

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 554**

51 Int. Cl.:

C12P 7/04	(2006.01)
C12P 7/06	(2006.01)
C12P 7/10	(2006.01)
C12N 1/14	(2006.01)
C12P 7/00	(2006.01)
C12R 1/645	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2016 PCT/EP2016/051634**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016 WO16120297**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2016 E 16701544 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3250697**

54 Título: **Proceso para la hidrólisis enzimática de material lignocelulósico y fermentación de azúcares**

30 Prioridad:

28.01.2015 EP 15152901

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

17.06.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SMITS, JOHANNES PETRUS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 767 554 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

Proceso para la hidrólisis enzimática de material lignocelulósico y fermentación de azúcares

Campo de la invención

La invención se refiere a un proceso integrado para la producción de alcohol a partir de material lignocelulósico.

5 **Antecedentes de la invención**

El material lignocelulósico está principalmente compuesto de celulosa, hemicelulosa y lignina, y proporciona una plataforma atractiva para generar fuentes alternativas de energía y productos químicos a los combustibles fósiles. El material está disponible en grandes cantidades y se puede convertir en azúcares que otra vez se pueden convertir en valiosos productos de fermentación, tales como biocombustible y ácidos orgánicos.

10 Se conoce en la técnica la producción de productos de fermentación a partir de material lignocelulósico y, en general, incluye las etapas de pretratamiento, hidrólisis, fermentación, y opcionalmente la recuperación de los productos de fermentación.

15 Durante la hidrólisis, que puede comprender las etapas de licuefacción, presacarificación y/o sacarificación, la celulosa presente en el material lignocelulósico se convierte parcialmente (normalmente 30 a 95 %, dependiendo de la actividad enzimática y las condiciones de hidrólisis) en azúcares reductores por enzimas celololíticas. La hidrólisis tiene lugar normalmente durante un proceso que dura 6 a 168 horas (véase Kumar, S., Chem. Eng. Technol. 32 (2009), 517-526) a temperaturas elevadas de 45 a 70 °C y condiciones no estériles. Comúnmente, los azúcares se convierten entonces en valiosos productos de fermentación, tales como etanol y ácido succínico, por microorganismos, como levadura.

20 El ácido succínico es un ácido orgánico de cuatro carbonos bien conocido que tiene alto valor, puesto que se puede usar como precursor para muchos productos químicos industriales importantes y productos de consumo. Actualmente, el ácido succínico se produce petroquímicamente a partir de butano mediante anhídrido maleico. Sin embargo, recientemente se ha prestado mucha atención a la producción microbiológica del ácido succínico usando microorganismos como una alternativa a la síntesis química.

25 En los últimos años, en gran parte en respuesta al incierto suministro de combustibles y esfuerzos para reducir las emisiones de dióxido de carbono, la producción de etanol a partir de recursos de biomasa renovable está siendo cada vez más extremadamente importante desde el punto de vista del entorno global. El bioetanol se considera una buena alternativa al combustible, debido a que los cultivos fuente pueden crecer renovablemente y en la mayoría de los climas alrededor del mundo. Además, el uso de bioetanol, en general, es neutro en CO₂.

30 En los últimos años, ha surgido el concepto de la biorrefinería. En el concepto de biorrefinería están integrados los procesos y la tecnología de conversión de biomasa para producir una variedad de productos que incluyen combustibles, potencia, productos químicos y pienso para ganado vacuno. Esta forma se aprovecha de las diferencias naturales en la composición química y estructural de las materias primas de la biomasa. Es deseable la cuidadosa gestión y utilización de materiales, productos y residuos, que hace que el concepto de biorrefinería sea un claro ejemplo de simbiosis industrial. Produciendo múltiples productos e integrando el tratamiento de los residuos, las biorrefinerías pueden maximizar los valores derivados de las materias primas de la biomasa y convertir el procesamiento de la biomasa en oportunidades reales.

La optimización de los procesos realizados dentro de las biorrefinerías y el diseño global de las biorrefinerías son herramientas cruciales para incrementar la eficiencia de las biorrefinerías y reducir sus costes globales.

40 Los documentos de patente US2014/0170723, US2014/0356915 desvelan procesos de producción de alcohol que incluyen pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación.

El documento de patente WO2013/106113 desvela un proceso integrado para la producción de etanol que comprende hidrólisis enzimática, separación sólido/líquido y fermentación para producir alcohol.

Por tanto, es deseable incluir conceptos nuevos e innovadores, diseños y configuraciones de proceso que pretendan maximizar la salida de biorrefinerías y reducir sus costes globales.

45 **Sumario de la invención**

Es un objeto de la invención proporcionar un proceso integrado mejorado para la producción de alcohol a partir de material lignocelulósico. La optimización y la mejora radican en muchas características que incluyen, pero no se limitan a, valorización de corrientes laterales, separación de corrientes, (re)utilización de ciertos materiales y corrientes, condiciones de hidrólisis enzimática y fermentaciones, integración de una variedad de procesos de conversión. El proceso integrado para la producción de alcohol a partir de material lignocelulósico comprende las etapas de:

- pretratamiento del material lignocelulósico para obtener material lignocelulósico pretratado,

- hidrólisis enzimática del material lignocelulósico pretratado para obtener material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado, en donde se añade oxígeno durante la hidrólisis enzimática,
- separación sólido/líquido del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado para obtener una fracción sólida y una fracción líquida,
- 5 - propagación del microorganismo productor de alcohol por fermentación de la fracción líquida y fermentación de la fracción líquida por el microorganismo productor de alcohol para producir alcohol, en donde el microorganismo productor de alcohol es capaz de fermentar al menos un azúcar C5 y al menos un azúcar C6,
- propagación de un hongo y producción de enzimas por el hongo, en donde una parte del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado y una parte del material lignocelulósico pretratado se usa en la propagación del hongo y/o la producción de enzimas por el hongo y en donde las enzimas producidas por el hongo se usan en la hidrólisis enzimática.

Descripción detallada de la invención

En toda la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las palabras "comprenden" e "incluyen", y variaciones tales como "comprende", "que comprende", "incluye" y "que incluye", se deben interpretar inclusivamente. Es decir, estas palabras pretenden expresar la posible inclusión de otros elementos o números enteros no específicamente citados, donde lo permita el contexto. Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a uno o al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" puede significar un elemento o más de un elemento. El término "microorganismo", como se usa en este documento, significa uno o más microorganismos. A menos que se establezca de forma diferente, los términos "la fracción sólida" y "la fracción líquida" significan que la fracción y la fracción líquida, respectivamente, como se obtuvieron después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado. Como se describe en el presente documento, después de una separación sólido/líquido se obtienen una fracción sólida y una fracción líquida.

La invención se refiere a un proceso integrado de producción de alcohol. Un experto en la técnica conoce el término "proceso integrado" y significa un proceso en donde se combinan dos o más etapas de proceso relacionadas de al menos dos procesos industriales separados, que se pueden realizar por separado, de manera que al menos una etapa de proceso sea común para los dos procesos. Además, en un "proceso integrado" como se define en el presente documento, las corrientes, fracciones y/o porciones producidas y/o obtenidas en un proceso industrial se pueden usar en otro proceso industrial, mejorando así el proceso global eficientemente más que la suma de cada proceso individual. El proceso integrado optimiza la utilización de biomasa y reduce los subproductos que de otro modo requerirían tratamiento. En otras palabras, el término "proceso integrado" significa una combinación de al menos dos operaciones unitarias que explota las interacciones entre diferentes unidades para emplear recursos eficazmente, mejorar la eficiencia de energía, mejorar el equilibrio de materiales, maximizar el beneficio y/o minimizar los costes. Al menos una de las dos operaciones unitarias recibe material y/o energía, y puede ser dependiente de estos, de la otra unidad operación. En un proceso integrado, las interacciones entre las diferentes operaciones unitarias se consideran desde el comienzo, en vez de haberlas optimizado por separado. La integración de procesos no se limita al diseño de nuevas plantas, sino que también cubre el diseño actualizado, por ejemplo nuevas unidades a ser instaladas en una planta antigua, y la operación de sistemas existentes. La presente invención proporciona procesos de producción de alcohol, en donde las unidades de dichos procesos están completamente integradas, y así los procesos son de bajo coste, operación simple y versátiles debido a las alternativas e interconexiones dentro de sus etapas. El proceso integrado es más eficiente en energía y materiales que los procesos individuales juntos, y, como tal, da una mayor productividad con utilización completa y valorización de la biomasa lignocelulósica.

