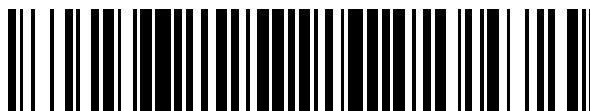


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 245**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2008 E 17164534 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 3219804**

54 Título: **Detoxificación de materiales que contienen lignocelulosa pretratados**

30 Prioridad:

**24.04.2007 US 913581 P**

**26.06.2007 US 946272 P**

**19.11.2007 US 988949 P**

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

**16.03.2020**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC. (33.3%)**

**77 Perry Chapel Church Road  
Franklinton, North Carolina 27525, US;**

**NOVOZYMES INC. (33.3%) y**

**NOVOZYMES A/S (33.3%)**

72 Inventor/es:

**QIMING, JIN;**

**LIU, JIYIN;**

**CASSLAND, BJÖRN L. P. A. y**

**HIGGINS, DONALD L.**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 748 245 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**

Detoxificación de materiales que contienen lignocelulosa pretratados

**5 Campo técnico**

[0001] La presente invención se refiere a procesos de producción de un producto de fermentación de material que contiene lignocelulosa usando un organismo de fermentación que incluye una etapa de proceso de detoxificación.

**10 Antecedentes de la invención**

[0002] Debido a las limitadas reservas de combustibles fósiles y a la preocupación por la emisión de gases invernadero ha habido una creciente focalización en el uso de fuentes de energía renovable. La producción de productos de fermentación de material que contiene lignocelulosa es conocida en la técnica y de forma convencional incluye pretratamiento, hidrólisis, y fermentación del material que contiene lignocelulosa. El pretratamiento produce la liberación de, por ejemplo, fenoles y furanos, del material que contiene lignocelulosa que puede irreversiblemente enlazar enzimas añadidas durante la hidrólisis y la fermentación. Estos compuestos pueden también ser tóxicos para el metabolismo fermentador del organismo e inhibir el rendimiento del organismo fermentador.

[0003] La detoxificación por extracción de vapor ha sido sugerida pero es voluminosa y es una etapa adicional costosa del proceso. También se ha sugerido lavar el material que contiene lignocelulosa pretratado antes de la hidrólisis. Esto requiere cantidades enormes de agua, que se tiene que eliminar nuevamente, y es por lo tanto también costoso.

[0004] El documento WO 2005/074656 describe métodos para producir sustancias orgánicas, tales como alcoholes, mediante la sacarificación de material celulósico con una cantidad efectiva de una proteína celulolítica en presencia de una cantidad efectiva de un polipéptido que tiene actividad potenciadora celulolítica; y la fermentación de dicho material celulósico sacarificado con uno o más organismos fermentadores. La proteína y el polipéptido celulolíticos que tienen actividad potenciadora celulolítica pueden complementarse con una o más enzimas adicionales, para mejorar la degradación del material celulósico, seleccionado del grupo de hemicelulasa, esterasa, proteasa, lacasa y peroxidasa.

[0005] Palonen et al. (2004), *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 86, n.º 5, pp. 550-557, describe el tratamiento de madera blanda pretratada con vapor con lacasa y celulasa para determinar si el tratamiento con lacasa tendría un efecto desintoxicante en la hidrólisis de la celulasa.

[0006] Tabka et al. (2006), *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 39, n.º 4, pp. 897-902 se refiere a la sacarificación enzimática de paja de trigo para la producción de bioetanol por tratamiento con celulasa, xilanasas, feruloil esterasa y/o oxidorreductasa.

[0007] Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar procesos para detoxificar material que contiene lignocelulosa pretratado adecuados para los procesos de producción de productos de fermentación.

**45 Resumen de la invención**

[0008] La invención se refiere a procesos de producción de un producto de fermentación de material que contiene lignocelulosa usando un organismo fermentador que incluye una etapa de proceso de detoxificación

[0009] La invención se refiere a procesos para producir un producto de fermentación de material que contiene lignocelulosa que incluye las etapas de:

- (i) pretratamiento de material que contiene lignocelulosa;
- (ii) detoxificación que comprende someter el material que contiene lignocelulosa pretratado a una o más enzimas oxidantes de compuestos fenólicos y/o una o más enzimas con actividad de peroxidasa;
- (iii) hidrólisis del material de la etapa (ii) con una celulasa; y
- (iv) fermentación del material hidrolizado de la etapa (iii) usando un organismo de fermentación, donde la desintoxicación se lleva a cabo antes de la hidrólisis;

60 en donde los sólidos, después del pretratamiento del material que contiene lignocelulosa en la etapa (i), se eliminan/separan de la solución antes de la detoxificación; y en donde los sólidos eliminados y la solución detoxificada se combinan antes de la hidrólisis en la etapa (iii).

**Breve descripción de las figuras**

65

[0010] La Figura 1 muestra el efecto del tratamiento de lacasa en la conversión de celulosa.

**Descripción detallada de la invención**

5 [0011] La invención se refiere a un proceso para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene lignocelulosa utilizando un organismo de fermentación e incluyendo una etapa de proceso de detoxificación.

Material que contiene lignocelulosa

10 [0012] El término "materiales que contienen lignocelulosa" usado aquí se refiere a material que principalmente consiste en celulosa, hemicelulosa, y lignina. Frecuentemente tal material es denominado "biomasa".

15 [0013] La estructura de lignocelulosa no es directamente accesible a la hidrólisis enzimática. Por lo tanto, la lignocelulosa tiene que ser tratada previamente, por ejemplo, por hidrólisis ácida bajo condiciones adecuadas de presión y temperatura, para romper el sello de lignina y romper la estructura cristalina de celulosa. Esto causa la solubilización y la sacarificación de la fracción de hemicelulosa. La fracción de celulosa puede después ser hidrolizada enzimáticamente, por ejemplo, por enzimas de celulasa (o enzimas celulolíticas), para convertir los polímeros de carbohidrato en azúcares fermentables que se pueden fermentar en un producto de fermentación deseado, tal como etanol. Opcionalmente el producto de fermentación es recuperado después de la fermentación, por ejemplo, por destilación.

25 [0014] Cualquier material que contiene lignocelulosa está contemplado conforme a la presente invención. El material que contiene lignocelulosa puede ser cualquier material que contenga lignocelulosa. En una forma de realización preferida el material que contiene lignocelulosa contiene al menos 30 % en peso, preferiblemente al menos 50 % en peso, más preferiblemente al menos 70 % en peso, incluso más preferiblemente al menos 90 % en peso de lignocelulosa. Debe entenderse que el material que contiene lignocelulosa puede también comprender otros ingredientes tal como material celulósico, incluyendo celulosa y hemicelulosa, y puede también comprender otros ingredientes tal como material proteínico, almidón, azúcares, tal como azúcares fermentables y/o azúcares no fermentables.

30 [0015] El material que contiene lignocelulosa se encuentra generalmente, por ejemplo, en los tallos, hojas, cascarillas, cáscaras, y mazorcas de plantas u hojas, ramas, y madera de árboles. El material que contiene lignocelulosa puede también ser, pero no está limitado a, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos de silvicultura, residuos sólidos municipales, residuos de papel, y residuos de fábrica de papel y pulpa. Se entiende aquí que el material que contiene lignocelulosa puede estar en forma de material de pared celular vegetal que contiene lignina, celulosa, y hemicelulosa en una matriz mezclada.

40 [0016] En una forma de realización preferida el material que contiene lignocelulosa es fibra de maíz, paja de arroz, madera de pino, astillas de madera, álamo, bagazo, residuos del procesamiento del papel y de la pulpa.

[0017] Otros ejemplos incluyen forraje de maíz, madera dura, tal como álamo y abedul, madera de coníferas, paja de cereal, tal como paja de trigo, mijo perenne, residuos sólidos municipales (MSW), residuos orgánicos industriales, papel de oficina, o mezclas derivadas.

45 [0018] En una forma de realización preferida el material que contiene lignocelulosa es forraje de maíz. En otra forma de realización preferida el material es fibra de maíz.

**Proceso de detoxificación de material que contiene lignocelulosa pretratado**

50 [0019] Cuando el material que contiene lignocelulosa es pretratado, se producen productos de degradación que pueden inhibir enzimas y/o pueden ser tóxicos para organismos fermentadores. Estos productos de degradación reducen seriamente tanto el índice de hidrólisis como el de fermentación.

55 [0020] Métodos para pretratar material que contiene lignocelulosa son conocidos en la técnica. Ejemplos de métodos contemplados son descritos abajo en la sección "Pretratamiento".

60 [0021] Los presentes inventores han descubierto que enzimas de oxidación de compuestos fenólicos pueden utilizarse para detoxificar material que contiene lignocelulosa pretratado. El tiempo de fermentación puede ser reducido como resultado del rendimiento mejorado del organismo fermentador durante la fermentación. En otras palabras, la detoxificación conforme a la invención puede suponer un tiempo de proceso "de producto de material que contiene lignocelulosa para fermentación" más corto. Además, la necesidad de una etapa de lavado después del pretratamiento del material que contiene lignocelulosa, para eliminar compuestos tóxicos, y/o adaptación del organismo de fermentación al medio/caldo puede ser eliminado. También, se puede reducir la dosificación del organismo de fermentación.

65 [0022] El material que contiene lignocelulosa pretratado y detoxificado se puede tratar con celulasa (enzimas

celulolíticas).

[0023] Ejemplos específicos de compuestos de detoxificación se pueden encontrar en la sección "Compuestos detoxificantes" más abajo.

5 [0024] Se describen procesos para detoxificar material que contiene lignocelulosa pretratado que comprenden someter el material que contiene lignocelulosa pretratado a una o más enzimas de oxidación de compuestos fenólicos y/o a una o más enzimas que muestren actividad de peroxidasa.

10 [0025] Los productos de degradación de lignocelulosa pretratados incluyen productos de degradación de lignina, productos de degradación de celulosa y productos de degradación de hemicelulosa. Los productos de degradación de lignina pretratados pueden ser los fenoles en la naturaleza.

15 [0026] Los productos de degradación de hemicelulosa incluyen furanos de azúcares (tales como hexosas y/o pentosas), incluyendo xilosa, manosa, galactosa, ramnosa, y arabinosa. Ejemplos de hemicelulosas incluyen xilano, galactoglucomanano, arabinogalactano, arabinoglucuronoxilano, glucuronoxilano, y derivados y combinaciones de los mismos.

20 [0027] Ejemplos de compuestos inhibitorios, es decir, productos de degradación de lignocelulosa pretratados, incluyen alcohol 4-OH bencílico, 4-OH benzaldehído, ácido 4-OH benzoico, trimetil benzaldehído, ácido 2-furoico, ácido cumárico, ácido ferúlico, fenol, guayacol, veratrol, pirogalolol, pirogalol mono metil éter, alcohol vanílico, vainilina, isovainilina, ácido vanílico, ácido isovanílico, 4-hidroxi-3-metoxifenilacetato, alcohol veratrílico, veratraldehído, ácido verátrico, ácido 2-O-metil gálico, siringil alcohol, siringaldehído, ácido siringico, ácido trimetilgálico, homocatecol, vainilina etílica, creosol, anisol metílico, anisaldehído, ácido anísico, furfural, hidroximetilfurfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido fórmico, ácido acético, ácido levulínico, ácido cinámico, aldehído coniferílico, isoeugenol, hidroquinona, eugenol o combinaciones de los mismos. Otros compuestos inhibitorios pueden ser encontrados en, por ejemplo, Luo et al., 2002, Biomass and Bioenergy 22: 125-138.

30 [0028] La etapa de proceso de detoxificación puede preferiblemente efectuarse a un pH que es conveniente de las enzimas oxidantes de compuestos fenólicos y enzima(s) hidrolizantes y/o organismos fermentadores si la detoxificación se realiza simultáneamente con hidrólisis o simultáneamente con hidrólisis y fermentación. En una forma de realización el pH está entre 2 y 7, preferiblemente entre 3 y 6, especialmente entre 4 y 5. En una forma de realización preferida la temperatura durante la detoxificación es una temperatura adecuada para la(s) enzima(s) oxidante(s) de compuestos fenólicos y/o enzima que muestra actividad de peroxidasa y enzima(s) hidrolizante(s) y/o organismo fermentador si la detoxificación se realiza simultáneamente con la hidrólisis o simultáneamente con la hidrólisis y la fermentación. En una forma de realización la temperatura durante la detoxificación está entre 25°C y 70°C, preferiblemente entre 30°C y 60°C. En los casos donde la detoxificación se realiza simultáneamente con la fermentación la temperatura dependerá del organismo fermentador. Para fermentaciones de etanol con levadura la temperatura sería de entre 26-38°C, tal como entre 26-34°C o entre 30-36°C, tal como alrededor de 32°C.

40 [0029] Los pH adecuados, temperaturas y otras condiciones del proceso pueden fácilmente ser determinadas por un experto en la técnica.

