10 minutos, 14000 rpm). El sedimento se lavó con 500 µl de acetona y se centrifugó (10 minutos, 14000 rpm). El sedimento se trató como se describe a continuación.

SDS-PAGE

- 45 El sedimento se disolvió en 65 µl de agua MilliQ, 25 µl de tampón de muestra NuPAGE™ LDS (4x) Invitrogen y 10 µl de agente reductor de muestra NuPAGE™ (10x) Invitrogen. Antes de la etapa de deionización, la muestra se diluyó 5 veces utilizando una mezcla de tampón de muestra MilliQ; NuPAGE™ LDS y 10 µl de Sample Reducing NuPAGE™

en la relación de 65:25:10. Después de mezclar, las muestras se incubaron en un termomezclador durante 10 minutos a 70°C. Las soluciones de muestra se aplicaron en un gel Bis-Tris al 4-12% (NuPAGE™ BisTris, Invitrogen). También se aplicó una muestra (10 µl) del marcador M12 (Invitrogen) sobre el gel. El gel se ejecutó a 200 V durante 50 minutos, utilizando XCELL Surelock, con 600 ml de tampón SDS 20 x diluido en la cámara de tampón exterior y 200 ml de tampón SDS 20 x diluido, que contenía 0,5 ml de antioxidante (NuPAGE™ Invitrogen) en la cámara de tampón interno. Después de la ejecución, el gel se lavó dos veces con agua desmineralizada, los geles se fijaron con solución de metanol al 50%/ácido acético al 7% durante una hora y se tiñeron con Sypro Ruby (50 ml por gel) durante la noche. Se realizó una imagen utilizando Typhoon 9200 (610 BP 30, Verde (532 nm), PMT 600V, 100 micras) después de lavar el gel con agua MilliQ.

10 Análisis cuantitativo de la proteína

Utilizando el escáner Typhoon, se determinó la relación entre las bandas de proteínas dentro de una pista utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. La muestra se aplicó por triplicado y los valores de gris se determinaron utilizando el programa Image quant. Los valores se expresan como % relativo de proteína con respecto a la proteína total, calculados utilizando el valor de gris de la banda de proteína seleccionada en relación con el valor de gris total de todas las bandas de proteína.

Cálculo de conversión de glucano:

$$\% \text{ conversión de glucano (\%)} = (\text{glucosa (g/l)} \times 100\%) / (\text{glucano (fracción en DM)} \times \text{dm (g/kg)} \times 1:1)$$

en donde:

| | |
|--------------------------|--|
| 20 glucosa (g/l) | = concentración de glucosa en el sobrenadante después de la hidrólisis. |
| glucano (fracción en dm) | = contenido de glucano del sustrato antes del pretratamiento. |
| dm (g/kg) | = materia seca de hidrólisis (i.f. 20% dm = 200 g/kg). |
| 1.1 | = aumento de peso debido a la incorporación de agua durante la hidrólisis. |

Cálculo de ejemplo:

| | | |
|---------------------|---|-------------------------------|
| glucosa | = | 60 g/l |
| fracción de glucano | = | 0,40 (es 40% en materia seca) |
| dm | = | 200 g/kg |

Ejemplo 1

25 **Evaluación del efecto de la ausencia de oxígeno durante la hidrólisis sobre la actividad celulolítica de cócteles de enzima celulasa**