La presente invención se refiere a un proceso integrado para la producción de alcohol a partir de material lignocelulósico, en donde el proceso comprende:

- pretratamiento del material lignocelulósico para obtener material lignocelulósico pretratado,
- hidrólisis enzimática del material lignocelulósico pretratado para obtener material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado, en donde se añade oxígeno durante la hidrólisis enzimática
- separación sólido/líquido del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado para obtener al menos una fracción sólida y al menos una fracción líquida,
- 50 - propagación del microorganismo productor de alcohol por fermentación de la fracción líquida y fermentación de la fracción líquida por el microorganismo productor de alcohol para producir alcohol, en donde el microorganismo productor de alcohol es capaz de fermentar al menos un azúcar C5 y al menos un azúcar C6,
- propagación de un hongo y producción de enzimas por el hongo, en donde una parte del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado y una parte del material lignocelulósico pretratado se usa en la propagación del hongo y/o la producción de enzimas por el hongo y en donde las enzimas producidas por el hongo se usan en la hidrólisis enzimática.

La fracción líquida se usa como sustrato en la producción de alcohol por el microorganismo productor de alcohol. En otras palabras, el microorganismo productor de alcohol fermenta la fracción líquida para producir alcohol.

5 El microorganismo productor de alcohol no fermenta la fracción sólida para producir alcohol. En una realización, la fracción líquida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado se usa como sustrato en la producción de alcohol por el microorganismo productor de alcohol. La fracción líquida y la fracción líquida obtenidas después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado se pueden usar como sustrato en la producción de alcohol por el microorganismo productor de alcohol. El material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado se puede usar como sustrato en la producción de alcohol por el microorganismo productor de alcohol. En otras palabras, el material
10 lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado, antes de someterse a una separación sólido/líquido, se puede usar como sustrato en la producción de alcohol por el microorganismo productor de alcohol.

15 La presente invención se refiere a un proceso integrado para la producción de alcohol a partir de material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado pretratado como se define en las reivindicaciones, en donde el proceso comprende la etapa de propagación del microorganismo productor de alcohol por fermentación de la fracción líquida, en donde el microorganismo productor de alcohol es capaz de fermentar al menos un azúcar C5 y al menos un azúcar C6. Si fuera necesario, se pueden añadir una o más fuentes de carbono y nutrientes externas antes y/o durante la propagación. Las condiciones para la propagación dependerán del tipo de microorganismo usado y entran dentro del alcance del experto.

20 La presente invención se refiere a un proceso integrado para la producción de alcohol a partir de material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado pretratado como se define en las reivindicaciones, en donde el proceso comprende la etapa de propagación de un hongo productor de enzima. Si fuera necesario, se pueden añadir una o más fuentes de carbono y nutrientes externas antes y/o durante la propagación. Las condiciones para la propagación dependerán del tipo de hongo usado y entran dentro del alcance del experto.

25 La presente invención se refiere a un proceso integrado para la producción de alcohol a partir de material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado pretratado como se define en las reivindicaciones, en donde el proceso comprende la etapa de producción de enzimas por un hongo productor de enzima. Si fuera necesario, se pueden añadir una o más fuentes de carbono y nutrientes externas antes y/o durante la producción. Las condiciones para la producción dependerán del tipo de hongo usado y entran dentro del alcance del experto.

30 La hidrólisis enzimática y la fermentación son separadas. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, hidrólisis y fermentación separadas (SHF), hidrólisis y cofermentación separadas (SHCF).

35 El material lignocelulósico se puede someter a al menos una separación sólido/líquido antes de la hidrólisis enzimática. El material lignocelulósico pretratado se puede someter a al menos una separación sólido/líquido antes de la hidrólisis enzimática. Así, antes de someter el material lignocelulósico y/o material lignocelulósico pretratado a hidrólisis enzimática, se puede someter a al menos una separación sólido/líquido. Los métodos y condiciones de separación sólido/líquido dependerán del tipo de material lignocelulósico usado y entran dentro del alcance del experto. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, centrifugación, separación ciclónica, filtración, decantación, tamizado y sedimentación. Durante la separación sólido/líquido, se pueden usar medios y/o auxiliares para mejorar la separación.

40 La fracción líquida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado se puede someter a hidrólisis enzimática. La fracción sólida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado se somete a una separación sólido/líquido adicional. El ciclo se puede repetir varias veces.

45 La fracción sólida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado se puede someter a hidrólisis enzimática, mientras que la fracción líquida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado se puede usar como sustrato en al menos un proceso de fermentación. La fracción líquida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado se puede usar como sustrato en la propagación de microorganismo productor de alcohol y/o se puede usar como sustrato en la fermentación por microorganismo productor de alcohol para producir alcohol.

50 Antes de someter el material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado a una etapa adicional de separación sólido/líquido, se pueden añadir compuestos tales como un auxiliar de centrifugación.

Las enzimas usadas en la hidrólisis enzimática se pueden añadir antes de someter el material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado a una etapa de separación sólido/líquido. Las enzimas terminan entonces parcialmente en la fracción líquida.

55 Una parte del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado se usa en la propagación del hongo productor de enzima y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzima. La parte del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado que se usa en la propagación del hongo productor de enzima y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzima puede ser la fracción líquida obtenida después de la separación

sólido/líquido del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado. Una parte del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado y una parte del material lignocelulósico y el material lignocelulósico pretratado se usan en la propagación del hongo productor de enzima y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzima. Esto significa que una parte del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado y opcionalmente una parte del material lignocelulósico, y una parte del material lignocelulósico pretratado, se añaden al hongo productor de enzima antes y/o durante la propagación y/o antes y/o durante la producción de enzimas por el hongo productor de enzima. Por supuesto, el hongo productor de enzima también se puede añadir a la parte del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado y opcionalmente la parte del material lignocelulósico, y el material lignocelulósico pretratado. El material lignocelulósico y el material lignocelulósico pretratado usados adicionalmente en la propagación del hongo productor de enzima y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzima no se ha sometido a hidrólisis enzimática. La parte del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado que se usa en la propagación del hongo productor de enzima y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzima puede no haberse sometido a una separación sólido/líquido. La parte del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado que se usa en la propagación del hongo productor de enzima y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzima se pueden haber sometido a una separación sólido/líquido. En el último caso, la fracción sólida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado se usa en la propagación del hongo productor de enzima y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzima.

Las enzimas producidas por el hongo productor de enzima se usan en la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico pretratado para obtener material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado.

La propagación del hongo productor de enzima y la producción de enzimas por el hongo productor de enzima pueden ser en una única etapa, que significa que durante la propagación del hongo productor de enzima las enzimas ya son producidas por el hongo.