#### Enzimas detoxificantes

45 [0030] La(s) enzima(s) detoxificantes puede(n) ser de cualquier origen incluyendo de origen mamífero, vegetal y microbiano, tal como de origen bacteriano y fúngico.

50 [0031] Enzimas oxidantes de compuestos fenólicos pueden en formas de realización preferidas pertenecer a cualquiera de las siguientes clases EC incluyendo: catecol oxidasa (EC 1,10,3,1), lacasa (EC 1,10,3,2), O-aminofenol oxidasa (1,10,3,4); y monofenol-monoxigenasa (1,14,18,1).

55 [0032] La enzima que muestra actividad de peroxidasa puede en una forma de realización preferida pertenecer a cualquiera de las siguientes clases EC incluyendo aquellas seleccionadas del grupo que consiste en una peroxidasa (EC 1,11,1,7), haloperoxidasa (EC1,11,1,8 y EC 1,11,1,10); lignina peroxidasa (EC 1,11,1,14); manganeso peroxidasa (EC 1,11,1,13); y lipoxigenasa (EC.1,13,11,12).

60 [0033] Ejemplos de enzimas detoxificantes contemplados conforme a la invención se pueden encontrar en las sección "Enzimas" - más abajo.

#### **Producción de productos de fermentación a partir de material que contiene lignocelulosa**

[0034] La presente invención se refiere a procesos de producción de productos de fermentación a partir de material que contiene lignocelulosa, que comprenden las etapas de:

65 (i) pretratamiento de material que contiene lignocelulosa;

- (ii) detoxificación que comprende someter el material que contiene lignocelulosa pretratado a una o más enzimas oxidantes de compuestos fenólicos y/o una o más enzimas con actividad de peroxidasa;  
 (iii) hidrólisis del material de la etapa (ii) con una celulasa; y  
 (iv) fermentación del material hidrolizado de la etapa (iii) usando un organismo de fermentación, donde la desintoxicación se lleva a cabo antes de la hidrólisis;

en donde los sólidos, después del pretratamiento del material que contiene lignocelulosa en la etapa (i), se eliminan/separan de la solución antes de la detoxificación; y en donde los sólidos eliminados y la solución detoxificada se combinan antes de la hidrólisis en la etapa (iii).

[0035] La conversión de material que contiene lignocelulosa en productos de fermentación, tal como etanol, tiene las ventajas de la disponibilidad dispuesta de cantidades grandes de materia prima, incluyendo madera, residuos agrícolas, brotes herbáceos, residuos sólidos municipales, etc.

[0036] La estructura de la lignocelulosa no es directamente accesible a hidrólisis enzimática. Por lo tanto, el material que contiene lignocelulosa tiene que ser pretratado, por ejemplo, por hidrólisis ácida bajo condiciones adecuadas de presión y temperatura, para romper el sello de lignina y romper la estructura cristalina de la celulosa. Esto causa la solubilización de las fracciones de hemicelulosa y de celulosa. La celulosa y la hemicelulosa pueden después ser hidrolizadas enzimáticamente, por ejemplo, por enzimas de celulosa (enzimas celulolíticas), para convertir los polímeros de carbohidratos en azúcares fermentables que se pueden fermentar en un producto de fermentación deseado, tal como etanol. Opcionalmente el producto de fermentación puede ser recuperado, por ejemplo, por destilación.

[0037] Se puede añadir una o más enzimas detoxificantes después de la etapa de pretratamiento (i), pero antes de la etapa de hidrólisis (iii). La etapa de detoxificación (ii) se puede llevar a cabo por separado respecto de la hidrólisis. La etapa de hidrólisis (iii) y la etapa de fermentación (iv) se pueden realizar simultánea o consecutivamente. Según la invención, los sólidos (que comprenden principalmente lignina y polisacáridos no convertidos), después del pretratamiento del material que contiene lignocelulosa en la etapa (i), se eliminan/separan de la solución antes de la detoxificación. Los sólidos eliminados y la solución detoxificada se combinan antes de la hidrólisis en la etapa (iii) o de la hidrólisis y fermentación simultáneas.

[0038] Los sólidos se pueden eliminar/separar en cualquier vía adecuada conocida en la técnica. En formas de realización adecuadas los sólidos se eliminan por filtración, o usando una prensa de filtro y/o centrifugador, o similar. El efecto inhibitorio reducido de las enzimas de hidrolización se evalúa en el ejemplo 4.

[0039] Ejemplos de métodos de pretratamiento, hidrólisis y condiciones de fermentación para ambas formas de realización anteriores se describen abajo.

#### **Pretratamiento**

[0040] El objetivo del pretratamiento es separar y/o liberar celulosa; hemicelulosa y/o lignina y de esta manera mejorar el índice de hidrólisis. Los métodos de pretratamiento tal como oxidación en húmedo y pretratamiento se dirigen a la lignina, mientras que el ácido diluido y la autohidrólisis se dirigen a la hemicelulosa. La explosión de vapor es un ejemplo de un pretratamiento dirigido a la celulosa.

[0041] Según la invención el pretratamiento en la etapa (i) puede ser una etapa de pretratamiento convencional que usa técnicas bien conocidas en la técnica. Ejemplos de pretratamientos adecuados son descritos más abajo. En una forma de realización preferida el pretratamiento se desarrolla en suspensión acuosa.

[0042] El material que contiene lignocelulosa puede durante el pretratamiento estar presente en una cantidad de entre 10-80 % en peso, preferiblemente entre 20-70 % en peso, especialmente entre 30-60 % en peso, tal como alrededor del 50 % en peso.

#### **Pretratamiento químico, mecánico y/o biológico**

[0043] El material que contiene lignocelulosa puede según la invención ser químicamente, mecánicamente y/o biológicamente pretratado antes de la hidrólisis y/o fermentación. El tratamiento mecánico (frecuentemente referido como tratamiento físico) puede ser utilizado sólo o en combinación con hidrólisis simultánea o posterior, especialmente hidrólisis enzimática.

[0044] Preferiblemente, el pretratamiento químico, mecánico y/o biológico se realiza antes de la hidrólisis y/o fermentación. Alternativamente, el pretratamiento químico, mecánico y/o biológico se puede realizar simultáneamente con hidrólisis, tal como simultáneamente con adición de una o más enzimas de celulosa (enzimas celulolíticas), u otras actividades enzimáticas mencionadas más abajo, para liberar, por ejemplo, azúcares fermentables, tales como glucosa y/o maltosa.

[0045] En una forma de realización de la invención el material que contiene lignocelulosa pretratado puede ser lavado antes y/o después de la detoxificación. No obstante, el lavado no es obligatorio y es eliminado en una forma de realización preferida.

5 [0046] Según la invención, se añaden una o más enzimas detoxificantes al material que contiene lignocelulosa preparado en la etapa (ii).

[0047] La etapa de detoxificación (ii) se puede llevar a cabo por separado de la etapa de hidrólisis (iii) y de la etapa de fermentación (iv), respectivamente, que en una forma de realización se pueden realizar simultánea o consecutivamente. En otra forma de realización, todas las etapas (i), (ii), (iii), y (iv), respectivamente, se realizan secuencialmente. Cuando la detoxificación se realiza como etapa por separado, típicamente se lleva a cabo durante 1-24 horas.

10 [0048] En una forma de realización preferida, el material que contiene lignocelulosa pretratado está sin lavar.

[0049] En una forma de realización la(s) enzima(s) oxidante(s) de compuestos fenólicos es(son) dosificada(s) en el intervalo por encima de 0, tal como 0,01 a 1 mg/g DS o en el intervalo por encima de 0 a 100 LACU/g DS. En una forma de realización la(s) enzima(s) que muestra(n) actividad de peroxidasa es(son) dosificada(s) en el intervalo por encima de 0, tal como 0.01 a 10 mg/g DS o por encima de 0, tal como 0.01 a 100 PODU/g DS.

20 Pretratamiento químico

[0050] El término "tratamiento químico" se refiere a cualquier pretratamiento químico que promueve la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina. Ejemplos de pretratamientos químicos adecuados incluyen tratamiento con; por ejemplo, ácido diluido, cal, solvente alcalino orgánico, amoníaco, dióxido de azufre, dióxido de carbono. Además, oxidación en húmedo e hidrotermólisis controlada por pH son también consideradas pretratamiento químico.

[0051] En una forma de realización preferida el pretratamiento químico es un tratamiento con ácido, más preferiblemente, un tratamiento continuo con ácido diluido y/o moderado, tal como, tratamiento con ácido sulfúrico, u otro ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, cloruro de hidrógeno o mezclas de los mismos. Otros ácidos pueden también ser usados. El tratamiento con ácido moderado significa que el pH del tratamiento se extiende en el intervalo de 1-5, preferiblemente de 1-3. En una forma de realización específica la concentración ácida está en el intervalo de 0.1 a 2.0 % en peso de ácido, preferiblemente ácido sulfúrico. El ácido se puede contactar con el material que contiene lignocelulosa y la mezcla se puede mantener a una temperatura en el intervalo de 160-220°C, tal como 165- 195°C, durante períodos que varían de minutos a segundos, por ejemplo, 1-60 minutos, tal como 2-30 minutos o 3-12 minutos. La adición de ácidos fuertes, tal como ácido sulfúrico, se puede aplicar para eliminar la hemicelulosa. Esto aumenta la digestibilidad de la celulosa.

[0052] Otras técnicas son también contempladas. Se ha mostrado que el tratamiento con solvente de celulosa convierte aproximadamente 90% de celulosa en glucosa. También ha sido mostrado que la hidrólisis enzimática podría ser mucho mayor cuando la estructura de lignocelulosa se rompe. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alcalino, ozono, organosolv (usa ácidos de Lewis, FeCl<sub>3</sub>, (Al)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en alcoholes acuosos), glicerol, dioxano, fenol, o etilenglicol están entre solventes conocidos por romper la estructura de celulosa y promover la hidrólisis (Mosier et al., 2005, Bioresource Technology 96: 673-686).

[0053] El pretratamiento químico alcalino con una base, por ejemplo, NaOH, Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> y/o amoníaco o similar, está también contemplado conforme a la invención. Métodos de pretratamiento usando amoníaco están descritos en, por ejemplo, WO 2006/110891, WO 2006/110899, WO 2006/110900, y WO 2006/110901.

[0054] Técnicas de oxidación en húmedo implican el uso de agentes oxidantes, tales como: agentes oxidantes a base de sulfito o similares. Ejemplos de pretratamientos con solvente incluyen tratamiento con DMSO (dimetilsulfóxido) o similar. El pretratamiento químico es generalmente realizado durante 1 a 60 minutos, tal como 5 a 30 minutos, pero se puede realizar durante periodos de tiempo más cortos o más largos en función del material que debe ser pretratado.

[0055] Otros ejemplos de métodos de pretratamiento adecuados son descritos por Schell et al., 2003, Appl. Biochem and Biotechn. Vol. 105-108: 69-85, y Mosier et al., 2005, Bioresource Technology 96: 673-686, y publicación estadounidense n°. 2002/0164730.

60 Pretratamiento mecánico

[0056] El término "pretratamiento mecánico" se refiere a cualquier tratamiento mecánico (o físico) que promueve la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina del material que contiene lignocelulosa. Por ejemplo, el pretratamiento mecánico incluye varios tipos de molienda, irradiación, explosión de vaporización/vapor, e hidrotermólisis.

[0057] El pretratamiento mecánico incluye trituración (reducción mecánica del tamaño). La trituración incluye molienda en seco, molienda húmeda y molienda con bolas vibratorias. El pretratamiento mecánico puede implicar presión alta y/o temperatura alta (explosión de vapor). En una forma de realización de la invención presión elevada significa presión en el intervalo de 300 a 600 psi, preferiblemente 400 a 500 psi, tal como alrededor de 450 psi. En una forma de realización de la invención temperatura elevada significa temperaturas elevadas en el intervalo de aproximadamente 100 a 300°C, preferiblemente de aproximadamente 140 a 235°C. En una forma de realización preferida pretratamiento mecánico es un proceso discontinuo, sistema hidrolizador de pistola de vapor usando alta presión y alta temperatura tal como se ha definido anteriormente. Se puede utilizar para ello un hidrolizador Sunds (disponible de Sunds Defibrator AB (Suecia).

#### Combinado químico y pretratamiento mecánico

[0058] En una forma de realización preferida ambos pretratamientos mecánicos y químicos son realizados. Por ejemplo, la etapa de pretratamiento puede implicar el tratamiento con ácido diluido o moderado y tratamiento a alta temperatura y/o presión. El pretratamiento mecánico y químico se puede realizar consecutivamente o simultáneamente, según se desee.

[0059] Por consiguiente, en una forma de realización preferida, el material que contiene lignocelulosa es sometido tanto a pretratamiento químico como mecánico para promover la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina.

[0060] En una forma de realización preferida el pretratamiento se realiza como una etapa de explosión de vapor diluida y/o moderada. En otra forma de realización preferida el pretratamiento se realiza como una etapa de explosión de fibra de amoníaco (o etapa de pretratamiento AFEX).