El efecto de la ausencia de oxígeno durante la hidrólisis de la actividad celulolítica de tres cócteles de enzimas diferentes se evaluó de acuerdo con los procedimientos descritos a continuación. Las reacciones de hidrólisis se realizaron con material de alimentación de rastrojo de maíz pre-tratado con ácido (aCS) a una concentración final de 10% p/p de DM. Esta solución de alimentación se preparó mediante la dilución de una solución de material de alimentación concentrada con agua. Posteriormente, el pH se ajustó a pH 4,5 con una solución de NaOH 4M. La eliminación de oxígeno del material de alimentación se logró en dos etapas. Primero, la solución de material de alimentación se desgasificó mediante tratamiento con ultrasonidos en vacío en un baño de tratamiento con ultrasonidos (Branson 5510E-DTH, ajuste; Degas) durante 15 minutos. En la segunda etapa, el oxígeno se separó adicionalmente mediante el rociado continuo de un flujo de nitrógeno a través de una solución de 500 ml de material de alimentación de DM al 10% durante un período de 3 horas. Antes de ser rociado a través de la solución de material de alimentación, el flujo de nitrógeno se roció a través del agua con el fin de saturarlo con vapor de agua y evitar la evaporación del agua de la solución de material de alimentación. Paralelamente, 500 ml del mismo lote de aCS al 10% p/p de DM se rociaron con aire como una muestra de control que contiene oxígeno en una configuración similar y de acuerdo con el mismo protocolo.

La hidrólisis de las soluciones del material de alimentación de aCS al 10% p/p agotadas en oxígeno (rociado con nitrógeno) y saturadas de oxígeno (rociado con aire) se realizó en frascos de centrifuga de 30 ml herméticos (Nalgene Oakridge) en un volumen de reacción total de 10 ml. Los frascos, que ya contenían la solución de celulasa, utilizados para el experimento, agotada en oxígeno se rociaron con nitrógeno antes y durante el llenado con material de alimentación. Cada una de las hidrólisis se realizó por duplicado con un cóctel de enzimas celulasas de 7,5 mg/g de DM añadido en un volumen total no mayor que 375 µl. Los tres cócteles de enzima celulasa sometidos a ensayo incluyeron: una mezcla de TEC-210 (mezcla de celulasas), una mezcla de 4E-GH61 (que consiste en 9% p/p de proteína BG total, 30% p/p de proteína CBHI total, 25% p/p de proteína CBHII total y 36% p/p de proteína GH61 total) y una mezcla de 4E-EG (que consiste en 9% p/p de proteína BG total, 30% p/p de proteína CBHI total, 25% p/p de proteína CBHII total y 36% p/p de proteína EG total). TEC-210 se fermentó de acuerdo con los procedimientos de inoculación y fermentación descritos en el documento WO2011/000949. Se utilizó la mezcla de 4E (como se describe en el documento WO2011/098577).

Los frascos de centrífuga que contenían el material de alimentación y la solución enzimática se colocaron en una incubadora de horno (horno de hibridación Techne HB-1D) y se incubaron durante 72 horas a 65 °C mientras giraban en el punto de ajuste 3 (12 rpm por minuto). Después de la hidrólisis, las muestras se enfriaron en hielo e inmediatamente se diluyeron 50 µl de cada uno de los sobrenadantes en 1450 µl de agua de calidad I. El sobrenadante diluido se filtró posteriormente (filtro de 0,45 µm, Pall PN 454) y se analizó el contenido en azúcar en los filtrados tal como se describe a continuación.

Las concentraciones de azúcar de las muestras diluidas se midieron utilizando una HPLC equipada con una columna Aminex HPX-87P (Biorad nº 1250098) por elución con agua a 85 °C a un caudal de 0,6 ml por minuto y se cuantificaron por integración de las señales de glucosa de la detección del índice de refracción (R.I.) calibradas con soluciones estándar de glucosa.

Los datos presentados en la Tabla 1/Figura 1 demuestran que la glucosa liberada de los materiales de alimentación rociados con nitrógeno es menor que la glucosa liberada de los materiales de alimentación rociados con aire tanto para la mezcla TEC-210 como para las incubaciones con la mezcla 4E-GH61. No hay diferencia en la liberación de glucosa detectable entre el nitrógeno y los materiales de alimentación rociados con aire para las muestras hidrolizadas por la mezcla 4E-EG.