El material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado que se añade al hongo productor de enzima antes y/o durante la propagación del hongo productor de enzima y/o antes y/o durante la producción de enzimas por el hongo productor de enzima se puede concentrar antes de la adición. La parte del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado que se usa en la propagación del hongo productor de enzima y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzima se puede haber sometido a una separación sólido/líquido. La fracción líquida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado se puede usar en la propagación del hongo productor de enzima y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzima. Esta fracción líquida se puede someter a una etapa de concentración antes de usarse en la propagación del hongo productor de enzima y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzima.

El material lignocelulósico pretratado y opcionalmente el material lignocelulósico que se añade al hongo productor de enzima antes y/o durante la propagación del hongo productor de enzima y/o antes y/o durante la producción de enzimas por el hongo productor de enzima se puede lavar antes de la adición.

La relación entre la parte del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado y la parte del material lignocelulósico pretratado y opcionalmente el material lignocelulósico que se usa en la propagación del hongo productor de enzima y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzima puede estar entre 1 % en peso : 99 % en peso y 99 % en peso : 1 % en peso. Por supuesto, la relación se puede diferenciar en caso de que se usen una o más fuentes de carbono externas en la propagación del hongo productor de enzima y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzima. Cuando la hidrólisis enzimática comprende una etapa de licuefacción y etapa de sacarificación separadas (como se describe en más detalle más adelante), el producto de la etapa de licuefacción se puede usar en la propagación del hongo productor de enzima y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzima. Esto se puede hacer con adición de material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado. Por supuesto, también se puede usar una combinación de parte del lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado con una parte del material lignocelulósico pretratado, y producto de la etapa de licuefacción y fuente externa de carbono y nutrientes en la propagación del hongo productor de enzima y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzima.

Puede variar la parte del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado y la parte del material lignocelulósico pretratado y opcionalmente el material lignocelulósico que se usa en la propagación del hongo productor de enzima y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzima. La parte del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado que se usa en la propagación del hongo productor de enzima y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzima puede ser al menos 1 % en peso, al menos 2 % en peso, al menos 3 % en peso, al menos 4 % en peso, al menos 5 % en peso, al menos 6 % en peso, al menos 7 % en peso, al menos 8 % en peso, al menos 9 % en peso, al menos 10 % en peso, al menos 11 % en peso, al menos 12 % en peso, al menos 13 % en peso, al menos 14 % en peso, al menos 15 % en peso, al menos 20 % en peso del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado total.

La parte del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado que se usa en la propagación del hongo productor de enzima y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzima puede ser al menos 1 % en peso, al menos 2 % en peso, al menos 3 % en peso, al menos 4 % en peso, al menos 5 % en peso, al menos 6 % en peso,

al menos 7 % en peso, al menos 8 % en peso, al menos 9 % en peso, al menos 10 % en peso del material lignocelulósico total y/o el material lignocelulósico pretratado total.

5 Además del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado y el material lignocelulósico pretratado y opcionalmente el material lignocelulósico, se puede usar al menos una fuente externa de carbono y nutrientes en la propagación del hongo productor de enzima y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzima. La fuente externa de carbono y nutrientes puede tener la función de inductor y/o nutriente. Por supuesto, se pueden añadir varias fuentes externas de carbono y nutrientes diferentes. Las fuentes de carbono y nutrientes en la propagación de un hongo productor de enzima y/o en la producción de enzimas por un hongo productor de enzima son conocidas por un experto en la técnica.

10 Después de la hidrólisis enzimática, el material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado se somete a una separación sólido/líquido. Los métodos de separación sólido/líquido incluyen, pero no se limitan a, centrifugación, separación ciclónica, filtración, decantación, tamizado y sedimentación. Durante la separación sólido/líquido, se pueden usar medios y/o auxiliares para mejorar la separación.

15 La separación sólido/líquido conduce a una fracción sólida y una fracción líquida. En una realización, la al menos fracción sólida comprende entre 3 y 97 % en peso de azúcares C5. En una realización, la al menos fracción líquida comprende entre 1 y 97 % en peso de azúcares C6.

20 En una realización, la hidrólisis enzimática comprende al menos una etapa de licuefacción en donde el material lignocelulósico se hidroliza en al menos un primer recipiente, y una etapa de sacarificación en donde el material licuado se hidroliza en el al menos primer recipiente y/o en al menos un segundo recipiente. La sacarificación se puede hacer en el mismo recipiente que la licuefacción (es decir, el al menos primero recipiente), también se puede hacer en un recipiente separado (es decir, al menos un segundo recipiente). Así, en la hidrólisis enzimática de los procesos integrados según la presente invención, se pueden combinar la licuefacción y sacarificación. Alternativamente, la licuefacción y sacarificación pueden ser etapas separadas. La licuefacción y sacarificación se pueden realizar a diferentes temperaturas, pero también se pueden realizar a una única temperatura. La temperatura de la licuefacción puede ser más alta que la temperatura de la sacarificación. La licuefacción se lleva a cabo preferentemente a una temperatura de 60 - 75 °C y la sacarificación se lleva a cabo preferentemente a una temperatura de 50 - 65 °C.

30 La hidrólisis enzimática se puede realizar en uno o más recipientes, pero también se puede realizar en uno o más tubos o cualquier otro sistema continuo. Esto también es válido cuando la hidrólisis enzimática comprende una etapa de licuefacción y una etapa de sacarificación. La etapa de licuefacción se puede realizar en uno o más recipientes, pero también se puede realizar en uno o más tubos o cualquier otro sistema continuo y/o la etapa de sacarificación se puede realizar en uno o más recipientes, pero también se puede realizar en uno o más tubos o cualquier otro sistema continuo. Los ejemplos de recipientes que se van a usar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, recipientes agitados de lotes alimentados, recipientes agitados de lotes, recipientes agitados de flujo continuo con ultrafiltración, y reactores continuos de columna de flujo pistón. La agitación se puede hacer por uno o más impulsores, bombas y/o mezcladoras estáticas.

35 El material lignocelulósico pretratado se puede añadir al uno o más recipientes usados para la hidrólisis enzimática. Las enzimas usadas en la hidrólisis enzimática ya pueden estar presentes en el uno o más recipientes antes de que se añada el material lignocelulósico pretratado. Las enzimas usadas en la hidrólisis enzimática se pueden añadir al uno o más recipientes. El material lignocelulósico pretratado ya está presente en el uno o más recipientes antes de que se añadan las enzimas usadas en la hidrólisis enzimática. El material lignocelulósico pretratado y las enzimas usadas en la hidrólisis enzimática se pueden añadir simultáneamente al uno o más recipientes. Las enzimas usadas en la hidrólisis enzimática pueden ser una composición acuosa. Esto también es válido cuando la hidrólisis enzimática comprenda una etapa de licuefacción y una etapa de sacarificación.

45 Las enzimas usadas en la hidrólisis enzimática se pueden añadir antes y/o durante la hidrólisis enzimática. Como se indicó anteriormente, cuando el material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado se someten a una separación sólido/líquido antes de la hidrólisis enzimática, las enzimas usadas en la hidrólisis enzimática se pueden añadir antes de la separación sólido/líquido. Alternativamente, también se pueden añadir después de la separación sólido/líquido o antes y después de la separación sólido/líquido. Las enzimas también se pueden añadir durante la hidrólisis enzimática. En caso de que la hidrólisis enzimática comprenda una etapa de licuefacción y etapa de sacarificación, se pueden añadir enzimas adicionales durante y/o después de la etapa de licuefacción. Las enzimas adicionales se pueden añadir antes y/o durante la etapa de sacarificación. Las enzimas adicionales también se pueden añadir después de la etapa de sacarificación.