#### Pretratamiento biológico

[0061] Como se usa en la presente invención el término "pretratamiento biológico" se refiere a cualquier pretratamiento biológico que promueve la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa, y/o lignina del material que contiene lignocelulosa. Técnicas de pretratamiento biológico pueden implicar aplicar microorganismos de solubilización de lignina (ver, por ejemplo, Hsu, 1996, Pretreatment of biomass, en Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212 ; Ghosh and Singh, 1993, Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass, Adv. Appl. Microbiol. 39: 295-333; McMillan, 1994, Pretreating lignocellulosic biomass: a review, in Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, Himmel, Baker, y Overend, eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, DC, capítulo 15; Gong, Cao, Du, and Tsao, 1999, Ethanol production from renewable resources, en Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Scheper, ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207-241; Olsson y Hahn- Hagerdal, 1996, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production, Enz. Microb. Tech. 18: 312-331; y Vallander y Eriksson, 1990, Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art, Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 42: 63-95).

#### Hidrólisis

[0062] Antes y/o simultáneamente con la fermentación el material que contiene lignocelulosa pretratado se puede hidrolizar para descomponer celulosa y hemicelulosa.

[0063] El contenido en sustancias secas durante la hidrólisis puede estar en el intervalo de 5-50 % en peso, preferiblemente 10-40 % en peso, preferiblemente 20-30 % en peso. La hidrólisis puede en una forma de realización preferida efectuarse como un proceso de flujo continuo donde el material pretratado que contiene lignocelulosa (sustrato) se alimenta gradualmente a, por ejemplo, una enzima con solución de hidrólisis.

[0064] Según la invención, la hidrólisis se realiza enzimáticamente con una celulasa. En una forma de realización, el material que contiene lignocelulosa pretratado se puede hidrolizar adicionalmente por una o más hidrolasas (clase EC 3 según nomenclatura enzimática), preferiblemente una o más carbohidrasas seleccionadas del grupo que consiste en celulasa, hemicelulasa, amilasa, tal como alfa-amilasa, proteasa, enzima generadora de carbohidrato, tal como glucoamilasa, esterasa, tal como lipasa. Alfa-amilasa, glucoamilasa y/o similares pueden estar presentes durante la hidrólisis y/o fermentación puesto que el material que contiene lignocelulosa puede incluir algún almidón.

[0065] La(s) enzima(s) usada(s) para hidrólisis es(son) capaces de convertir directa o indirectamente polímeros de carbohidrato en azúcares fermentables que se pueden fermentar en un producto de fermentación deseado, tal como etanol.

[0066] En una forma de realización preferida la carbohidrasa tiene actividad enzimática de celulasa. Carbohidrasas adecuadas son descritas en la sección "Enzimas" más adelante.

- 5 [0067] Polímeros de hemicelulosa pueden ser descompuestos por hemicelulasas y/o hidrólisis ácida para liberar sus cinco y seis componentes de azúcar de carbono. Los seis azúcares de carbono (hexosas), tal como glucosa, galactosa, arabinosa, y manosa, pueden rápidamente ser fermentados a, por ejemplo, etanol, acetona, butanol, glicerol, ácido cítrico, ácido fumárico, etc. por organismos de fermentación adecuados incluyendo levadura. Preferida para fermentación del etanol es la levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, preferiblemente cepas que son resistentes a niveles altos de etanol, es decir, hasta, por ejemplo, aproximadamente 10,12 o 15 % vol. de etanol o más, tal como 20 % vol. de etanol.
- 10 [0068] En una forma de realización preferida el material que contiene lignocelulosa pretratado es hidrolizado adicionalmente usando una hemicelulasa, preferiblemente una xilanasas, esterasa, celobiasa, o combinación de las mismas.
- 15 [0069] La hidrólisis puede también ser realizada en presencia de una combinación de hemicelulasas y/o celulasas, y opcionalmente una o más de las otras actividades enzimáticas mencionadas en la sección "Enzima" más abajo.
- 20 [0070] En una forma de realización preferida la hidrólisis y fermentación se realiza como una etapa simultánea de hidrólisis y de fermentación (SSF). En general esto significa que la hidrólisis y fermentación combinada/simultánea se realizan a condiciones adecuadas (p. ej., temperatura y/o pH), preferiblemente óptimas, para el(los) organismo(s) de fermentación en cuestión.
- 25 [0071] En otra forma de realización preferida la hidrólisis y la fermentación se realizan como hidrólisis y fermentación híbridas (HHF). HHF se inicia típicamente con una etapa parcial de hidrólisis separada y termina con una etapa simultánea de hidrólisis y de fermentación. La etapa de hidrólisis separada parcial es una etapa de sacarificación de celulosa enzimática típicamente realizada a condiciones adecuadas (p. ej., a temperaturas más altas), preferiblemente óptimas, para la(s) enzima(s) hidrolizante(s) en cuestión. La etapa posterior simultánea de hidrólisis y de fermentación es típicamente realizada a condiciones adecuadas para el(los) organismo(s) de fermentación (frecuentemente a temperaturas inferiores que la etapa de hidrólisis separada). Finalmente, pueden también ser realizadas una hidrólisis y fermentación separadas, donde la hidrólisis es terminada antes de la iniciación de la fermentación. Esto frecuentemente se refiere como "SHF".
- 30 [0072] Tratamientos enzimáticos se pueden realizar en un entorno acuoso adecuado bajo condiciones que pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la técnica.
- 35 [0073] En una forma de realización preferida la hidrólisis se realiza a condiciones adecuadas, preferiblemente óptimas para la(s) enzima(s) en cuestión.
- 40 [0074] Tiempo de proceso adecuado, condiciones de temperatura y pH pueden rápidamente ser determinadas por un experto en la técnica de la presente invención. Preferiblemente, la hidrólisis se realiza a una temperatura entre 25 y 70°C, preferiblemente entre 40 y 60°C, especialmente alrededor de 50°C. El proceso es preferiblemente realizado a un pH en el intervalo de 3-8, preferiblemente pH 4-6, especialmente alrededor de pH 5.
- 45 [0075] Preferiblemente, la hidrólisis se realiza durante entre 12 y 96 horas, preferible 16 a 72 horas, más preferiblemente entre 24 y 48 horas.
- 50 [0076] Según la invención hidrólisis en la etapa (iii) y fermentación en la etapa (iv) se puede realizar simultáneamente (proceso SSF) o consecutivamente (proceso SHF) o como una hidrólisis y fermentación híbridas (HHF).
- 50 **Fermentación**
- 55 [0077] Según la invención el material que contiene lignocelulosa pretratado (e hidrolizado) se fermenta por al menos un organismo fermentador capaz de fermentar azúcares fermentables, tales como glucosa, xilosa, manosa, y galactosa directa o indirectamente en un producto de fermentación deseado.
- 60 [0078] La fermentación es preferiblemente continuada durante entre 8 a 96 horas, preferiblemente 12 a 72 horas, más preferible de 24 a 48 horas.
- 60 [0079] En una forma de realización la fermentación se realiza a una temperatura entre 20 a 40°C, preferiblemente 26 a 34°C, en particular alrededor de 32°C. En una forma de realización el pH es de pH 3 a 6, preferiblemente alrededor de pH 4 a 5.
- 65 [0080] Contemplado según la invención es hidrólisis y fermentación simultánea (SSF). En una forma de realización no hay etapa de retención separada para la hidrólisis, lo que significa que la(s) enzima(s) de hidrolización y el organismo fermentador son añadidos juntos. Cuando la fermentación (p. ej., fermentación de etanol usando levadura de *Saccharomyces*) se realiza simultánea con hidrólisis de la temperatura es preferiblemente entre 26°C



y 35°C, más preferiblemente entre 30°C y 34°C, tal como alrededor de 32°C. Un programa de temperatura que comprende al menos dos estadios de retención a temperaturas diferentes se puede aplicar según la invención.

5 [0081] El proceso de la invención se puede realizar como un proceso discontinuo, de lote alimentado o como un proceso continuo.

#### Recuperación

10 [0082] Después de la fermentación el producto de fermentación puede ser separado del medio/caldo de fermentación. El medio/caldo se puede destilar para extraer el producto de fermentación o el producto de fermentación puede ser extraído del medio/caldo de fermentación por técnicas de micro o de filtración de membrana. Alternativamente el producto de fermentación se puede recuperar por separación. Métodos de recuperación son bien conocidos en la técnica.

#### Productos de fermentación

15 [0083] Procesos de la invención se pueden utilizar para producir cualquier producto de fermentación. Productos de fermentación especialmente contemplados incluyen alcoholes (p. ej., etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (p. ej., ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico); cetonas (p. ej., acetona); aminoácidos (p. ej., ácido glutámico); gases (p. ej., H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>); antibióticos (p. ej., penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (p. ej., riboflavina, B12, beta-caroteno); y hormonas.

20 [0084] Productos también contemplados incluyen productos de industria de alcohol consumible, por ejemplo, cerveza y vino; productos de industria lechera, por ejemplo, productos lácteos fermentados; productos de la industria del cuero y productos de la industria del tabaco. En una forma de realización preferida el producto de fermentación es un alcohol, especialmente etanol. El producto de fermentación, tal como etanol, obtenido según la invención, puede preferiblemente ser alcohol/etanol de combustible. No obstante, en el caso del etanol éste puede también ser usado como etanol potable.

#### Organismo fermentador

30 [0085] El término "organismo fermentador" se refiere a cualquier organismo, incluyendo organismos fúngicos y bacterianos, adecuados para producir un producto de fermentación deseado. Organismos de fermentación especialmente adecuados según la invención son capaces de fermentar, es decir, convertir azúcares, tal como glucosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado. Ejemplos de organismos de fermentación incluyen organismos fúngicos, tal como levadura. Levadura preferida incluye cepas del género *Saccharomyces*, en particular una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces uvarum*; una cepa de *Pichia*, en particular *Pichia stipitis* o *Pichia pastoris*; una cepa del género *Candida*, en particular una cepa de *Candida utilis*, *Candida arabinofementans*, *Candida diddensii*, o *Candida boidinii*. Otra levadura contemplada incluye cepas de *Hansenula*, en particular *Hansenula polymorpha* o *Hansenula anomala*; cepas de *Kluyveromyces*, en particular *Kluyveromyces marxianus* o *Kluyveromyces fragilis*, y cepas de *Schizosaccharomyces*, en particular *Schizosaccharomyces pombe*.

45 [0086] Organismos fermentadores bacterianos preferidos incluyen cepas de *Escherichia*, en particular *Escherichia coli*, cepas de *Zymomonas*, en particular *Zymomonas mobilis*, cepas de *Zymobacter* en particular *Zymobacter palmae*, cepas de *Klebsiella*, en particular *Klebsiella oxitoca*, cepas de *Leuconostoc*, en particular *Leuconostoc mesenteroides*, cepas de *Clostridium*, en particular *Clostridium butircum*, cepas de *Enterobacter* en particular *Enterobacter aerogenes* y cepas de *Thermoanaerobacter*, en particular *Thermoanaerobacter* BG1L1 (Appl. Microbiol. Biotech. 77: 61-86) y *Thermoanaerobacter ethanolicus*.

50 [0087] Levadura disponible comercialmente incluye, por ejemplo, levadura RED STAR™ o ETHANOL RED™ (disponible de Fermentis/Lesaffre, EEUU), FALI (disponible de Fleischmann's Yeast, EEUU), levadura fresca SUPERSTART y THERMOSACC™ (disponible de Ethanol Technology, WI, EEUU), BIOFERM AFT y XR (disponible de NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, EEUU), GERT STRAND (disponible de Gert Strand, AB, Suecia), y FERMIOL (disponible de DSM Specialties).

#### **Enzimas**

60 [0088] Aunque no se mencione específicamente en el contexto de los procesos de la invención debe ser entendido que las enzimas (así como otros compuestos) se usan en una "cantidad efectiva". Por ejemplo, "cantidad efectiva" significa, en el contexto de enzima(s) de oxidación de compuestos fenólicos que tiene(n) un efecto de mejora en comparación con un proceso correspondiente donde ninguna enzima de oxidación de compuestos fenólicos fue añadida.

#### Enzimas de oxidación de compuestos fenólicos

[0089] Enzimas de oxidación de compuestos fenólicos preferidas pertenecen a cualquiera de las siguientes clases EC: catecol oxidasa (EC 1.10.3.1), lacasa (EC 1.10.3.2), O-aminofenol oxidasa (1.10.3.4); y monofenol-monooxigenasa (1.14.18.1).