En base a estos resultados, los autores de la invención concluyeron que la presencia de oxígeno mejora el comportamiento celulolítico de las mezclas de celulasas que contienen enzimas GH61.

| Celulasa | Rociado con aire Glucosa media (g/l) | desv. est. | Rociado con N ₂ Glucosa media (g/l) | desv. est. |
|-------------------|---|------------|---|------------|
| TEC-210 | 34,5 | 0,8 | 31,9 | 1,1 |
| Mezcla de 4E-GH61 | 31,7 | 1,4 | 27,4 | 0,1 |
| Mezcla de 4E-EG | 22,7 | 0,1 | 23,3 | 1,7 |

Tabla 1: El efecto de rociar nitrógeno o aire a través de un material de alimentación de aCS al 10% antes de la hidrólisis, sobre la cantidad total de glucosa liberada por tres mezclas diferentes de celulasas.

Ejemplo 2

El efecto de la concentración de oxígeno disuelto en la actividad celulolítica de composiciones de enzima celulasa durante la hidrólisis de material de alimentación lignocelulósico a escala piloto (270 litros)

Se muestra en este ejemplo el efecto de la concentración de oxígeno disuelto en la actividad celulolítica de la composición de enzima o cóctel de enzimas durante la hidrólisis de material de alimentación lignocelulósico a escala piloto (270 litros). Las reacciones de hidrólisis se realizaron con material de alimentación de rastrojo de maíz pretratado con ácido (aCS) a una concentración (final) de 20% p/p de DM. La solución de material de alimentación se preparó mediante la dilución de la suspensión concentrada de material de alimentación con agua. El pH se ajustó a pH 4,5 con una solución de NH₄OH al 25% (p/p).

La hidrólisis enzimática se realizó en un reactor piloto de 270 litros que fue controlado en pH y temperatura con un volumen de trabajo de 150 litros. El oxígeno disuelto durante el procedimiento se controló ajustando la velocidad del impulsor a un flujo de aire y sobrepresión dados. La hidrólisis enzimática se realizó con una dosis de 3,75 mg de proteína TCA/g de DM de composición de enzima celulasa TEC-210. TEC-210 se produjo de acuerdo con los procedimientos de inoculación y fermentación descritos en el documento WO2011/000949.

Se realizaron los siguientes experimentos:

- 150 l de aCS al 20%, pH 4.5, temperatura 62 °C, sin sobrepresión, sin flujo de aire, 3.75 mg de TCA/g dm de composición de celulasa TEC-210, tiempo de incubación 120 horas en un reactor piloto de 270 litros. La concentración de oxígeno disuelto (DO) de la mezcla de reacción se midió constantemente utilizando un electrodo de DO. El DO se controló a un nivel de 0.01 mol/m³ ajustando la velocidad del impulsor.
- 150 l de aCS al 20%, pH 4.5, temperatura 62 °C, sobrepresión de 1 bar, flujo de aire de 10 kg/h en el espacio de cabeza del reactor, 3.75 mg de TCA/g dm de composición de celulasa TEC-210, tiempo de incubación 120 horas en un reactor piloto de 270 litros. La concentración de oxígeno disuelto (DO) de la

mezcla de reacción se midió constantemente utilizando un electrodo de DO. El DO se controló a un nivel de 0,2 mol/m³ ajustando la velocidad del impulsor.

Durante la hidrólisis enzimática, se tomaron muestras diariamente para análisis de hidratos de carbono (glucosa, celobiosa) por RMN y medición de la viscosidad y el pH.

- 5 El análisis de la composición del rastrojo de maíz pre-tratado con ácido (aCS) se realizó por hidrólisis química de la muestra y determinación de los monosacáridos por RMN.

Las muestras tomadas durante la hidrólisis enzimática se analizaron en cuanto a (oligo)azúcares, ácidos orgánicos e inhibidores mediante RMN de flujo.

- 10 La conversión se calculó en base a la concentración de glucano medida (g/kg) al comienzo de la hidrólisis enzimática y la concentración de glucosa (g/l) que se midió durante la hidrólisis enzimática.

Los resultados se presentan en la Fig. 2.