50 El tiempo de hidrólisis enzimática total es 10 horas o más, 12 horas o más, 14 horas o más, 16 horas o más, 18 horas o más, 20 horas o más, 30 horas o más, 40 horas o más, 50 horas o más, 60 horas o más, 70 horas o más, 80 horas o más, 90 horas o más, 100 horas o más, 110 horas o más, 120 horas o más, 130 horas o más, 140 horas o más, 150 horas o más, 160 horas o más, 170 horas o más, 180 horas o más, 190 horas o más, 200 horas o más.

El tiempo de hidrólisis enzimática total es 10 a 300 horas, 16 a 275 horas, preferentemente 20 a 250 horas, más preferentemente 30 a 200 horas, lo más preferentemente 40 a 150 horas.

La viscosidad del material lignocelulósico en el uno o más recipientes usados para la hidrólisis enzimática se mantiene entre 10 y 4000 cP, entre 10 y 2000 cP, preferentemente entre 10 y 1000 cP.

5 En caso de que el proceso integrado comprenda una hidrólisis enzimática que comprenda una etapa de licuefacción y una etapa de sacarificación, la viscosidad del material lignocelulósico en la etapa de licuefacción se mantiene entre 10 y 4000 cP, entre 10 y 2000 cP, preferentemente entre 10 y 1000 cP, y/o la viscosidad del material lignocelulósico en la etapa de sacarificación se mantiene entre 10 y 1000 cP, entre 10 y 900 cP, preferentemente entre 10 y 800 cP.

La viscosidad se puede determinar con un reómetro Brookfield DV III a la temperatura usada para la hidrólisis.

10 Se añade oxígeno durante la hidrólisis enzimática. En una realización, se añade oxígeno durante al menos una parte de la hidrólisis enzimática. El oxígeno se puede añadir continuamente o discontinuamente durante la hidrólisis enzimática. En una realización se añade oxígeno una o más veces durante la hidrólisis enzimática. El oxígeno se puede añadir durante la adición de material pretratado a un recipiente usado de hidrólisis enzimática, durante la adición de enzima a un recipiente usado de hidrólisis enzimática, durante una parte de la hidrólisis enzimática, durante toda la hidrólisis enzimática, o cualquier combinación de los mismos. Se añade oxígeno al uno o más recipientes usados en la hidrólisis enzimática.

15 El oxígeno se puede añadir en varias formas. Por ejemplo, se puede añadir oxígeno como gas oxígeno, gas enriquecido en oxígeno, tal como aire enriquecido en oxígeno, o aire. El oxígeno también se puede añadir por medio de generación *in situ* de oxígeno. Por ejemplo, se puede generar oxígeno por electrólisis, se puede producir oxígeno enzimáticamente, por ejemplo mediante la adición de peróxido, o se puede producir oxígeno químicamente, por ejemplo por un sistema generador de oxígeno tal como KHSO_5 . Por ejemplo, se produce oxígeno a partir de peróxido
20 por catalasa. El peróxido se puede añadir en forma de peróxido disuelto o generar por una reacción enzimática o química. En caso de que se use catalasa como enzima para producir oxígeno, se puede usar la catalasa presente en la composición enzimática para la hidrólisis o se puede añadir catalasa para este fin.

25 Los ejemplos de cómo añadir oxígeno incluyen, pero no se limitan a, adición de oxígeno por medio de burbujeo, electrólisis, adición química de oxígeno, llenado del uno o más recipientes usados en la hidrólisis enzimática desde arriba (sumergiendo el hidrolizado en el tanque y, por consiguiente, introduciendo oxígeno en el hidrolizado) y adición de oxígeno al espacio de cabeza de dicho uno o más recipientes. Cuando se añade oxígeno al espacio de cabeza del (de los) recipiente(s), se puede suministrar oxígeno suficiente necesario para la reacción de hidrólisis. En general, la cantidad de oxígeno añadida al (a los) recipiente(s) se puede controlar y/o variar. La restricción del oxígeno suministrado es posible añadiendo solo oxígeno durante parte del tiempo de hidrólisis en dicho(s) recipiente(s). Otra
30 opción es añadir oxígeno a baja concentración, por ejemplo usando una mezcla de aire y aire recirculado (aire que abandona el recipiente) o "diluyendo" el aire con un gas inerte. El incremento en la cantidad de oxígeno añadida se puede lograr mediante la adición de oxígeno durante periodos más largos del tiempo de hidrólisis, añadiendo el oxígeno a una mayor concentración o añadiendo más aire. Otra forma de controlar la concentración de oxígeno es añadir un consumidor de oxígeno y/o un generador de oxígeno. El oxígeno puede ser introducido, por ejemplo soplado,
35 en el contenido líquido del recipiente de hidrólisis de material lignocelulósico. También puede ser soplado en el espacio de cabeza del recipiente.

40 El oxígeno se puede añadir al uno o más recipientes usados en la hidrólisis enzimática antes y/o durante y/o después de la adición del material lignocelulósico pretratado a dicho uno o más recipientes. El oxígeno puede ser introducido junto con el material lignocelulósico pretratado que entra en el (los) recipiente(s) de hidrólisis. El oxígeno puede ser introducido en la corriente de material que entrará en el (los) recipiente(s) o con parte del contenido del (de los) recipiente(s) que pasa un bucle externo del (de los) recipiente(s).

45 En la hidrólisis enzimática, se hidrolizan polisacárido amorfo y cristalino o celulosa en azúcares tales como glucosa. Los polisacáridos amorfos se convierten, por ejemplo, en oligosacáridos por endoglucanasas y luego los oligosacáridos se pueden convertir por celobiohidrolasas y beta-glucosidasas en glucosa. La conversión del polisacárido cristalino puede ocurrir en paralelo o secuencial y continúa incluso cuando se hidrolizan la mayoría de los polisacáridos amorfos. La adición de oxígeno en combinación con monooxigenasas líticas de polisacárido es beneficiosa durante la hidrólisis del polisacárido cristalino, por ejemplo, en la degradación de los polisacáridos en oligosacáridos. La estructura cristalina del glucano se puede abrir por monooxigenasas líticas de polisacárido. Este tipo de enzima abre la estructura oxidando los enlaces glucosídicos y haciéndolo accesible para las otras enzimas
50 celulolíticas para la hidrólisis adicional de los oligosacáridos en glucosa. La adición de oxígeno es muy útil, especialmente en la fase en donde el polisacárido cristalino se convierte por enzimas.

55 El (Los) recipiente(s) usado(s) en la hidrólisis enzimática de los procesos integrados de la presente invención tienen un volumen de al menos 1 m³. Preferentemente, los recipientes tienen un volumen de al menos 1 m³, al menos 2 m³, al menos 3 m³, al menos 4 m³, al menos 5 m³, al menos 6 m³, al menos 7 m³, al menos 8 m³, al menos 9 m³, al menos 10 m³, al menos 15 m³, al menos 20 m³, al menos 25 m³, al menos 30 m³, al menos 35 m³, al menos 40 m³, al menos 45 m³, al menos 50 m³, al menos 60 m³, al menos 70 m³, al menos 75 m³, al menos 80 m³, al menos 90 m³, al menos 100 m³, al menos 200 m³, al menos 300 m³, al menos 400 m³, al menos 500 m³, al menos 600 m³, al menos 700 m³, al menos 800 m³, al menos 900 m³, al menos 1000 m³, al menos 1500 m³, al menos 2000 m³, al menos 2500 m³. En general, el (los) recipiente(s) serán más pequeños de 3000 m³ o 5000 m³. En caso de usar varios recipientes en la

5 hidrólisis enzimática de los procesos integrados de la presente invención, pueden tener el mismo volumen, pero también pueden tener un volumen diferente. En caso de que la hidrólisis enzimática de los procesos integrados de la presente invención comprenda una etapa de licuefacción separada y etapa de sacarificación, el (los) recipiente(s) usados para la etapa de licuefacción y el (los) recipiente(s) usados para la etapa de sacarificación pueden tener el mismo volumen, pero también pueden tener un volumen diferente.