## 5 Lacasa

[0090] Las lacasas (EC 1.10.3.2) son enzimas que contienen multicobre que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos. Las lacasas se producen por plantas, bacterias y también una amplia variedad de hongos, incluyendo *Ascomycetes* tal como *Aspergillus*, *Neurospora*, y *Podospora*; *Deuteromycete* incluyendo *Botrytis*, y *Basidiomycetes* tal como *Collybia*, *Fomes*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Trametes*, y formas perfectas de *Rhizoctonia*. Varias lacasas fúngicas han sido aisladas. Por ejemplo, Choi et al. (Mol. Plant-Microbe Interactions 5: 119-128, 1992) describen la caracterización molecular y clonación del gen que codifica la lacasa del hongo del chancro del castaño, *Cryphonectria parasitica*. Kojima et al. (J. Biol. Chem. 265: 15224-15230,1990; JP 2-238885) proporcionan una descripción de dos formas alélicas de la lacasa del basidiomiceto de pudrición blanca *Coriolus hirsutus*. Germann y Lerch (Experientia 41: 801,1985; PNAS USA 83: 8854-8858,1986) han proporcionado la clonación y secuenciación parcial del gen de lacasa de *Neurospora crassa*. Saloheimo et al. (J. Gen. Microbiol. 137: 1537-1544,1985; WO 92/01046) han descrito un análisis estructural del gen de lacasa del hongo *Phlebia radiata*.

[0091] Las lacasas especialmente contempladas incluyen aquellas derivadas de una cepa de *Polyporus*, preferiblemente *Polyporus pinsitus*; *Melanocarpus*, preferiblemente *Melanocarpus albomyces*; *Myceliophthora*, preferiblemente *Myceliophthora thermophila*; *Coprinus*, preferiblemente *Coprinus cinereus*; *Rhizoctonia*, preferiblemente *Rhizoctonia solani* o *Rhizoctonia praticola*; *Scytalidium*, preferiblemente *Scytalidium thermophilum*; *Pyricularia*, preferiblemente *Pyricularia oryzae*.

[0092] En una forma de realización, la lacasa es derivada del árbol *Rhus vernicifera* (Yoshida, 1983, Chemistry of Lacquer (Urushi) parte 1. J. Chem. Soc. 43: 472-486).

[0093] En otra forma de realización, la lacasa se deriva de *Myceliophthora thermophila*, por ejemplo, aquella descrita en WO 95/33836 (Novozymes).

[0094] En otra forma de realización, la lacasa se deriva de *Polyporus pinsitus*, por ejemplo, aquella descrito en WO 96/00290 (Novozymes).

[0095] Jönsson et al., 1998, Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 691-697, también divulga una lacasa adecuada derivada de *Polyporus versicolor*.

[0096] Otras lacasas incluyen aquella derivada de *Pyricularia oryzae* tratada en, por ejemplo, Muralikrishna et al., 1995, Appl. Environ. Microbiol. 61(12): 4374-4377, o la lacasa derivada de *Scytalidium thermophilum*, que está descrito en Abstract of Papers of the American Chemical Society vol. 209, no. 1-2, 1995.

[0097] La lacasa puede también ser un derivado de *Coprinus cinereus*, por ejemplo, aquella tratada en Schneider et al., 1999, Enzyme and Microbial Technology 25: 502-508 .

[0098] Otras lacasas adecuadas incluyen aquellas derivadas de *Rhizoctonia solani* tratada en Waleithner et al., Curr. Genet., 1996,29: 395-403, o derivado de *Melanocarpus albomyces* tratado en Kiiskinen et al., 2004, Microbiology 150: 3065-3074.

[0099] Lacasas bacterianas adecuadas incluyen aquellas derivadas de *Streptomyces coelicolor*, por ejemplo, descritas por Machczynski et al. en Protein Science, 2004, 13: 2388-2397 .

### Enzimas que muestran actividad de peroxidasa

[0100] Según la invención, cualquier enzima que muestre actividad de peroxidasa puede ser utilizada.

[0101] La enzima que muestra actividad de peroxidasa puede ser seleccionada del grupo que consiste en una peroxidasa (EC 1.11.1.7), haloperoxidasa (EC1.11.1.8 y EC 1.11.1.10), lignina peroxidasa (EC 1.11.1.14), manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13); y lipoxigenasa (EC.1,13,11,12).

## 60 Peroxidasa

[0102] La enzima que muestra actividad de peroxidasa puede ser cualquier peroxidasa clasificada como EC 1.11.1.7.

[0103] Las oeroxidasas adecuadas en los procesos de la invención pueden ser de origen vegetal (p. ej., peroxidasa de alfalfa o de semilla de soja), o de origen microbiano, tal como de origen fúngico o bacteriano.

Ejemplos incluyen peroxidasas derivadas de hongos de la subdivisión *Deuteromycotina*, de clase *Hyphomycetes*, por ejemplo, *Fusarium*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Verticillum*, *Arthromyces*, *Caldariomyces*, *Ulocladium*, *Embellisia*, *Cladosporium* o *Dreschlera*, en particular *Fusarium oxysporum* (DSM 2672), *Humicola insolens*, *Trichoderma reesii*, *Myrothecium verrucana* (IFO 6113), *Verticillum alboatrum*, *Verticillum dahlia*, *Arthromyces ramosus* (FERM P-7754), *Caldariomyces fumago*, *Ulocladium chartarum*, *Embellisia alli* o *Dreschlera halodes*.

[0104] Otras peroxidasas adecuadas se derivan de hongos que incluyen cepas de la subdivisión *Basidiomycotina*, de clase *Basidiomycetes*, por ejemplo, *Coprinus*, *Phanerochaete*, *Coriolus* o *Trametes*, en particular *Coprinus cinereus f. microsporus* (IFO 8371), *Coprinus macrorrhizus*, *Phanerochaete chrysosporium* (por ejemplo; NA-12) o *Trametes* (previamente llamada *Polyporus*), por ejemplo, *T. versicolor* (p. ej., PR4 28-A).

[0105] Otras peroxidasas se pueden derivar de cepas que incluyen hongos de la subdivisión *Zygomycotina*, de clase *Mycoraceae*, por ejemplo, *Rhizopus* o *Mucor*, en particular *Mucor hiemalis*.

[0106] Peroxidadas bacterianas se pueden derivar de cepas del orden *Actinomycetales*, por ejemplo, *Streptomyces spheroides* (ATTC 23965), *Streptomyces thermoviolaceus* (IFO 12382) o *Streptoverticillum verticillium ssp. Verticillium*; *Bacillus pumilus* (ATCC 12905), *Bacillus stearothermophilus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodomonas palustris*, *Streptococcus lactis*, *Pseudomonas purrocinia* (ATCC 15958) o *Pseudomonas fluorescens* (NRRL B-11); *Myxococcus*, por ejemplo, *M. virescens*.

[0107] Peroxidadas producidas por recombinación derivadas de *Coprinus sp.*, en particular *C. macrorrhizus* o *C. cinereus* son descritas en WO 92/16634. Variantes de las mismas son descritas en WO 94/12621.

#### Haloperoxidasa

[0108] La enzima que muestra actividad de peroxidasa puede ser cualquier haloperoxidasa. Las haloperoxidasas están extendidas en la naturaleza y se conocen por ser producidas por mamíferos, plantas, algas, líquen, bacterias, y hongos. Hay tres tipos de haloperoxidasas, clasificadas según su especificidad para iones de haluro: cloroperoxidasas (E.C. 1.11.1.10) que catalizan la clorinación, brominación y yodación de compuestos; bromoperoxidasas que muestran especificidad para bromuro y iones de yoduro; y yodoperoxidasas (E.C. 1.11.1.8) que solamente catalizan la oxidación de iones de yoduro.

[0109] Haloperoxidasas incluyen la haloperoxidasa de *Curvularia*, en particular, *C. verruculosa*, tal como, *C. verruculosa* CBS 147,63 o *C. verruculosa* CBS 444,70. *Curvularia haloperoxidasa* y su producción recombinante está descrita en WO97/04102. La bromuro peroxidasa ha sido aislada de algas (ver patente EEUU n°. 4,937,192). Haloperoxidasas son también descritas en la patente EEUU n°. 6,372,465 (Novozymes A/S).

[0110] En una forma de realización preferida, la haloperoxidasa es una cloroperoxidasa (E.C.1,11,1,10). Cloroperoxidasas se conocen en la técnica y se pueden obtener de *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces lividans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Caldariomyces fumago*, *Curvularia inaequalis*, y *Corallina officinalis*. Una cloroperoxidasa preferida es la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* (disponible de SIGMA, C-0278).

[0111] Haloperoxidasas que contienen un grupo protésico de vanadio se conocen por incluir al menos dos tipos de cloroperoxidasas fúngicas de *Curvularia inaequalis* (camioneta Schijndel et al., 1993, Biochimica Biophysica Acta 1161:249-256; Simons et al., 1995, European Journal of Biochemistry 229: 566-574; WO 95/27046) y *Curvularia verruculosa* (WO 97/04102) o haloperoxidasa de *Phaeotrichoconis crotalariae* (WO 2001/079461).

#### Lipoxigenasa (LOX)

[0112] La enzima que muestra actividad de peroxidasa puede ser cualquier lipoxigenasa (LOX). Lipoxigenasas se clasifican como EC 1.13.11.12, que es una enzima que cataliza la oxigenación de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente *cis,cis*-1,4-dienos, por ejemplo, ácido linoleico y produce un hidroperóxido. Pero también otros sustratos pueden ser oxidados, por ejemplo, ácidos grasos monoinsaturados. Lipoxigenasas microbianas pueden ser derivadas de, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum*, *Thermomyces lanuginosus*, *Pyricularia oryzae*, y cepas de *Geotrichum*. La preparación de una lipoxigenasa derivada de *Gaeumannomyces graminis* está descrita en los Ejemplos 3-4 de WO 02/20730. La expresión en *Aspergillus oryzae* de una lipoxigenasa derivada de *Magnaporthe salvinii* está descrita en el ejemplo 2 de WO 02/086114, y esta enzima puede ser purificada usando métodos estándares, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 4 de WO 02/20730.

[0113] La lipoxigenasa (LOX) puede también ser extraída de semillas de plantas, tal como semilla de soja, guisante, garbanzo, y haba de riñón. Alternativamente, la lipoxigenasa se puede obtener de células mamíferas, por ejemplo, reticulocitos de conejo.

#### Celulasas o enzimas celulolíticas

[0114] El término "celulasas" o "enzimas celulolíticas" como se utiliza en este caso son entendidos como comprendiendo las celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91), por ejemplo, celobiohidrolasa I y celobiohidrolasa II, así como las endoglucanasas (EC 3.2.1.4), y beta-glucosidasas (EC 3.2.1.21).

5 [0115] Para ser eficaz, la digestión de celulosa y hemicelulosa requiere diferentes tipos de enzimas que actúan cooperativamente. Al menos tres categorías de enzimas son importantes para convertir celulosa en azúcares fermentables: endoglucanasas (EC 3.2.1.4) cortan cadenas de celulosa aleatoriamente; celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) disocian unidades de celobiosilo de las extremidades de cadena de celulosa y beta-glucosidasas (EC 10 3.2.1.21) convierten celobiosa y celodextrinas solubles en glucosa. Entre estas tres categorías de enzimas implicadas en la biodegradación de celulosa, las celobiohidrolasas son las enzimas clave para la degradación de celulosa cristalina nativa. El término "celobiohidrolasa I" se define aquí como una celulosa con actividad 1,4-beta-celobiosidasa (también referida como exo-glucanasa, exo-celobiohidrolasa o 1,4-beta-celobiohidrolasa), como se define en la clase enzimática EC 3.2.1.91, que cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en la 15 celulosa y celotetraosa, por la liberación de celobiosa de las extremidades no reductoras de las cadenas. La definición del término "actividad celobiohidrolasa II" es idéntica, a excepción de que la celobiohidrolasa II ataca desde las extremidades reductoras de las cadenas.

20 [0116] Endoglucanasas (EC n°. 3.2.1.4) catalizan endo hidrólisis de enlaces 1,4- beta-D-glicosídicos en celulosa, derivados de celulosa (tales como carboximetilcelulosa e hidroxil etil celulosa), liquenina, enlaces beta-1,4 en glucanos beta-1,3 mezclados tal como beta-D-glucanos de cereal o xiloglucanos y otro material vegetal que contiene partes celulósicas. El nombre autorizado es endo-1,4-beta-D-glucan 4-glucano hidrolasa, pero se usa el término abreviado endoglucanasa en la presente especificación.

25 [0117] Las celulasas o enzimas celulolíticas pueden comprender un módulo de unión a carbohidratos (CBM) que potencia la unión de la enzima a una fibra que contiene celulosa y aumenta la eficacia de la parte catalítica activa de la enzima. Un CBM se define como secuencia de aminoácidos contigua dentro de una enzima carbohidrato-activa con un pliegue discreto con actividad de unión a carbohidratos. Para más información sobre CBMs véase, por ejemplo, el servidor de internet CAZy (Supra) o Tomme et al., 1995, en *Enzymatic Degradation of Insoluble Polysaccharides* (Saddler & Penner, eds.), Cellulose-binding domains: classification and properties. págs. 142-163, American Chemical Society, Washington.