- 15 Este ejemplo demuestra que a volúmenes de reactor grandes, por ejemplo 100 litros o más, la adición de oxígeno (en forma de aire) mejora fuertemente la hidrólisis del material lignocelulósico pre-tratado. En escalas de 1 m³ o más, o 10 m³ o más o 50 m³ o más de contenido de reactor, se encontrará una mejora similar en la conversión durante la hidrólisis.

Ejemplo 3

El efecto del oxígeno sobre la actividad celulolítica de composiciones de enzima celulasa durante la hidrólisis del material de alimentación lignocelulósico utilizando una dosis baja de enzima

- 20 El efecto del oxígeno sobre la actividad celulolítica de la composición enzimática utilizando una dosis baja de la enzima durante la hidrólisis del material de alimentación lignocelulósico se muestra en este ejemplo. Las reacciones de hidrólisis se realizan con material de alimentación de rastrojo de maíz pre-tratado con ácido (aCS) a una concentración final de 20% p/p de DM. Esta solución de material de alimentación se prepara mediante la dilución de una solución de material de alimentación concentrado con agua. Posteriormente, el pH se ajusta a pH 4,5 con una solución de NH₄OH al 10% (p/p). El contenido en glucano del rastrojo de maíz aplicado fue del 37% en materia seca.

- 25 La hidrólisis se realiza en un reactor agitado, controlado en pH y controlado en temperatura con un volumen de trabajo de 1 l. Cada una de las hidrólisis se lleva a cabo por duplicado con 2,5 mg/g de DM de composición (o cóctel) de enzima celulasa TEC-210. TEC-210 se produjo de acuerdo con los procedimientos de inoculación y fermentación descritos en el documento WO2011/000949.

Se realizan los siguientes experimentos:

- 30 1. 1 l de aCS al 20%, pH 4.5, temperatura 62 °C, velocidad del agitador 60 rpm, 3.5 mg de composición de celulasa TEC-210 por gramo de material de alimentación (en materia seca), tiempo de incubación 120 horas (experimento de referencia) en un reactor cerrado. El nivel de oxígeno disuelto de la mezcla de reacción se midió constantemente utilizando un electrodo de DO. Esta agitación lenta dio como resultado un nivel de oxígeno disuelto de 0,005 mol/m³.
- 35 2. Como el experimento 1, pero utilizando una dosis de enzima de 2.5 mg de TEC-210 por gramo de material de alimentación (en materia seca) y una velocidad del agitador de 250 rpm en un espacio de cabeza sobre la mezcla de reacción que se refresca constantemente con aire fresco. La mayor velocidad de agitación en combinación con el refresco del espacio de cabeza con aire fresco dio como resultado un nivel de oxígeno disuelto de 0,030 mol/m³ en la mezcla de reacción.
- 40 Durante la hidrólisis, se tomaron muestras para el análisis. Las muestras se enfriaron en hielo e inmediatamente se diluyeron 50 µl de cada uno de los sobrenadantes en 1450 µl de agua de calidad I. El sobrenadante diluido se filtra posteriormente (filtro de 0,45 µm, Pall PN 454) y se analiza el contenido de azúcar en los filtrados tal como se describe a continuación.

- 45 Las concentraciones de azúcar de las muestras diluidas se miden utilizando una HPLC equipada con una columna Aminex HPX-87P (Biorad nº 1250098) por elución con agua a 85 °C a un caudal de 0,6 ml por minuto y se cuantificaron por integración de las señales de glucosa de la detección del índice de refracción (R.I.) calibradas con soluciones estándar de glucosa.

Los resultados se presentan en la Fig. 3.

Las conversiones de glucano se enumeran en la Tabla 2.