10 El (Los) recipiente(s) usado(s) en la fermentación de la fracción y/o la al menos fracción líquida por un microorganismo productor de alcohol para producir alcohol tienen un volumen de al menos 1 m³. Preferentemente, los recipientes tienen un volumen de al menos 1 m³, al menos 2 m³, al menos 3 m³, al menos 4 m³, al menos 5 m³, al menos 6 m³, al menos 7 m³, al menos 8 m³, al menos 9 m³, al menos 10 m³, al menos 15 m³, al menos 20 m³, al menos 25 m³, al menos 30 m³, al menos 35 m³, al menos 40 m³, al menos 45 m³, al menos 50 m³, al menos 60 m³, al menos 70 m³, al menos 75 m³, al menos 80 m³, al menos 90 m³, al menos 100 m³, al menos 200 m³, al menos 300 m³, al menos 400 m³, al menos 500 m³, al menos 600 m³, al menos 700 m³, al menos 800 m³, al menos 900 m³, al menos 1000 m³, al menos 1500 m³, al menos 2000 m³, al menos 2500 m³, al menos 3000 m³, al menos 3500 m³, al menos 4000 m³, al menos 4500 m³. En general, el (los) recipiente(s) serán más pequeños de 5000 m³.

15 El (Los) recipiente(s) usado(s) en la fermentación de la fracción y/o la al menos fracción sólida por un microorganismo productor de ácido orgánico para producir un ácido orgánico tienen un volumen de al menos 1 m³. Preferentemente, los recipientes tienen un volumen de al menos 1 m³, al menos 2 m³, al menos 3 m³, al menos 4 m³, al menos 5 m³, al menos 6 m³, al menos 7 m³, al menos 8 m³, al menos 9 m³, al menos 10 m³, al menos 15 m³, al menos 20 m³, al menos 25 m³, al menos 30 m³, al menos 35 m³, al menos 40 m³, al menos 45 m³, al menos 50 m³, al menos 60 m³, al menos 70 m³, al menos 75 m³, al menos 80 m³, al menos 90 m³, al menos 100 m³, al menos 200 m³, al menos 300 m³, al menos 400 m³, al menos 500 m³, al menos 600 m³, al menos 700 m³, al menos 800 m³, al menos 900 m³, al menos 1000 m³, al menos 1500 m³. En general, el (los) recipiente(s) serán más pequeños de 2000 m³.

25 El (Los) recipiente(s) usado(s) en la propagación del microorganismo productor de alcohol por fermentación de la fracción líquida y/o la fracción sólida tienen un volumen de al menos 1 m³. Preferentemente, los recipientes tienen un volumen de al menos 1 m³, al menos 2 m³, al menos 3 m³, al menos 4 m³, al menos 5 m³, al menos 6 m³, al menos 7 m³, al menos 8 m³, al menos 9 m³, al menos 10 m³, al menos 15 m³, al menos 20 m³, al menos 25 m³, al menos 30 m³, al menos 35 m³, al menos 40 m³, al menos 45 m³, al menos 50 m³, al menos 60 m³, al menos 70 m³, al menos 75 m³, al menos 80 m³, al menos 90 m³, al menos 100 m³, al menos 200 m³, al menos 300 m³, al menos 400 m³. En general, el (los) recipiente(s) serán más pequeños de 500 m³.

30 El (Los) recipiente(s) usado(s) en la propagación de un microorganismo productor de enzima tienen un volumen de al menos 1 m³. Preferentemente, los recipientes tienen un volumen de al menos 1 m³, al menos 2 m³, al menos 3 m³, al menos 4 m³, al menos 5 m³, al menos 6 m³, al menos 7 m³, al menos 8 m³, al menos 9 m³, al menos 10 m³, al menos 15 m³, al menos 20 m³, al menos 25 m³, al menos 30 m³, al menos 35 m³, al menos 40 m³, al menos 45 m³, al menos 50 m³, al menos 60 m³, al menos 70 m³, al menos 75 m³, al menos 80 m³, al menos 90 m³, al menos 100 m³, al menos 200 m³, al menos 300 m³, al menos 400 m³. En general, el (los) recipiente(s) serán más pequeños de 500 m³.

40 El (Los) recipiente(s) usado(s) en la producción de enzimas por el microorganismo productor de enzima tienen un volumen de al menos 1 m³. Preferentemente, los recipientes tienen un volumen de al menos 1 m³, al menos 2 m³, al menos 3 m³, al menos 4 m³, al menos 5 m³, al menos 6 m³, al menos 7 m³, al menos 8 m³, al menos 9 m³, al menos 10 m³, al menos 15 m³, al menos 20 m³, al menos 25 m³, al menos 30 m³, al menos 35 m³, al menos 40 m³, al menos 45 m³, al menos 50 m³, al menos 60 m³, al menos 70 m³, al menos 75 m³, al menos 80 m³, al menos 90 m³. En general, el (los) recipiente(s) serán más pequeños de 100 m³.

45 El microorganismo productor de enzima es un hongo. En una realización, las enzimas derivan de un hongo filamentoso o las enzimas comprenden una enzima fúngica filamentosa. En una realización preferida, el hongo es *Rasamsonia*, siendo *Rasamsonia emersonii* el más preferido. Las enzimas usadas en la hidrólisis enzimática de los procesos integrados de la presente invención derivan de un hongo o las enzimas usadas en la hidrólisis enzimática de los procesos integrados de la presente invención comprenden una enzima fúngica. "Hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (como se define por Hawksworth et al., en Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, R. U.). Los hongos filamentosos se caracterizan por una pared micelial compuesta de quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por estiramiento de hifas y el catabolismo del carbono es aerobio obligado. Las cepas fúngicas filamentosas incluyen, pero no se limitan a, cepas de *Acremonium*, *Agaricus*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Beauvaria*, *Cephalosporium*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomium paecilomyces*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochiobolus*, *Coprinus*, *Cryptococcus*, *Cyathus*, *Emericella*, *Endothia*, *Endothia mucor*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Geosmithia*, *Gilocladium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Myrothecium*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Panerochaete*, *Pleurotus*, *Podospora*, *Pyricularia*, *Rasamsonia*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Scytladium*, *Schizophyllum*, *Stagonospora*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thermomyces*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes pleurotus*, *Trichoderma* y *Trichophyton*.

60 Varias cepas de hongos filamentosos están fácilmente accesibles al público en varias colecciones de cultivo, tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y Agricultural Research Service Patent Culture

Collection, Northern Regional Research Center (NRRL). Los ejemplos de dichas cepas incluyen *Aspergillus niger* CBS 513.88, *Aspergillus oryzae* ATCC 20423, IFO 4177, ATCC 1011, ATCC 9576, ATCC14488-14491, ATCC 11601, ATCC12892, *P. chrysogenum* CBS 455.95, *Penicillium citrinum* ATCC 38065, *Penicillium chrysogenum* P2, *Talaromyces emersonii* CBS 393.64, *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225 o ATCC 48272, *Trichoderma reesei* ATCC 26921 o ATCC 56765 o ATCC 26921, *Aspergillus sojae* ATCC11906, *Chrysosporium lucknowense* C1, Garg 27K, VKM F-3500-D, ATCC44006 y derivados de los mismos.

La hidrólisis enzimática de los procesos integrados de la presente invención se aplica ventajosamente en combinación con enzimas derivadas de un microorganismo del género *Rasamsonia*, o las enzimas usadas en la hidrólisis enzimática de los procesos integrados de la presente invención comprenden una enzima *Rasamsonia*.