30 [0118] La actividad de celulasa puede, en una forma de realización preferida, derivar de una fuente fúngica, tal como una cepa del género *Trichoderma*, preferiblemente una cepa de *Trichoderma reesei*; una cepa del género *Humicola*, tal como una cepa de *Humicola insolens*; o una cepa de *Chrysosporium*, preferiblemente una cepa de *Chrysosporium lucknowense*.

35 [0119] En una forma de realización preferida la preparación de celulasa o de enzima celulolítica es una composición tratada en la solicitud provisional estadounidense de la solicitud pendiente n°. 60/941,251. En una forma de realización preferida la preparación de celulasa o enzima celulolítica que comprende un polipéptido con actividad celulolítica en aumento, preferiblemente un polipéptido de la familia GH61A, preferiblemente uno descrito en WO 2005/074656 (Novozymes). La preparación enzimática celulolítica puede comprender además una beta-glucosidasa, tal como una beta-glucosidasa derivada de una cepa del género *Trichoderma*, *Aspergillus*, o *Penicillium*, incluyendo la proteína de fusión con actividad de beta-glucosidasa descrita en la solicitud provisional estadounidense n°. 60/832,511 (PCT/US2007/074038) (Novozymes). En una forma de realización preferida la 40 preparación enzimática celulolítica puede también comprender una enzima CBH II, preferiblemente celobiohidrolasa II de *Thielavia terrestris* (CEL6A). En otra forma de realización preferida la preparación enzimática celulolítica puede también comprender enzimas celulolíticas, preferiblemente una derivada de *Trichoderma reesei* o *Humicola insolens*.

45 [0120] En una forma de realización específica la preparación enzimática celulolítica puede también comprender un polipéptido con actividad celulolítica en aumento (GH61A) descrita en WO 2005/074656; una CBH II de celobiohidrolasa II de *Thielavia terrestris* (CEL6A); y una beta-glucosidasa (proteína de fusión descrita en la solicitud provisional estadounidense n°. 60/832,511 (o PCT/US2007/074038), y enzimas celulolíticas derivadas de *Trichoderma reesei*.

50 [0121] En otra forma de realización específica la preparación enzimática celulolítica puede también comprender un polipéptido con actividad celulolítica en aumento (GH61A) descrita en WO 2005/074656; una beta-glucosidasa (proteína de fusión descrita en la solicitud provisional estadounidense n°. 60/832,511 (o PCT/US2007/074038), y 55 enzimas celulolíticas derivadas de *Trichoderma reesei*.

[0122] En formas de realización preferidas las preparaciones de celulasa o celulolíticas son preparaciones celulolíticas A y B usadas en los Ejemplos 1 y 4, respectivamente, descritos en la solicitud provisional estadounidense n°. 60/941,251.

60 [0123] En una forma de realización la celulasa es el producto comercialmente disponible CELLULCLAST® 1,5L o 65

CELLUZYME™ (Novozymes A/S, Dinamarca) o ACCELERASE™ 1000 (de Genencor Inc., USA).

[0124] Una celulosa o enzima celulolítica se puede añadir a la hidrolización del material que contiene lignocelulosa pretratada. La celulosa se puede dosificar en el intervalo de 0.1-100 FPU por gramo de sólidos totales (TS), preferiblemente 0.5-50 FPU por gramo de TS, especialmente 1-20 FPU por gramo de TS.

#### Hemicelulasas

[0125] Hemicelulosa puede ser descompuesta por hemicelulasas y/o hidrólisis ácida para liberar sus cinco y seis componentes de azúcar de carbono. En una forma de realización de la invención el material derivado de lignocelulosa se puede tratar con una o más hemicelulasas.

[0126] Cualquier hemicelulosa adecuada para el uso en la hidrolización de hemicelulosa puede ser utilizada. Hemicelulasas preferidas incluyen xilanasas, arabinofuranosidasas, acetil xilano esterasa, feruloil esterasa, glucuronidasas, endo-galactanasa, manasas, endo o exo arabinasas, exo-galactanasas, y mezclas de dos o más de las mismas. Preferiblemente, la hemicelulosa para uso en la presente invención es una hemicelulosa de exoactuación, y más preferiblemente, la hemicelulosa es una hemicelulosa de exo-actuación que tiene la capacidad para hidrolizar hemicelulosa bajo condiciones ácidas de bajo pH 7, preferiblemente pH 3-7. Un ejemplo de hemicelulosa adecuado para el uso en la presente invención incluye VISCOZYME™ (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

[0127] La rabinofuranosidasa (EC 3,2,1,55) cataliza la hidrólisis de residuos terminal no reducidos alfa-L-arabinofuranósidos en alfa- L-arabinósidos.

[0128] La galactanasa (EC 3.2.1.89), arabinogalactano endo-1,4-beta-galactosidasa, cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4-D-galactosídicos en arabinogalactanos.

[0129] La pectinasa (EC 3.2.1.15) cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-alfa-D-galactosidurónicos en pectato y otros galacturonanos.

[0130] La xiloglucanasa cataliza la hidrólisis de xiloglucano.

[0131] La hemicelulosa se puede adicionar en una cantidad eficaz para hidrolizar hemicelulosa, tal como, en cantidades de aproximadamente 0,001 a 0,5 %peso de sólidos totales (TS), más preferiblemente de aproximadamente 0,05 a 0,5 %peso de TS.

#### Alfa-amilasa

[0132] Según la invención una alfa-amilasa puede ser utilizada. En una forma de realización preferida la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida, por ejemplo, alfa-amilasa de ácido fúngico o alfa-amilasa de ácido bacteriano. El término "alfa-amilasa ácida" significa una alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) que cuando se añade en una cantidad eficaz tiene actividad óptima a un pH en el intervalo de 3 a 7, preferiblemente de 3.5 a 6, o más preferiblemente de 4-5.

#### Alfa-amilasa bacteriana

[0133] Según la invención la alfa-amilasa bacteriana es preferiblemente derivada del género *Bacillus*.

[0134] En una forma de realización preferida la alfa-amilasa de *Bacillus* se deriva de una cepa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* o *B. stearothermophilus*, pero puede también ser derivada de otra *Bacillus* sp. Ejemplos específicos de alfa-amilasas contempladas incluyen la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en la SEC ID NO: 4 en WO 99/19467, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* SEC ID NO: 5 en WO 99/19467 y la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en la SEC ID NO: 3 en WO 99/19467. En una forma de realización de la invención la alfa-amilasa puede ser una enzima con un grado de identidad de al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferido al menos 80%, incluso más preferido al menos 90%, tal como al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% en cualquiera de las secuencias mostradas en SEC ID NOS: 1,2 o 3, respectivamente, en WO 99/19467.

[0135] La alfa-amilasa de *Bacillus* puede también ser una variante y/o híbrido, especialmente aquella descrita en cualquiera de WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059, y WO 02/10355. Variantes de alfa-amilasa específicamente contempladas son descritas en la patente estadounidense n.º. 6,093,562, 6,297,038 o 6,187,576 e incluyen variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (alfa-amilasa BSG) con una deleción de uno o dos aminoácidos en posiciones R179 a G182, preferiblemente una doble deleción descrita en WO 1996/023873 - véase por ejemplo, página 20, líneas 1-10, preferiblemente correspondiente a delta(181-182) en comparación con la secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa BSG de tipo salvaje establecida en la SEC ID NO:3 descrita en WO 99/19467 o deleción de aminoácidos R179 y G180 usando

SEC ID NO:3 en WO 99/19467 para numeración. Incluso más preferido son alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, que tienen una delección doble correspondiente a delta(181-182) y además comprenden una sustitución N193F (también denominado I181\* + G182\* + N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa BSG de tipo salvaje establecida en la SEC ID NO:3 descrita en WO 99/19467.

#### Alfa-amilasa híbrida bacteriana

[0136] Una alfa-amilasa híbrida específicamente contemplada comprende 445 residuos de aminoácidos C-terminales de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada en la SEC ID NO: 4 de WO 99/19467) y los 37 residuos de aminoácidos N-terminales de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrada en la SEC ID NO: 5 de WO 99/19467), con uno o más, especialmente todos, de la siguiente sustitución:

G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S (usando la numeración de *Bacillus licheniformis* en SEC ID N°: 4 de WO 99/19467). También preferidas son variantes con una o más de las mutaciones siguientes (o mutaciones correspondientes en otro esqueleto de alfa-amilasa de *Bacillus*): H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S y/o delección de dos residuos entre las posiciones 176 y 179, preferiblemente delección de E178 y G179 (usando la numeración de SEC ID n°: 5 de WO 99/19467).

#### Alfa-amilasa fúngica

[0137] Alfa-amilasas fúngicas incluyen alfa-amilasas derivadas de una cepa del género *Aspergillus*, tal como, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* y alfa-amilasas de *Aspergillus kawachii*.

[0138] Una alfa-amilasa ácida fúngica preferida es una alfa-amilasa de tipo Fungamyl que se deriva de una cepa de *Aspergillus oryzae*. Según la presente invención, el término "alfa-amilasa tipo Fungamyl" indica una alfa-amilasa que muestra una alta identidad, es decir, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85% más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, más del 99% o incluso 100% de identidad a la parte madura de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 10 en WO 96/23874.

[0139] Otra alfa-amilasa ácida preferida se deriva de una cepa de *Aspergillus niger*. En una forma de realización preferida la alfa-amilasa ácida fúngica es aquella de *A. niger* descrita como "AMYA\_ASPNG" en la base de datos Swiss-prot/TeEMBL bajo el no. de accesión primaria P56271 y descrita en WO 89/01969 (Ejemplo 3). Una alfa-amilasa fúngica ácida disponible comercialmente derivada de *Aspergillus niger* es SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

[0140] Otras alfa-amilasas de tipo salvaje contempladas incluyen aquellas derivadas de una cepa de los géneros *Rhizomucor* y *Meripilus*, preferiblemente una cepa de *Rhizomucor pusillus* (WO 2004/055178) o *Meripilus giganteus*.

[0141] En una forma de realización preferida la alfa-amilasa se deriva de *Aspergillus kawachii* y se describe por Kaneko et al., 1996, J. Ferment. Bioeng. 81: 292-298, "Molecular-cloning and determination of the nucleotide-sequence of a gene encoding an acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus kawachii*"; y además como EMBL:#AB008370.

[0142] La alfa-amilasa fúngica puede también ser una enzima de tipo salvaje que comprende un dominio de unión de almidón (SBD) y un dominio catalítico de alfa-amilasa (es decir, no híbrido), o una variante de estos. En una forma de realización la alfa-amilasa de tipo salvaje se deriva de una cepa de *Aspergillus kawachii*.

#### Alfa-amilasa híbrida fúngica

[0143] En una forma de realización preferida la alfa-amilasa ácida fúngica es una alfa-amilasa híbrida. Ejemplos preferidos de alfa-amilasas fúngicas híbridas incluyen aquellas descritas en WO 2005/003311 o publicación estadounidense n°. 2005/0054071 (Novozymes) o solicitud provisional estadounidense n°. 60/638,614 (Novozymes). Una alfa-amilasa híbrida puede comprender un dominio catalítico de alfa-amilasa (CD) y un dominio/módulo de enlace de carbohidratos (CBM), tal como un dominio de unión de almidón, y opcionalmente un enlazador.

[0144] Ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellos descritos en la tabla 1 a 5 de los ejemplos en la solicitud provisional estadounidense n°. 60/638,614, incluyendo la variante de Fungamyl con dominio catalítico JA118 y *Athelia rolfsii* SBD (SEC ID NO:100 en la solicitud provisional estadounidense n°. 60/638,614), alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador AMG de *Athelia rolfsii* y SBD (SEC ID NO:101 en la solicitud provisional estadounidense n°. 60/638,614), alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD (que se describe en la tabla 5 como una combinación de las secuencias de aminoácidos SEC IID NO:20, SEC ID NO:72 y SEC ID NO:96 en la solicitud estadounidense n°. 11/316,535 y además como SEC ID NO: 13 en la presente) o como V039 en la tabla 5 en WO 2006/069290, y alfa-amilasa de

*Meripilus giganteus* con enlazador de glucoamilasa de *Athelia rolfsii* y SBD (SEC ID n°: 102 en la solicitud provisional estadounidense n°. 60/638,614). Otras alfa-amilasas híbridas específicamente contempladas son cualquiera de las catalogadas en las tablas 3, 4, 5, y 6 en el Ejemplo 4 en la solicitud estadounidense n°. 11/316,535 y WO 2006/069290.

5 [0145] Otros ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellas descritas en la publicación estadounidense n°. 2005/0054071, incluyendo aquellas descritas en la tabla 3 en la página 15, tal como alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con enlazador de *Aspergillus kawachii* y dominio de unión de almidón.

10 [0146] Son también contempladas alfa-amilasas que muestran una alta identidad a cualquiera de las alfa-amilasas mencionadas arriba, es decir, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85% más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, más del 99% o incluso 100% de identidad a las secuencias de enzimas maduras.