Tabla 2: Niveles de conversión de glucano

| Experimento | Dosis de enzimas (mg/g dm) | Nivel de DO mol/m³ | Conversión de glucano (%) |
|--------------------|---------------------------------------|--|--------------------------------------|
| 1 | 2,5 | 0,030 | 75 |
| 2 | 3,5 | 0,005 | 70 |

5

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de un producto de azúcar a partir de material lignocelulósico, que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) opcionalmente, pretratamiento del material lignocelulósico;
 - b) opcionalmente, lavar el material lignocelulósico opcionalmente pre-tratado;
 - c) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pre-tratado utilizando una composición enzimática que comprende al menos dos celulasas y en donde la composición enzimática comprende al menos GH61; y
 - 10 d) opcionalmente recuperación de un producto de azúcar;
- en el que durante la etapa de hidrólisis enzimática (c) se añade oxígeno al material lignocelulósico, el reactor para la hidrólisis enzimática tiene un volumen de 1 m³ o más y el contenido de materia seca en la etapa de hidrólisis (c) es de 10 a 33% en peso.
2. Procedimiento para la preparación de un producto de fermentación a partir de material lignocelulósico, que comprende las siguientes etapas:
- 15 a) opcionalmente, pretratamiento del material lignocelulósico;
 - b) opcionalmente, lavar el material lignocelulósico opcionalmente pre-tratado;
 - c) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/o pre-tratado, opcionalmente utilizando una composición enzimática que comprende al menos dos celulasas y en donde la composición enzimática comprende al menos GH61;
 - 20 d) fermentación del material lignocelulósico hidrolizado para producir un producto de fermentación; y
 - e) opcionalmente, recuperación de un producto de fermentación;
- en el que durante la etapa de hidrólisis enzimática (c) se añade oxígeno al material lignocelulósico, el reactor para la hidrólisis enzimática tiene un volumen de 1 m³ o más y el contenido de materia seca en la etapa de hidrólisis (c) es de 10 a 33% en peso.
- 25 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el oxígeno se añade en forma de burbujas.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el tiempo de hidrólisis enzimática es de 5 a 150 horas.
5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la composición enzimática utilizada conserva la actividad durante 30 horas o más.
- 30 6. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la hidrólisis se realiza a una temperatura de 45°C o más.
7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la composición enzimática se deriva de un hongo o la composición enzimática comprende una enzima fúngica.
8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el contenido de materia seca en la etapa de hidrólisis (c) es 14 a 33% en peso.
- 35 9. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la hidrólisis enzimática se lleva a cabo en un reactor de cultivo discontinuo, semi-discontinuo y/o continuo.
10. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el oxígeno se introduce como un gas que contiene oxígeno.
- 40 11. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que la fermentación se realiza con un microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar C5.