La hidrólisis enzimática de la primera etapa se hace preferentemente a 50 - 90 °C. En esta etapa, se prefieren enzimas celulolíticas termoestables. Una enzima "termoestable", como se usa en este documento, significa que la enzima tiene un óptimo de temperatura de 50 °C o superior, 60 °C o superior, 70 °C o superior, 75 °C o superior, 80 °C o superior, 85 °C o superior. Se pueden aislar, por ejemplo, de los microorganismos termófilos o se pueden diseñar por el experto y sintetizar artificialmente. En una realización, los polinucleótidos se pueden aislar u obtener de hongos filamentosos termófilos o termotolerantes, o aislar de hongos no termófilos o no termotolerantes, pero se encuentran que son termoestables.

Por "hongo termófilo" se indica un hongo que crece a una temperatura de 50 °C o superior. Por hongo "termotolerante" se indica un hongo que crece a una temperatura de 45 °C o superior, que tiene un máximo próximo a 50 °C.

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

Los hongos termófilos no están restringidos a un orden taxonómico específico y ocurren en todo el árbol fúngico de la vida. Los ejemplos son *Rhizomucor* en los Mucorales, *Myceliophthora* en Sordariales y *Talaromyces*, *Thermomyces* y *Thermoascus* en los Eurotiales (véase Mouchacca, 1997). La mayoría de las especies de *Talaromyces* son mesófilos, pero excepciones son especies dentro de las secciones *Emersonii* y *Thermophila*. La sección *Emersonii* incluye *Talaromyces emersonii*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Talaromyces bacillisporus* y *Talaromyces leycettanus*, todos los cuales crecen bien a 40 °C. *Talaromyces bacillisporus* es termotolerante, *Talaromyces leycettanus* es termotolerante a termófilos, y *Talaromyces emersonii* y *Talaromyces byssochlamydoides* son realmente termófilos (véase Stolk y Samson, 1972). El único miembro de la sección de *Talaromyces Thermophila*, *Talaromyces thermophilus*, crece rápidamente a 50 °C (véase Stolk y Samson, 1972). La actual clasificación de estas especies termófilas de *Talaromyces* se basa principalmente en caracteres fenotípicos y fisiológicos, tales como su capacidad para crecer por encima de 40 °C, color de ascospora, la estructura de cobertura ascornatal y la formación de un cierto tipo de anamorfo. Stolk y Samson (1972) establecieron que los miembros de la sección *Emersonii* tienen anamorfos de o la serie de *Paecilomyces (Talaromyces byssochlamydoides* y *Talaromyces leycettanus*) o de *Penicillium cylindrosporum (Talaromyces emersonii* y *Talaromyces bacillisporus*). Posteriormente, Pitt (1979) transfirió las especies que pertenecían a la serie de *Penicillium cylindrosporum* al género *Geosmitia*, basándose en los diversos caracteres, tales como la formación de conidios de poros terminales, en lugar de sobre cólulos (cuellos), un carácter de *Penicillium* y *Paecilomyces*. Dentro del género *Geosmitia*, solo *Geosmitia argillacea* es termotolerante, y Stolk et al. (1969) y Evans (1971) propusieron una conexión con los miembros de *Talaromyces* sect. *Emersonii*. La relación filogenética de la especie termófila de *Talaromyces* dentro de *Talaromyces* y Trichocomaceae es desconocida (véase J. Houbraken, Antonie van Leeuwenhoek 2012 Feb; 101(2): 403-21).

Rasamsonia es un nuevo género que comprende especies termotolerantes y termófilas de *Talaromyces* y *Geosmithia* (J. Houbraken et al., véase arriba). Basándose en datos fenotípicos, fisiológicos y moleculares, Houbraken et al. propusieron transferir las especies *Talaromyces emersonii*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Talaromyces eburneus*, *Geosmithia argillacea* y *Geosmithia cylindrospora* a *Rasamsonia* gen. nov. Los hongos termófilos preferidos son *Rasamsonia byssochlamydoides*, *Rasamsonia emersonii*, *Thermomyces lenuginosus*, *Talaromyces thermophilus*, *Thermoascus crustaceus*, *Thermoascus thermophilus* y *Thermoascus aurantiacus*, siendo *Rasamsonia emersonii* el más preferido. *Talaromyces emersonii*, *Penicillium geosmithia emersonii* y *Rasamsonia emersonii* se usan indistintamente en el presente documento.

Las enzimas celulolíticas de *Rasamsonia* aplicadas sobre materia prima lignocelulósica pretratada muestran velocidades de conversión máximas a temperatura dentro del intervalo de 50 a 70 °C. Las enzimas siguen activas en estas circunstancias durante 14 días y más sin cese completo de actividad. Usando condiciones óptimas de temperatura, se puede liberar una cantidad máxima de azúcares reductores del material lignocelulósico (hidrólisis total) en el plazo de tiempo de hidrólisis más corto posible. De esta forma, se puede lograr 100 % de conversión de celulosa en glucosa en menos de 5 días. El rendimiento máximo teórico (Yps máx en g de producto por gramo de

glucosa) de un producto de fermentación se puede obtener de la bioquímica de libros de texto. Para etanol, 1 mol de glucosa (180 g) da según la vía normal de fermentación por glicólisis en levadura 2 moles de etanol (= $2 \times 46 = 92$ g de etanol). El rendimiento máximo teórico de etanol sobre glucosa es, por tanto, $92/180 = 0,511$ g de etanol/g de glucosa. Para butanol (MW 74 g/mol) o isobutanol, el rendimiento máximo teórico es 1 mol de butanol por mol de glucosa. Así, Yps máx para (iso)butanol = $74/180 = 0,411$ g de (iso)butanol/g de glucosa. Para láctico ácido, el rendimiento de fermentación para la fermentación homoláctica es 2 moles de ácido láctico (MW = 90 g/mol) por mol de glucosa. Según esta estequiometría, Yps máx = 1 g de láctico ácido/g de glucosa. El rendimiento máximo teórico de ácido succínico sobre glucosa es 1,12 g de ácido succínico/g de glucosa. Para otros productos de fermentación se puede hacer un cálculo similar. La reducción de coste lograda aplicando enzimas celulolíticas de *Rasamsonia* es el resultado de una reducción global del tiempo de proceso.

Debido a la alta estabilidad de las enzimas usadas en los procesos de la presente invención, es posible reducir la dosificación de enzimas y alargar el uso de la enzima prolongando los tiempos de hidrólisis. Por ejemplo, 0,175 mL de enzima/g de materia seca de material lignocelulósico pretratado da como resultado la liberación de aproximadamente 90 % del máximo teórico de azúcares reductores del material lignocelulósico pretratado en el plazo de 72 h. Cuando se usan 0,075 mL de enzima/g de materia seca de material lignocelulósico, aproximadamente 90 % de la conversión del máximo teórico se logra en el plazo de 120 h. Los resultados muestran que, debido a la estabilidad de la actividad enzimática, el reducir la dosificación de enzimas puede ser compensado por alargar el tiempo de hidrólisis para obtener la misma cantidad de azúcares reductores. La reducción de coste lograda usando enzimas celulolíticas estables, tales como las de *Rasamsonia*, da como resultado menores dosificaciones de enzima que sin embargo dan como resultado rendimientos similares de la conversión de la hidrólisis.