15 [0147] Unas alfa-amilasas ácidas pueden según la invención ser adicionadas en una cantidad de 0,1 a 10 AFAU/g DS, preferiblemente 0,10 a 5 AFAU/g DS, especialmente 0,3 a 2 AFAU/g DS.

#### Productos comerciales de alfa-amilasa

20 [0148] Las composiciones comerciales preferidas que comprenden alfa-amilasa incluyen MYCOLASE de DSM, BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYME™ X y SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L (Novozymes A/S) y CLARASE™ L-40,000, DEX-LO™, SPEZYME™ FRED, SPEZYME™ AA, y SPEZYME™ DELTA AA (Genencor Int.), y la alfa-amilasa ácida fúngica vendida bajo el nombre comercial SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

#### Enzima generadora de fuente de carbohidrato

25 [0149] El término "enzima generadora de fuente de carbohidrato" incluye glucoamilasa (siendo generadores de glucosa), beta-amilasa y amilasa maltogénica (siendo generadores de maltosa). Una enzima generadora de fuente de carbohidrato es capaz de producir un carbohidrato que se puede usar como una fuente de energía por el(los) organismo(s) fermentador(es) en cuestión, por ejemplo, cuando se usa en un proceso de la invención para producir un producto de fermentación, tal como etanol. El carbohidrato generado puede ser convertido directa o indirectamente al producto de fermentación deseado, preferiblemente etanol. Según la invención una mezcla de enzimas generadoras de fuente de carbohidrato puede ser utilizada. Las mezclas especialmente contempladas son mezclas de al menos una glucoamilasa y una alfa-amilasa, especialmente una amilasa ácida, incluso más preferido una alfa-amilasa ácida fúngica. La proporción entre actividad de alfa-amilasa ácida fúngica (AFAU) por actividad de glucoamilasa (AGU) (AFAU por AGU) puede en una forma de realización de la invención ser al menos 0.1, en particular al menos 0.16, tal como en el intervalo de 0.12 a 0.50 o más. Alternativamente la proporción entre actividad de alfa-amilasa ácida fúngica (FAU-F) y actividad de glucoamilasa (AGU) (es decir, FAU-F por AGU) puede en una forma de realización de la invención estar entre 0.1 y 100 AGU/FAU-F, en particular entre 2 y 50 AGU/FAU-F, tal como en el intervalo de 10-40 AGU/FAU-F.

#### Glucoamilasa

45 [0150] Una glucoamilasa usada según la invención se puede derivar de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, derivada de un microorganismo o una planta. Glucoamilasas preferidas son de origen bacteriano o fúngico, seleccionadas del grupo que consiste en glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular glucoamilasa de *A. niger* G1 o G2 (Boel et al., 1984, EMBO J. 3(5): 1097-1102), o variantes de las mismas, tal como aquellas descritas en WO 92/00381, WO 00/04136 y WO 01/04273 (de Novozymes, Dinamarca); la glucoamilasa de *A. awamori* descrita en WO 84/02921, glucoamilasa de *A. oryzae* (Agric. Biol. Chem. 1991,55(4): 941-949), o variantes o fragmentos de las mismas. Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes con termoestabilidad mejorada: G137A y G139A (Chen et al., 1996, Prot. Eng. 9: 499-505); D257E y D293E/Q (Chen et al., 1995, Prot. Eng. 8: 575-582); N182 (Chen et al., 1994, Biochem. J. 301: 275-281); enlaces de disulfuro, A246C (Fierobe et al., 1996, Biochemistry 35: 8698-8704; e introducción de residuos Pro en la posición A435 y S436 (Li et al., 1997, Protein Eng. 10: 1199-1204).

60 [0151] Otras glucoamilasas incluyen glucoamilasa de *Athelia rolfsii* (previamente denominada *Corticium rolfsii*) (ver patente estadounidense n°. 4,727,026 y Nagasaka et al., 1998, "Purification and properties of the raw starch degrading glucoamylases from *Corticium rolfsii*, Appl Microbiol Biotechnol 50: 323-330), glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular derivadas de *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente estadounidense No. Re. 32,153), *Talaromyces duponti*, *Talaromyces thermophilus* (patente estadounidense n°. 4,587,215).

65 [0152] Las glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (EP 135,138), y *C. thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831) y *Trametes cingulata* descrita en WO 2006/069289.

[0153] También la glucoamilasa híbrida se contempla según la invención. Ejemplos de las glucoamilasas híbridas se describen en WO 2005/045018. Ejemplos específicos incluyen la glucoamilasa híbrida descrita en la tabla 1 y 4 del ejemplo 1.

[0154] También se contemplan glucoamilasas que muestran una alta identidad a cualquiera de glucoamilasas mencionadas arriba, es decir, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85% más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, más del 99% o incluso el 100% de identidad a las secuencias de enzimas maduras.

[0155] Composiciones disponibles comercialmente que comprenden glucoamilasa incluyen AMG 200L; AMG 300 L; SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L, SPIRIZYME™ PLUS, SPIRIZYME™ FUEL, SPIRIZYME™ B4U y AMG™ E (de Novozymes A/S); OPTIDEX™ 300 (de Genencor Int.); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUS (de DSM); G-ZYME™ G900, G-ZYME™ y G990 ZR (de Genencor Int.).

[0156] Glucoamilasas pueden en una forma de realización ser adicionadas en una cantidad de 0,02-20 AGU/g DS, preferiblemente 0,1-10 AGU/g DS, especialmente entre 1-5 AGU/g DS, tal como 0,5 AGU/g DS.

#### Beta-amilasa

[0157] Al menos según la invención la beta-amilasa (E.C 3.2.1.2) es el nombre generalmente dado a las amilasas maltogénicas de exo-actuación, que catalizan la hidrólisis de enlaces 1,4-alfa-glucosídicos en la amilosa, amilopectina y polímeros de glucosa relacionados. Unidades de maltosa son sucesivamente eliminadas de las extremidades de cadena no reductoras en una manera gradual hasta que la molécula es degradada o, en el caso de la amilopectina, hasta que un punto de derivación es alcanzado. La maltosa liberada tiene la configuración beta anomérica, por lo tanto el nombre beta-amilasa.

[0158] Beta-amilasas han sido aisladas de varias plantas y microorganismos (Fogarty y Kelly, 1979, Progress in Industrial Microbiology 15: 112-115). Estas beta-amilasas se caracterizan por tener temperaturas óptimas en el intervalo de 40°C a 65°C y óptimo pH en el intervalo de 4.5 a 7. Una beta-amilasa disponible comercialmente de la cebada es NOVOZYM™ WBA de Novozymes A/S, Dinamarca y SPEZYME™ BBA 1500 de Genencor Int., EEUU.

#### Amilasa maltogénica

[0159] La amilasa puede también ser una alfa-amilasa maltogénica. Una "alfa-amilasa maltogénica" (glucano 1,4-alfa- maltohidrolasa, E.C. 3.2.1.133) es capaz de hidrolizar amilosa y amilopectina a maltosa en la configuración alfa. Una amilasa maltogénica de la cepa NCIB 11837 de *Bacillus stearothermophilus* está comercialmente disponible de Novozymes A/S. Alfa-amilasas maltogénicas son descritas en las patentes estadounidenses Nos. 4,598,048, 4,604,355 y 6,162,628.

[0160] La amilasa maltogénica puede en una forma de realización preferida ser adicionada en una cantidad de 0,05-5 mg de proteína total/gramo de DS o 0,05- 5 MANU/g de DS.

#### Proteasas

[0161] La proteasa puede según la invención ser cualquier proteasa. En una forma de realización preferida la proteasa es una proteasa ácida de origen microbiano, preferiblemente de origen bacteriano o fúngico.

[0162] Proteasas adecuadas incluyen proteasas microbianas, tales como proteasas bacterianas y fúngicas. Proteasas preferidas son proteasas acídicas, es decir, proteasas caracterizadas por la capacidad para hidrolizar proteínas bajo condiciones acídicas por debajo de pH 7.

[0163] Proteasas fúngicas ácidas contempladas incluyen proteasas fúngicas derivadas de *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Candida*, *Coriolus*, *Endothia*, *Enthomophtra*, *Irpex*, *Penicillium*, *Sclerotiumand*, y *Torulopsis*. Especialmente contempladas son las proteasas derivadas de *Aspergillus niger* (ver, por ejemplo, Koaze et al., 1964, Agr. Biol. Chem. Japón 28: 216), *Aspergillus saitoi* (ver, por ejemplo, Yoshida, 1954, J. Agr. Chem. Soc. Japón 28: 66), *Aspergillus awamori* (Hayashida et al., 1977, Agric. Biol. Chem. 42(5): 927-933, *Aspergillus aculeatus* (WO 95/02044), o *Aspergillus oryzae*, tal como la proteasa pepA; y proteasas acídicas de *Mucor pusillus* o *Mucor miehei*.

[0164] También se contemplan las proteasas neutras o alcalinas, tales como una proteasa derivada de una cepa de *Bacillus*. Una proteasa particular contemplada para la invención se deriva de *Bacillus amyloliquefaciens* y tiene la secuencia obtenible de Swissprot como accesoión nº. P06832. También se contemplan las proteasas con al menos 90% de identidad a secuencia de aminoácidos obtenible en Swissprot como accesoión nº. P06832 tal como al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o particularmente al menos 99% de identidad.



[0165] También se contemplan las proteasas con al menos 90% de identidad a la secuencia de aminoácidos descrita como SEQ.ID.NO:1 en el WO 2003/048353 tal como al 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o particularmente al menos 99% de identidad.

5 [0166] También se contemplan las proteasas tipo papaína tales como proteasas dentro de E.C. 3.4.22.\* (proteasa de cisteína), tal como EC 3,4,22,2 (papaína), EC 3,4,22,6 (quimopapaína), EC 3,4,22,7 (asclepaína), EC 3,4,22,14 (actinidaína), EC 3,4,22,15 (catepsina L), EC 3,4,22,25 (glicil endopeptidasa) y EC 3,4,22,30 (caricaína).

10 [0167] Proteasas se pueden adicionar en las cantidades de 0,1-1000 AU/kg dm, preferiblemente 1-100 AU/kg DS y más preferiblemente 5-25 AU/kg DS.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 15 Enzimas:

[0168] Lacasa PpL: lacasa derivada de *Polyporus pinsitus* descrita en WO 1996/000290 (Novozymes).

20 [0169] Lacasa MtL: lacasa derivada de *Myceliophthora thermophila* descrita en WO 1995/033836 (Novozymes).

[0170] Lacasa CcL: lacasa derivada de *Coprinus cinereus* descrita en WO 97/08325 (Novozymes)

25 [0171] Peroxidasa CcP: peroxidasa se deriva de *Coprinus cinereus* descrita en Petersen et al., 1994, FEBS Letters 339: 291-296.

[0172] Preparación celulolítica A: composición celulolítica que comprende un polipéptido con actividad celulolítica en aumento (GH61A) descrita en WO 2005/074656; una beta-glucosidasa (proteína de fusión descrita en la solicitud provisional estadounidense n°. 60/832,511), celobiohidrolasa II de *Thielavia terrestris* (CEL6A), y preparación de enzimas celulolíticas derivadas de *Trichoderma reesei*. Preparación A de celulasa es descrita en la solicitud provisional estadounidense n°. 60/941,251.

30 [0173] Preparación celulolítica B: composición celulolítica que comprende un polipéptido con actividad celulolítica en aumento (GH61A) descrita en WO 2005/074656; una beta-glucosidasa (proteína de fusión descrita en la solicitud provisional estadounidense n°. 60/832,511); y preparación de enzimas celulolíticas derivadas de *Trichoderma reesei*. Preparación A de celulasa es descrita en la solicitud provisional estadounidense n°. 60/941,251.

[0174] Levadura: RED STAR™ disponible de Red Star/Lesaffre, EEUU

40 [0175] Forraje de maíz pretratado: forraje de maíz de explosión de vapor catalizado con ácido diluido (28,6% DS) fue obtenido de NREL (INational Renewable Research Laboratory, USA).

### Determinación de identidad

45 [0176] La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos es descrita por el parámetro "identidad".

50 [0177] El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar por el método Clustal (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) usando el software LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiple: penalización de gap de 10 y penalización de longitud de gap de 10. Parámetros de alineamiento de pares son Ktuple=1, penalización de gap=3, ventanas=5, y diagonales=5.

55 [0178] El grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar por el método Wilbur-Lipman (Wilbur y Lipman, 1983, Proceedings of the National Academy of Science USA 80: 726-730) usando el software LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los parámetros de alineamiento múltiple siguientes: penalización de gap de 10 y penalización de longitud de gap de 10. Parámetros de alineamiento de pares son Ktuple=3, panalización de gap=3, y ventanas=20.