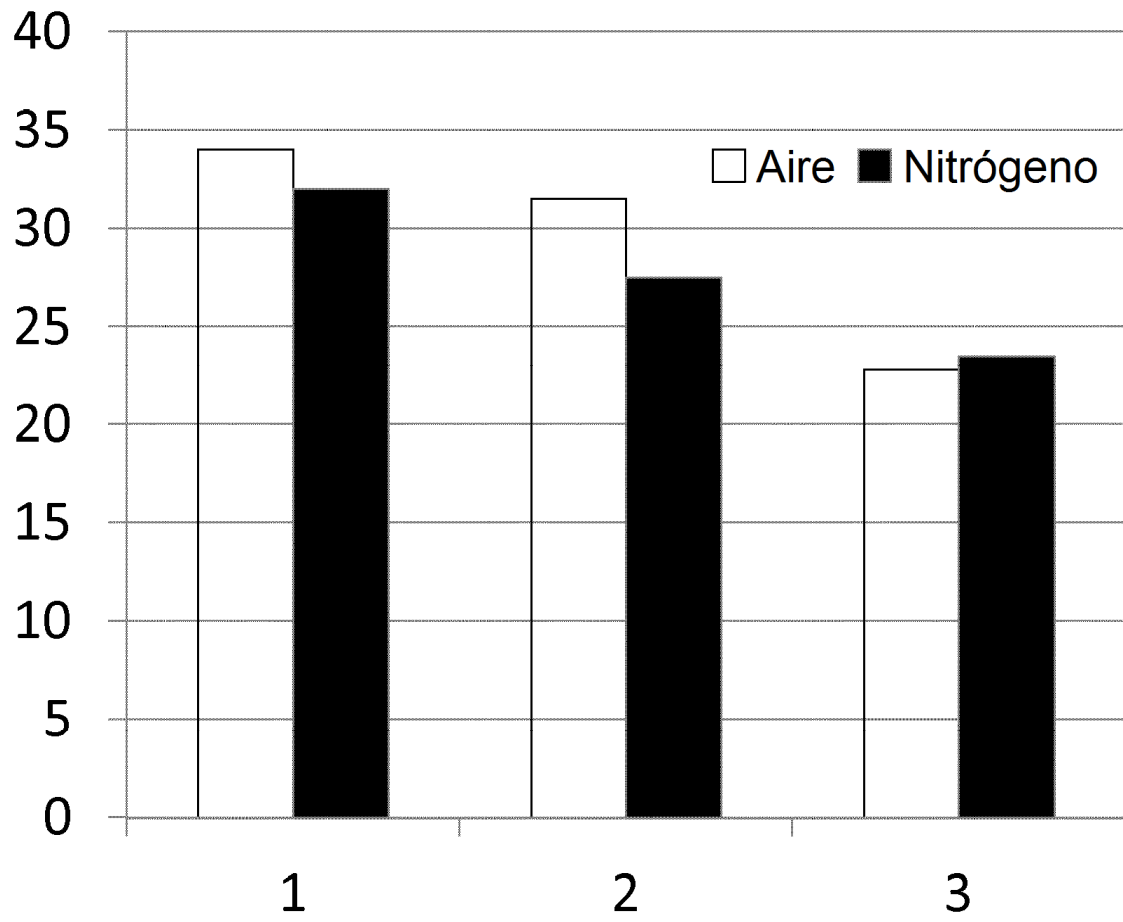


Fig.1

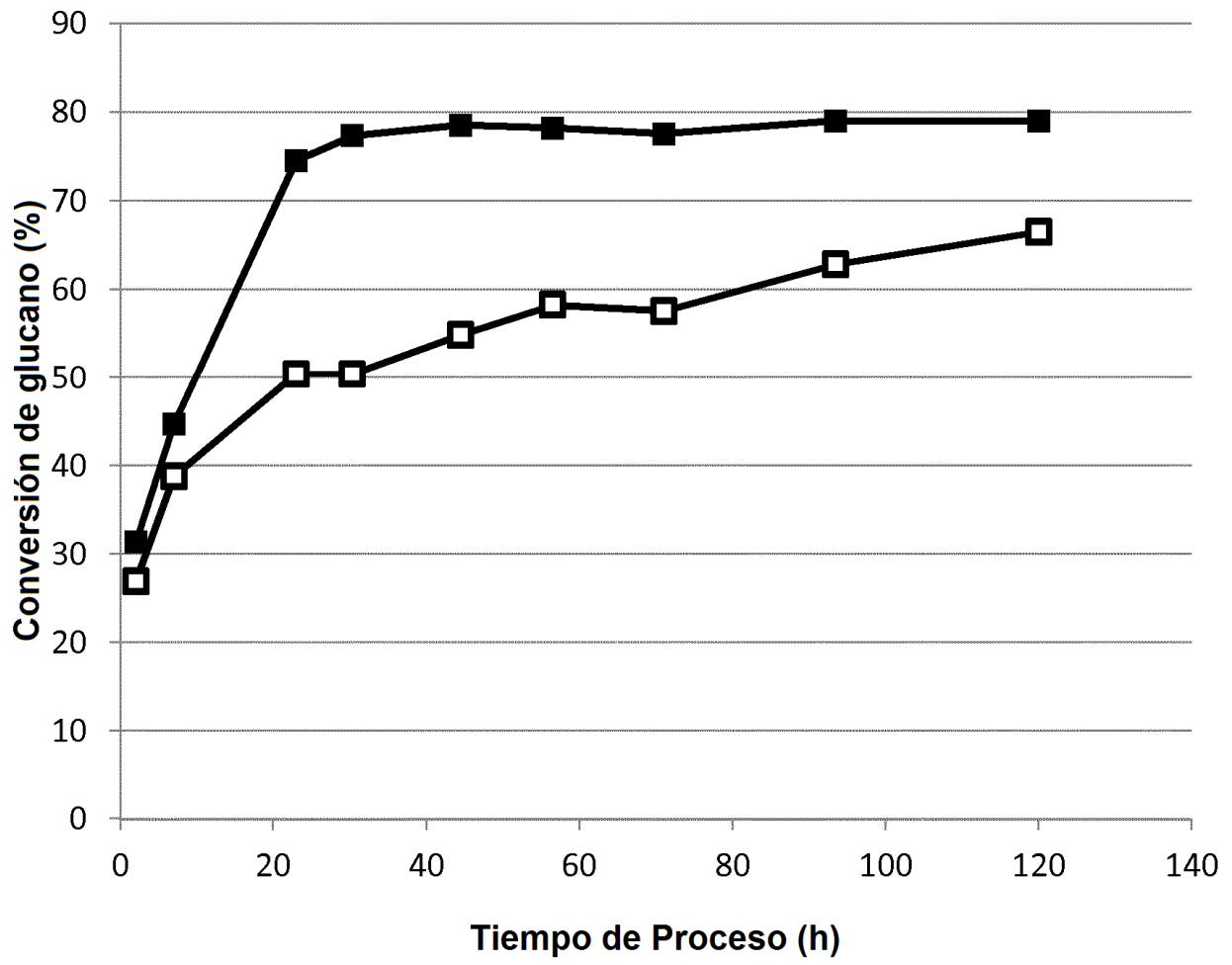