En un proceso común para convertir material lignocelulósico en etanol, las etapas de proceso se hacen preferentemente en condiciones sépticas para reducir los costes de operación. La contaminación y el crecimiento de microorganismos contaminantes puede ocurrir, por tanto, y dar como resultado efectos secundarios no deseables, tales como la producción de ácido láctico, ácido fórmico y ácido acético, pérdidas de rendimiento de etanol sobre el sustrato, producción de toxinas y polisacáridos extracelulares. Estos efectos pueden afectar significativamente los costes de producción. Una alta temperatura de proceso y/o un corto tiempo de proceso limita el riesgo de la contaminación durante la hidrólisis y la fermentación. Las enzimas termostables, como las de *Rasamsonia*, son capaces de hidrolizar material lignocelulósico a temperaturas superiores a 60 °C. A estas temperaturas, el riesgo de que un microorganismo contaminante provoque efectos secundarios no deseados es de pequeño a casi cero.

Durante la etapa de fermentación, en la que se produce etanol, las temperaturas están normalmente entre 30 y 38 °C y preferentemente no se elevan debido a pérdidas de producción. Aplicando tiempos cortos del proceso de fermentación, se reducen los riesgos y efectos de la contaminación y/o crecimiento de contaminantes en la medida de lo posible. Con enzimas estables, como las de *Rasamsonia*, se puede aplicar un tiempo de fermentación corto y así se reducen los riesgos de contaminación y/o el crecimiento de contaminantes en la medida de lo posible. La reducción de coste lograda con la aplicación de enzimas celulolíticas termoestable de *Rasamsonia* de esta forma da como resultado un menor riesgo de fallos de proceso debido a contaminación.

La primera etapa después del pretratamiento térmico es enfriar el material pretratado hasta temperaturas en donde las enzimas tienen una actividad óptima. A gran escala, esto se hace normalmente añadiendo agua (enfriada), que, además de disminuir la temperatura, reduce el contenido de materia seca. Usando enzimas termoestables, como las de *Rasamsonia*, se puede lograr la reducción de coste, debido a que (i) se requiere menos enfriamiento del material pretratado puesto que se permiten temperaturas más altas durante la hidrólisis, y (ii) se añade menos agua, que incrementa el contenido de materia seca durante la hidrólisis y la fermentación y así incrementa la capacidad de producción de etanol (cantidad producida por unidad de tiempo por volumen) de una planta de etanol. Usando enzimas termoestables, como las de *Rasamsonia*, la reducción de coste también se puede lograr usando agua de refrigeración que tienen una temperatura más alta que el agua que se usa en un proceso con enzima no termostable.

Al final de la hidrólisis, parece que las actividades enzimáticas son bajas, puesto que se liberan pocos azúcares reductores una vez se convierte casi toda la celulosa. La cantidad de actividad enzimática presente, sin embargo, solo ha disminuido un poco, supuestamente principalmente debido a la absorción de las enzimas al sustrato. Aplicando separación sólido-líquido después de la hidrólisis, tal como centrifugación, filtración, decantación, sedimentación, se puede recuperar y reutilizar 60 % o más (por ejemplo 70 %) de la actividad enzimática en disolución para la hidrólisis de un nuevo material lignocelulósico pretratado durante la siguiente hidrólisis. Además, después de la separación sólido-líquido, la enzima en disolución se puede separar de la disolución que contiene azúcares reductores y otros productos de hidrólisis de las acciones enzimáticas. Esta separación se puede hacer por técnicas que incluyen, pero no se limitan a, ultra- y microfiltración, centrifugación, decantación, sedimentación, con o sin primera adsorción de la enzima a un vehículo de cualquier tipo. Por ejemplo, después de la hidrólisis de material pretratado con 0,175 mL/g de carga de enzima de materia seca de material durante 20 h, se libera 50 % de la cantidad máxima teórica de azúcares reductores y después de la misma hidrólisis durante 72 h, se libera 90 % de la cantidad máxima teórica de azúcares reductores. Por centrifugación y ultrafiltración, se recuperó 60-70 % de la actividad enzimática en el concentrado, mientras que el filtrado contuvo más de 80 % de los azúcares reductores liberados. Reutilizando el concentrado, o tal cual o después de más purificación y/o concentración, la dosificación de enzima durante la siguiente etapa de hidrólisis se pueden reducir en 60 a 70 %. La reducción de coste lograda usando enzimas celulolíticas estables, tales como las de *Rasamsonia*, de esta forma es la consecuencia de una menor dosificación de enzima.

Los procesos integrados de la presente invención se pueden combinar con recirculación de enzima después de la hidrólisis, recirculación del microorganismo productor de etanol después de la fermentación y/o recirculación del hongo productor de enzima después de la producción de las enzimas.

5 La termoestabilidad de enzimas, como la de *Rasamsonia*, provoca actividad celulolítica residual después de la hidrólisis, fermentación y destilación a vacío en las vinazas ligeras. La actividad total de la enzima se reduce durante las tres etapas de proceso sucesivas. Las vinazas ligeras obtenidas después de la destilación a vacío se pueden así reutilizar como una fuente de enzima para un ciclo de proceso de hidrólisis-fermentación-destilación recientemente iniciado de conversión de material pretratado en etanol. Las vinazas ligeras se pueden usar o en forma concentrada o (no) diluida y/o purificada y con o sin suplementación adicional de enzima.

10 En un proceso óptimo, se complementa una cantidad de enzima en las vinazas ligeras, antes su reutilización en un nuevo ciclo de proceso, igual a la cantidad de actividad perdida durante las tres etapas de proceso sucesivas del ciclo de proceso previo. De esta forma, se evita la dosificación en exceso de la enzima y así se obtiene el uso más eficiente de enzima. Además, proporcionando la alta dosificación de enzima en el primer ciclo de proceso, y suplementando enzima igual a la cantidad de actividad perdida durante las tres etapas de proceso sucesivas en los siguientes ciclos de proceso, se pueden obtener las tasas de hidrólisis más altas posibles en cada ciclo de proceso dando como resultado tiempos de hidrólisis cortos de menos de 48 h en combinación con el uso más eficiente de enzimas.

15 Aplicando mezcla durante la hidrólisis, las enzimas se ponen más frecuentemente en contacto con los sustratos, que da como resultado un uso más eficiente de la actividad catalítica. Esto dará como resultado dosificaciones de enzimas más bajas y así menores costes, a menos que la mezcla tenga un efecto negativo sobre las enzimas. Las enzimas estables, como las enzimas termoestables de *Rasamsonia*, son robustas y pueden resistir las circunstancias de cizallamiento y temperaturas (localmente) altas, que es el caso durante la intensa mezcla de las suspensiones. El uso de ellas en sistemas mixtos es, por tanto, beneficioso y conducirá a dosificación y así a reducción de costes.

20 Una ventaja de la expresión y producción de las enzimas (por ejemplo, al menos dos, tres o cuatro celulasas diferentes) en un microorganismo adecuado pueden ser un alto rendimiento de la composición de enzimas que se puede usar en los procesos de la presente invención.

25 En los procesos de la presente invención se usan composiciones de enzima. Preferentemente, las composiciones son estables. "Composiciones estables de enzima", como se usa en este documento, significa que las composiciones de enzima retienen la actividad después de 30 horas de tiempo de la reacción de la hidrólisis, preferentemente al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de su actividad inicial después de 30 horas de tiempo de la reacción de la hidrólisis. Preferentemente, la composición de enzima retiene la actividad después de 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 horas de tiempo de la reacción de hidrólisis.

30 Las enzimas se pueden preparar por fermentación de un sustrato adecuado con un microorganismo adecuado, por ejemplo, *Rasamsonia emersonii* o *Aspergillus niger*, en donde las enzimas se producen por el microorganismo. El microorganismo se puede alterar para mejorar o preparar las enzimas. Por ejemplo, el microorganismo se puede mutar por procedimientos clásicos de mejora de cepas o por técnicas de ADN recombinante. Por tanto, los microorganismos mencionados en el presente documento se pueden usar como tales para producir las enzimas o se pueden alterar para incrementar la producción o para producir enzimas alteadas que podrían incluir enzimas heterólogas, por ejemplo celulasas, así enzimas que no son originalmente producidas por ese microorganismo. Preferentemente, se usa un hongo, más preferentemente un hongo filamentoso, para producir las enzimas. Ventajosamente, se usa un microorganismo termófilo o termotolerante. Opcionalmente, se usa un sustrato que induce la expresión de las enzimas por el microorganismo productor de enzima.