### 60 Determinación de actividad de lacasa (LACU)

[0179] La actividad de lacasa se determina de la oxidación de siringaldazina bajo condiciones aeróbicas. El color violeta producido se fotometra a 530 nm. Las condiciones analíticas son 19 mM de siringaldazina, 23. 2 mM de tampón acetato, pH 5.5,30°C, 1 min. de tiempo de reacción.

65 [0180] 1 unidad de lacasa (LACU) es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1,0 micromol de

siringaldazina por minuto a estas condiciones.

#### **Determinación de actividad de peroxidasa (PODU)**

- 5 [0181] Una unidad de peroxidasa (PODU) es definida como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándar (es decir, pH 7,0 temperatura 30°C; tiempo de reacción 3 minutos) cataliza la conversión de 1 micromol de peróxido de hidrógeno por minuto. La actividad es determinada usando un ensayo basado en ABTS® (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) como el cromóforo, el color azul verdoso producido siendo fotometrado a 418 nm. Una carpeta AF 279/2 que describe este método analítico con más detalle está disponible a petición a  
10 Novozymes A/S, Dinamarca, la cual se incluye en la presente por referencia.

#### **Actividad de glucoamilasa**

- 15 [0182] La actividad de glucoamilasa se puede medir en las unidades de glucoamilasa (AGU).

#### **Actividad de glucoamilasa (AGU)**

- 20 [0183] La Unidad Novo de Glucoamilasa (AGU) es definida como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto bajo las condiciones estándares de 37°C, pH 4,3, sustrato: maltosa 23,2 mM, tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción de 5 minutos.

- 25 [0184] Un sistema autoanalizador puede ser utilizado. Mutarotasa se añade al reactivo de glucosa deshidrogenasa de modo que cualquier alfa-D-glucosa presente se convierte a beta-D-glucosa. La glucosa deshidrogenasa reacciona específicamente con beta-D-glucosa en la reacción mencionada arriba, formando NADH que se determina usando un fotómetro a 340 nm como una medida de la concentración de glucosa original.

<b>Incubación de AMG:</b>	
Sustrato:	maltosa 23.2 mM
Tampón:	acetato 0.1 M
pH:	4.30 ± 0.05
Temperatura de incubación:	37°C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Intervalo de trabajo enzimático:	0.5-4.0 AGU/mL

<b>Reacción de color:</b>	
GlucDH:	430 U/L
Mutarotasa:	9 U/L
NAD:	0.21 mM
Tampón:	fosfato 0.12 M; 0.15 M NaCl
pH:	7.60 ± 0.05
Temperatura de incubación:	37°C±1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Longitud de onda:	340 nm

- 30 [0185] Una carpeta (EB-SM-0131,02/01) que describe este método analítico con más detalle está disponible en la solicitud de Novozymes A/S, Dinamarca, la cual se incluye en la presente por referencia.

#### **Actividad de alfa-amilasa (KNU)**

- 35 [0186] La actividad de alfa-amilasa puede ser determinada usando almidón de patata como sustrato. Este método se basa en la descomposición de almidón de patata modificado por la enzima, y la reacción es seguida por la mezcla de muestras de la solución de almidón/enzima con una solución de yodo. Inicialmente, se forma un color azul negruzco, pero durante la descomposición del almidón el color azul se obtiene más débil y se convierte gradualmente en un marrón rojizo, que se compara con un estándar de cristal de color.

- 40 [0187] Una Kilo Novo unidad de alfa amilasa (KNU) se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándares (es decir, a 37°C +/- 0,05, 0,0003 M Ca<sup>2+</sup>; y pH 5,6) dextriniza 5260 mg de sustancia seca de almidón Merck Amilum soluble.

- 45 [0188] Una carpeta EB-SM-0009,02/01 que describe este método analítico con más detalle está disponible a petición a Novozymes A/S, Dinamarca, la cual se incluye en la presente por referencia.

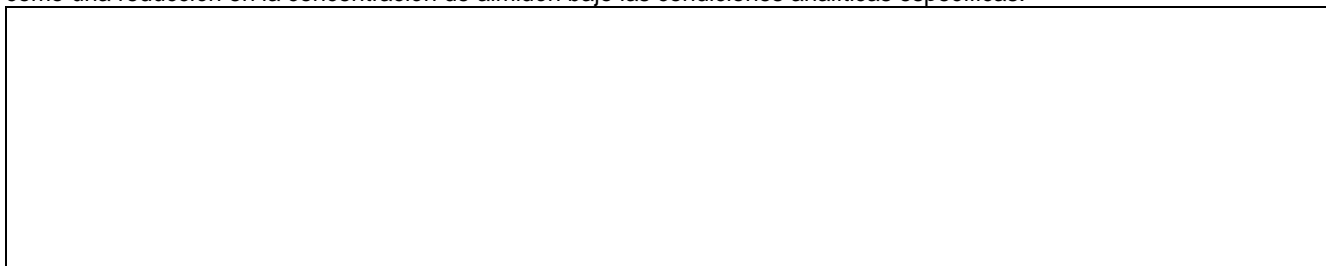
#### **Actividad de alfa-amilasa ácida**

[0189] Cuando se usa según la presente invención la actividad de una alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida) o FAU-F (unidades de alfa-amilasa fúngica).

**Actividad de alfa-amilasa ácida (AFAU)**

5 [0190] La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida), que se determina respecto a un estándar enzimático. 1 AFAU se define como la cantidad de enzima que degrada 5,260 mg de sustancia seca de almidón por hora bajo las condiciones estándares mencionadas abajo.

10 [0191] La alfa-amilasa ácida, una endo-alfa-amilasa (1,4-alfa-D-glucan-glucanohidrolasa, E.C. 3,2,1,1) hidroliza enlaces alfa-1,4-glucosídicos en las regiones internas de la molécula de almidón para formar dextrinas y oligosacáridos con longitudes de cadena diferentes. La intensidad de color formada con yodo es directamente proporcional a la concentración de almidón. La actividad de amilasa es determinada usando colorimetría inversa como una reducción en la concentración de almidón bajo las condiciones analíticas específicas.



15

Condiciones estándar/condiciones de reacción:

Sustrato:	Almidón soluble, aprox. 0.17 g/L
Tampón:	Citrato, aprox. 0.03 M
Yodo (I2):	0.03 g/L
CaCl <sub>2</sub> :	1.85 mM
pH:	2.50 ± 0.05
Temperatura de incubación:	40°C
Tiempo de reacción:	23 segundos
Longitud de onda:	590 nm
Concentración enzimática:	0.025 AFAU/mL
Intervalo de trabajo enzimático:	0.01-0.04 AFAU/mL

20 [0192] Una carpeta [EB-SM-0259,02/01](#) describiendo con más detalle este método analítico está disponible a petición a Novozymes A/S, Dinamarca, la cual se incluye en la presente por referencia.

**Determinación de FAU-F**

25 [0193] Las Unidades de Alfa-amilasa Fúngica (Eungamyl) FAU-F se miden con respecto a un estándar enzimático de una resistencia declarada.

Condiciones de reacción	
Temperatura	37°C
pH	7.15
Longitud de onda	405 nm
Tiempo de reacción	5 min
Tiempo de medición	2 min

30 [0194] Una carpeta (EB-SM-0216,02) describiendo este método estándar con más detalle está disponible en la solicitud de Novozymes A/S, Dinamarca, la cual se incluye en la presente por referencia.

**Medición de la actividad de celulasa usando ensayo con papel de filtro (ensayo FPU)**

[0195]

- 35 1. Fuente del método  
 1.1 El método se describe en un documento titulado "Measurement of Cellulase Activities" por Adney y Baker, 1996, Laboratory Analytical Procedure, LAP-006, National Renewable Energy Laboratory (NREL). Se basa en el método de IUPAC para medir la actividad de celulasa (Ghose, 1987, Measurement of Cellulase Activities, Pure & Appl. Chem. 59: 257-268.
- 40 2. Procedimiento  
 2.1 El método se realiza como se describe por Adney y Baker, 1996, supra, excepto para el uso de placas de

96 pocillos para leer los valores de absorbancia después del desarrollo de color, como se describe abajo.

2.2 *Tubos de ensayo enzimático:*

2.2.1 Una banda de papel de filtro laminado (#1 Whatman; 1 X 6 cm; 50 mg) se añade al fondo de un tubo de prueba (13 X 100 mm).

5 2.2.2 Al tubo se añade 1.0 mL de 0.05 M de tampón de Na-citrato (pH 4.80).

2.2.3 Los tubos con papel de filtro y tampón son incubados 5 min. a 50°C (± 0.1°C) en un baño maría circulante.

10 2.2.4 Tras la incubación, 0.5 mL de dilución enzimática en el tampón de citrato se añade al tubo. Las diluciones enzimáticas se diseñan para producir valores ligeramente por encima y por debajo del valor de objetivo de 2.0 mg de glucosa.

2.2.5 Los contenidos del tubo se mezclan por suave agitación en vortex durante 3 segundos.

2.2.6 Después de agitación en vortex, los tubos se incuban durante 60 mins. a 50°C (± 0.1°C) en un baño maría circulante.

15 2.2.7 Inmediatamente después de los 60 min. de incubación, los tubos son retirados del baño maría, y 3.0 mL de reactivo DNS se añade a cada tubo para parar la reacción. Los tubos se agitan en vortex 3 segundos para mezclarse.

2.3 *Blanco y controles*

2.3.1 Un blanco reactivo se prepara añadiendo 1.5 mL de tampón de citrato a un tubo de ensayo.

20 2.3.2 Un control de sustrato se prepara colocando una banda de papel de filtro laminado en el fondo de un tubo de ensayo, y añadiendo 1.5 mL de tampón de citrato.

2.3.3 Controles enzimáticos se preparan para cada dilución enzimática mezclando 1.0 mL de tampón de citrato con 0.5 mL de la dilución de enzima apropiada.

2.3.4 El blanco reactivo, control de sustrato, y controles enzimáticos se evalúan de la misma manera que los tubos de ensayo enzimático, y se hacen junto con éstos.

25 2.4 *Estándares de glucosa*

2.4.1 Una solución de 100 mL de materia prima de glucosa (10.0 mg/mL) es preparada, y partes alícuotas de 5 mL son congeladas. Antes del uso, partes alícuotas se descongelan y se agitan en vortex para mezclarse.

2.4.2 Diluciones de la solución madre han sido hechas en el tampón de citrato de la siguiente manera:

30  $G1 = 1.0 \text{ mL materia prima} + 0.5 \text{ mL tampón} = 6.7 \text{ mg/mL} = 3.3 \text{ mg/0.5 mL}$   
 $G2 = 0.75 \text{ mL materia prima} + 0.75 \text{ mL tampón} = 5.0 \text{ mg/mL} = 2.5 \text{ mg/0.5 mL}$   
 $G3 = 0.5 \text{ mL materia prima} + 1.0 \text{ mL tampón} = 3.3 \text{ mg/mL} = 1.7 \text{ mg/0.5 mL}$   
 $G4 = 0.2 \text{ mL materia prima} + 0.8 \text{ mL tampón} = 2.0 \text{ mg/mL} = 1.0 \text{ mg/0.5 mL}$

35 2.4.3 Tubos estándares de glucosa se preparan por adición de 0.5 mL de cada dilución a 1.0 mL de tampón de citrato.

2.4.4 Los tubos estándares de glucosa se evalúan de la misma manera que los tubos de ensayo enzimático, y se hacen junto con éstos.

2.5 *Desarrollo de color*

40 2.5.1 Después de los 60 min. de incubación y adición de DNS, los tubos son todos hervidos juntos durante 5 mins. al baño maría.

2.5.2 Después de la ebullición, se enfrían inmediatamente en un baño de hielo/agua.

45 2.5.3 Cuando se enfrían, los tubos son brevemente agitados en vortex, y se deja formar la pulpa. Después, cada tubo se diluye por adición de 50 microL del tubo a 200 microL de ddH<sub>2</sub>O en una placa de 96 pocillos. Cada pocillo es mezclado, y la absorbancia es leída a 540 nm.

2.6 *Cálculos (ejemplos están provistos en el documento NREL)*

50 2.6.1 Una curva estándar de glucosa es preparada poniendo en gráfico la concentración de glucosa (mg/0.5 mL) para los cuatro estándares (G1-G4) vs. A<sub>540</sub>. Se ajusta usando una regresión lineal (Software Prism), y la ecuación para la línea se utiliza para determinar la glucosa producida para cada uno de los tubos de ensayo enzimático.

2.6.2 Un gráfico de glucosa producida (mg/0.5 mL) vs. dilución de enzima total es preparado, con el eje Y (dilución enzimática) estando en una escala logarítmica.

55 2.6.3 Una línea es dibujada entre la dilución enzimática que produjo justo superior a 2.0 mg glucosa y la dilución que produjo justo inferior a ésta. De esta línea, se determina la dilución enzimática que han producido exactamente 2.0 mg de glucosa.