Fig.2

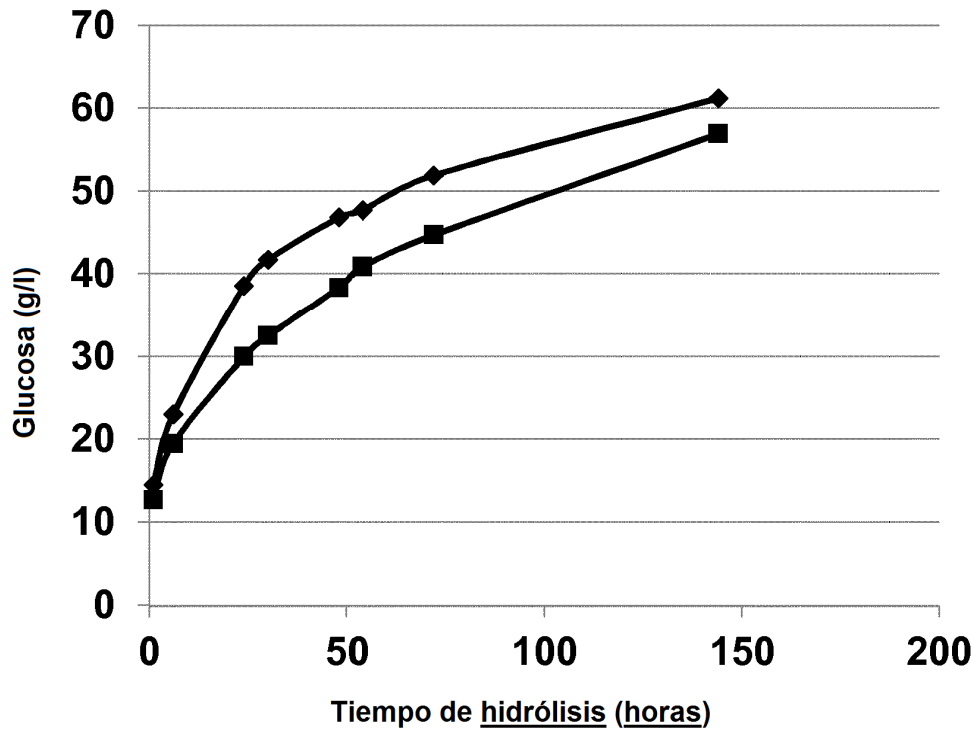


Fig.3