2.6.4 Las Unidades de Papel de Filtro/ml (FPU/mL) se calculan de la siguiente manera:

$FPU/ml = 0.37 / \text{dilución enzimática que produce 2.0 mg de glucosa}$

60 **Método de ensayo de proteasa - AU(RH)**

[0196] La actividad proteolítica se puede determinar con hemoglobina desnaturalizada como sustrato. En el método de hemoglobina de Anson para la determinación de la actividad proteolítica se digiere hemoglobina desnaturalizada, y la hemoglobina no digerida se precipita con ácido tricloroacético (TCA). La cantidad de producto soluble TCA se determina con reactivo de fenol, que da un color azul con tirosina y triptófano.

65 [0197] Una unidad de Anson (AU-RH) es definida como la cantidad de enzima que bajo condiciones estándares

(es decir, 25°C, pH 5,5 y 10 min. tiempo de reacción) digiere hemoglobina a un nivel inicial de manera que se libera por minuto una cantidad de producto soluble TCA que da el mismo color con reactivo de fenol como un miliequivalente de tirosina.

- 5 [0198] El método AU(RH) es descrito en EAL-SM-0350 y está disponible por Novozymes A/S Dinamarca a petición.

## EJEMPLOS

### 10 Ejemplo 1

#### Efecto de lacasa en el etanol producido durante la hidrólisis enzimática

- 15 [0199] Forraje de maíz pretratado explotado de vapor catalizado con ácido diluido se obtuvo de NREL. El forraje de maíz pretratado (15% DS) fue hidrolizado a pH 4.5, 50°C durante 75 horas con preparación celulolítica A (5 FPU/g DS) con y sin lacasa PpL (20 - 30 LACU/g DS). El tratamiento enzimático se efectuó con tapa abierta de modo que se proporcionó corriente de aire consistente durante el tratamiento. La evaporación fue controlada por suplemento de agua diario basado en la pérdida de peso. Las muestras enzimáticas tratadas fueron usadas para fermentación de etanol a 32°C durante hasta 88 horas en un vaso cerrado donde una aguja fue perforada en la tapa, con levadura (RED STAR™) a una dosificación inicial de 0.2 g/L. La mezcla de fermentación también contiene YPU (5 g/L extracto de levadura, 5 g/L peptona y 10 g/L úrea). Después de 25 horas de fermentación, la muestra tratada con lacasa resultó en 10 g/L de producción de etanol, mientras que la muestra tratada sin lacasa no resultó en ningún rendimiento de etanol. Con la dosificación de levadura inicial de 1.6 g/L, se observó una producción de etanol aproximadamente 10 veces más alta con muestra tratada con lacasa después de 25 horas de fermentación (18.87 g/L para muestras tratadas con lacasa vs 1.83 para muestra tratada sin lacasa).

### Ejemplo 2

#### Efecto de lacasa en el rendimiento de etanol durante la fermentación

- 30 [0200] El forraje de maíz pretratado (28,6% DS) usado fue el mismo que en el ejemplo 1. El forraje de maíz pretratado (15% DS) fue hidrolizado con preparación celulolítica A (5 FPU/g DS) a pH 4.5, 50°C durante 75 horas en ausencia de lacasa con tapa cubierta. Después de la hidrólisis enzimática, el material fue fermentado a 32°C durante hasta 88 horas en un vaso cerrado donde una aguja fue perforada en la tapa, con levadura (RED STAR™) en una dosificación de 1.6 g/L con y sin lacasa PpL (20 - 30 LACU/g DS). La mezcla de fermentación también contiene YPU (5 g/L extracto de levadura, 5 g/L peptona y 10 g/L úrea). Después de 25 horas, la producción de etanol fue doblada en la muestra donde lacasa estuvo presente durante la fermentación (4.59 g/L tratados con lacasa vs 1.83 tratados sin lacasa).

### 40 Ejemplo 3

#### Efecto de tratamiento de oxidorreductasas entremedias de la hidrólisis y fermentación de levadura

- 45 [0201] El forraje de maíz pretratado (28,6% DS) usado fue el mismo que en el Ejemplo 1. La hidrólisis enzimática fue realizada con forraje de maíz pretratado (15% DS) a pH 4.5, a 50°C durante 72 horas en ausencia de lacasa con tapa cubierta. Tratamiento de oxidorreductasa fue conducida a 50°C durante una o dos horas antes de la fermentación a 32°C (hasta 48 horas) con levadura (RED STAR™) a una dosificación de 0.5 g/L en un vaso cerrado donde una aguja fue perforada en la tapa. Durante el tratamiento con oxidorreductasa, las tapas fueron abiertas cada 20 minutos. La mezcla de fermentación también contiene YPU (5 g/L extracto de levadura, 5 g/L peptona y 10 g/L úrea). Se observó hasta el 40% de aumento en la producción de etanol con lacasa PpL (4.5 - 30 LACU/g DS). Hasta 27% de aumento en la producción de etanol fue observado con lacasa MtL (0.5 - 30 LACU/g DS). Aproximadamente 27% de aumento en la producción de etanol fue observado con lacasa CcL (36 LACU/g DS). Aproximadamente 40% de aumento en la producción de etanol fue observado con peroxidasa CcP en presencia de 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 55 Ejemplo 4

#### Mejora mediada con lacasa de hidrólisis enzimática PCS

- 60 Recogida de solución de pretratamiento:

- 65 [0202] La solución fue recogida tanto de forraje de maíz explotado de vapor neutro como de forraje de maíz explotado de vapor ácido. Cada PCS fue mezclado en agua desionizada hasta un nivel final de sólidos totales (TS) del 15 % en peso con mezcla a temperatura ambiental durante 1 hora. Cada lodo fue almacenado a 4°C durante 16-20 horas. Los lodos fueron luego mezclados a temperatura ambiente durante 1 hora, y la solución fue recogida por filtración al vacío a través de un filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/D). Azida sódica fue añadida a una

concentración final de 0.02% p/p. El pH de cada una fue ajustado a 5.0. Tras la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente, la solución fue filtrada al vacío a través de una membrana de 0.2 micro m y almacenada a 4°C.

5 Tratamiento con lacasa:

[0203] Todas las soluciones de PCS fueron ajustadas a pH 5,0. Lacasa MTL fue dosificada en la solución de PCS hasta una concentración final de 100 ppm. La solución que contiene lacasa fue incubada a lo largo de una solución de control negativo durante 18 horas a 50°C con 150 r.p.m. de agitación. Cualquier material precipitado fue eliminado por centrifugación a 3000 r.p.m. durante 10 minutos antes de caracterización adicional.

Método de Folin-Ciocalteu (FC) para fenoles:

[0204] El método fue modificado de un procedimiento publicado (Singleton, Orthofer, y Lamuela-Raventos, 1999, Methods Enzymol. 299: 152-178). Estándares de calibración de catecol (Sigma #135011) y diluciones de muestra fueron preparados en agua desionizada. Cincuenta microL de muestra diluida o estándar de calibración de catecol fueron transferidos a los pocillos de una placa de microtitulación. Agua desionizada (50 microL) fue añadida a cada pocillo seguido por 50 microL/pocillo de FC reactivo (Sigma #F9252). La placa fue incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente. Carbonato de sodio (15% p/v, 100 microL) fue luego añadido a cada pocillo y la placa fue incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente a oscuras. La absorbancia a 770 nm de cada pocillo fue recogida. Concentraciones fenólicas desconocidas totales fueron calculadas de la curva estándar de catecol por análisis de regresión lineal en el Microsoft Excel.

Hidrólisis de PCS y control de glucosa.

[0205] Sólidos de PCS lavados fueron mezclados en la solución de PCS apropiada a una concentración final de 4% de sólidos totales y dosificados con preparación celulolítica B (3 mg proteína/g celulosa). Reacciones de hidrólisis fueron incubadas a 50°C con agitación (150 r.p.m.) durante 48 horas. Las concentraciones de glucosa fueron controladas en el tiempo usando un ensayo de glucosa acoplado a la enzima.

**Tabla 1:** Efecto de tratamiento de lacasa en fenoles solubles como medido por el método FC

Solución	Fenoles, mg/mL		
	- lacasa	+ lacasa	% reducción
PCS neutro	2.30 ± 0.05	1.63 ± 0.01	29.1
PCS ácido	1.96 ± 0.02	1.34 ± 0.02	31.8

Conclusiones

[0206] Hidrólisis enzimática de PCS fue mejorada tratando una solución de PCS con una lacasa. El tratamiento de lacasa de soluciones de PCS ácidos o bien neutros resultó en una mejora del 8-10% en la conversión de celulosa.

**REIVINDICACIONES**

1. Proceso para producir un producto de fermentación de material que contiene lignocelulosa, que incluye las etapas de:
- 5 (i) pretratamiento de material que contiene lignocelulosa;
- (ii) detoxificación que comprende el sometimiento del material que contiene lignocelulosa pretratado a una o más enzimas de oxidación de compuestos fenólicos y/o una o más enzimas que muestran actividad de peroxidasa;
- 10 (iii) hidrolización del material de la etapa (ii) con una celulasa; y
- (iv) fermentación del material hidrolizado de la etapa (iii) usando un organismo de fermentación, donde la desintoxicación se lleva a cabo antes de la hidrólisis;
- 15 en donde los sólidos, después del pretratamiento del material que contiene lignocelulosa en la etapa (i), se eliminan/separan de la solución antes de la detoxificación; y en donde los sólidos eliminados y la solución detoxificada se combinan antes de la hidrólisis en la etapa (iii).
2. Proceso según la reivindicación 1, donde las enzimas de oxidación de compuesto fenólico son seleccionadas del grupo que consiste en una catecol oxidasa, lacasa, o-aminofenol oxidasa; y monofenol-monoxigenasa o donde la enzima que muestra actividad de peroxidasa es seleccionada del grupo que consiste en una peroxidasa, haloperoxidasa; lignina peroxidasa; manganeso peroxidasa; y lipoxigenasa.
- 20 3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, donde el material que contiene lignocelulosa es pretratado químicamente, mecánicamente y/o biológicamente en la etapa (i).
- 25 4. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la hidrólisis y la fermentación se llevan a cabo como una hidrólisis y fermentación simultáneas, una hidrólisis y fermentación híbridas o un proceso separado de hidrólisis y fermentación.
- 30 5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde, la hidrólisis y/o la fermentación adicional se realizan usando una o más hidrolasas seleccionadas del grupo que consiste en celulasa, hemicelulasa, amilasa, proteasa, esterasa; tal como endoglucanasa, beta-glucosidasa, celobiohidrolasa, xilanasa, alfa-amilasa, alfa-glucosidasa, glucoamilasa, proteasas y lipasas, o una mezcla de las mismas.
- 35 6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el organismo fermentador es levadura, preferiblemente una cepa del género *Saccharomyces*, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*.
7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el producto de fermentación es un alcohol, preferiblemente etanol o butanol.

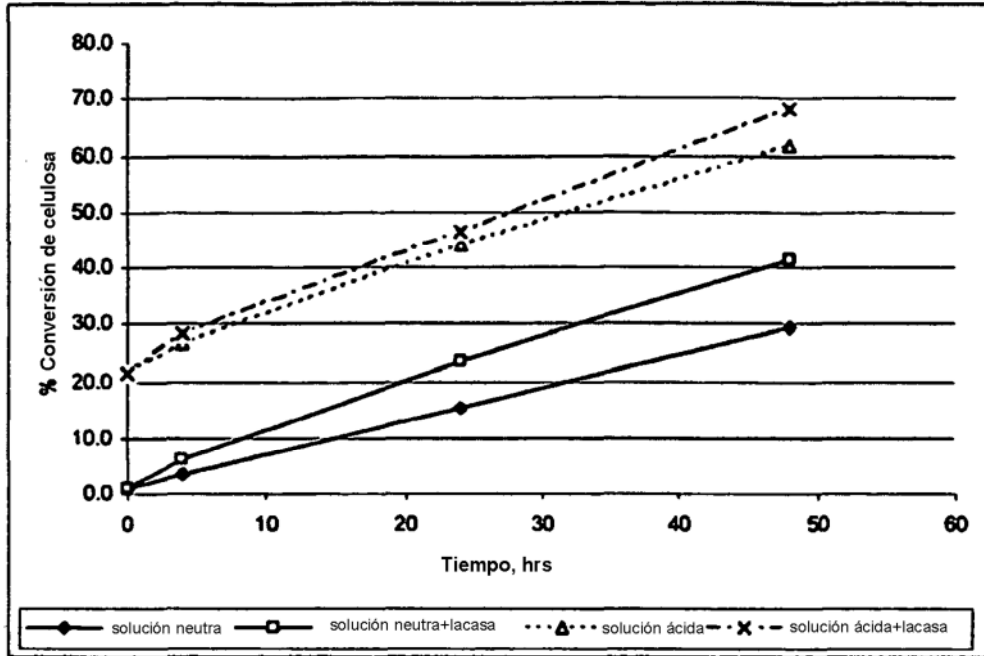


Fig. 1