35 Las enzimas se usan para liberar azúcares de material lignocelulósico, que comprende polisacáridos. Los principales polisacáridos son celulosa (glucanos), hemicelulosas (xilanos, heteroxilanos y xiloglucanos). Además, algunas hemicelulosas pueden estar presentes como glucomananos, por ejemplo en material lignocelulósico derivado de la madera. La hidrólisis enzimática de estos polisacáridos a azúcares solubles, incluyendo tanto monómeros como multímeros, por ejemplo glucosa, celobiosa, xilosa, arabinosa, galactosa, fructosa, manosa, ramnosa, ribosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico y otras hexosas y pentosas, ocurre bajo la acción de diferentes enzimas que actúan en concierto. Por producto de azúcar se indica el producto de la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico. El producto de azúcar comprende azúcares solubles, que incluyen tanto monómeros como multímeros. Preferentemente, comprende glucosa. Los ejemplos de otros azúcares son celobiosa, xilosa, arabinosa, galactosa, fructosa, manosa, ramnosa, ribosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico y otras hexosas y pentosas. El producto de azúcar se puede usar como tal o se puede procesar adicionalmente, por ejemplo recuperar, concentrar y/o purificar.

40 Además, las pectinas y otras sustancias pécticas tales como los arabinanos pueden constituir una proporción considerable de la masa seca de paredes normalmente celulares de tejidos de plantas no leñosas (aproximadamente de un cuarto a la mitad de la masa seca pueden ser pectinas).

45 La celulosa es un polisacárido lineal compuesto de residuos de glucosa unidos por enlaces β -1,4. La naturaleza lineal de las fibras de celulosa, además de la estequiometría de la glucosa unida en β (con respecto a α), genera estructuras

más propensas a enlaces de hidrógeno entre cadenas que las estructuras de almidón unidas en α altamente ramificadas. Así, los polímeros de celulosa son, en general, menos solubles, y forman fibras más estrechamente unidas que las fibras encontradas en el almidón.

Las enzimas que se pueden usar en el proceso de la invención se describen más abajo en más detalle.

- 5 Las monooxigenasas líticas de polisacárido, endoglucanasas (EG) y exo-celobiohidrolasas (CBH) catalizan la hidrólisis de celulosa insoluble en productos tales como celooligosacáridos (celobiosa como el producto principal), mientras que las β -glucosidasas (BG) convierten los oligosacáridos, principalmente celobiosa y celotriosa, en glucosa.

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

15 Las xilanasas, junto con otras enzimas accesorias, por ejemplo, α -L-arabinofuranosidasas, feruloil y acetilxilano estererasas, glucuronidasas y β -xilosidasas) catalizan la hidrólisis de la hemicelulosa.

20 Las sustancias pécticas incluyen pectinas, arabinanos, galactanos y arabinogalactanos. Las pectinas son los polisacáridos más complejos en la pared celular vegetal. Se constituyen alrededor de una cadena central de unidades de ácido D-galacturónico unidas en α (1,4) intercaladas hasta cierto grado con L-ramnosa. En una pared celular cualquiera hay varias unidades estructurales que se ajustan a esta descripción y se ha considerado, en general, que en una única molécula péctica, las cadenas centrales de diferentes unidades estructurales son continuas entre sí. Los principales tipos de unidad estructural son: galacturonano (homogalacturonano), que se puede sustituir con metanol en el grupo carboxilo y acetato en O-2 y O-3; ramnogalacturonano I (RGI), en el que las unidades de ácido galacturónico se alternan con unidades de ramnosa que llevan cadenas laterales de galactano unido en (1,4) y arabinano unido en (1,5). Las cadenas laterales de arabinano se pueden unir directamente a ramnosa o indirectamente mediante las cadenas de galactano; xilogalacturonano, con unidades individuales de xilosilo en O-3 de ácido galacturónico (estrechamente asociado a RGI); y ramnogalacturonano II (RGII), una unidad menor particularmente compleja que contiene azúcares poco usuales, por ejemplo apiosa. Una unidad de RGII puede contener dos restos de apiosilo que, en condiciones iónicas adecuadas, pueden formar reversiblemente ésteres con borato.

30 Las enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención comprenden preferentemente al menos dos actividades, aunque normalmente las enzimas comprenderán más de dos actividades, por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o incluso más actividades. Normalmente, las enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención comprenden al menos dos celulasas. Las al menos dos celulasas pueden contener las mismas actividades o diferentes. Las enzimas para su uso en los procesos integrados de la presente invención también pueden comprender al menos una enzima distinta de una celulasa. Preferentemente, la al menos otra enzima tiene una actividad enzimática auxiliar, es decir, una actividad adicional que, o directamente o indirectamente conduce a la degradación de lignocelulosa. Los ejemplos de dichas actividades auxiliares se mencionan en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, hemicelulasas.

35 Así, las enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención pueden comprender actividad de monooxigenasa lítica de polisacárido, actividad de endoglucanasa y/o actividad de celobiohidrolasa y/o actividad de beta-glucosidasa. Las enzimas para su uso en la invención pueden comprender más de una actividad enzimática por clase de actividad. Por ejemplo, las enzimas para su uso en la invención pueden comprender dos actividades de endoglucanasa, por ejemplo, actividad de endo-1,3(1,4)- β -glucanasa y actividad de endo- β -1,4-glucanasa.

40 Las enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención derivan de un hongo, tal como un hongo filamentoso tal como *Rasamsonia*, tal como *Rasamsonia emersonii*. En una realización, un conjunto básico de actividades de enzimas (degradadoras de lignocelulosa) se pueden derivar de *Rasamsonia emersonii*. *Rasamsonia emersonii* puede proporcionar un conjunto altamente eficaz de actividades como se demuestra en el presente documento para la hidrólisis de material lignocelulósico. Si se necesita, el conjunto de actividades puede ser complementado con actividades de enzimas adicionales de otras fuentes. Dichas actividades adicionales se pueden derivar de fuentes clásicas y/o producir por organismos genéticamente modificados.

45 Las actividades de enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención pueden ser termoestables. En el presente documento, esto significa que la actividad tiene un óptimo de temperatura de 60 °C o superior, 70 °C o superior, 75 °C o superior, 80 °C o superior, 85 °C o superior. Las actividades para su uso en los procesos integrados de la invención normalmente no tendrán el mismo óptimo de temperatura, pero preferentemente serán, sin embargo, termoestables.

55 Además, las actividades de enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención pueden ser capaces de funcionar a pH bajo. A efectos de esta invención, pH bajo indica un pH de 5,5 o inferior, 5 o inferior, 4,9 o inferior, 4,8

o inferior, 4,7 o inferior, 4,6 o inferior, 4,5 o inferior, 4,4 o inferior, 4,3 o inferior, 4,2 o inferior, 4,1 o inferior, 4,0 o inferior, 3,9 o inferior, 3,8 o inferior, 3,7 o inferior, 3,6 o inferior, 3,5 o inferior.

Las actividades para su uso en los procesos integrados de la invención se pueden definir por una combinación de cualquiera de los óptimos de temperatura y valores de pH anteriores.

- 5 Las enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención pueden comprender una celulasa y/o una hemicelulasa y/o una pectinasa de una fuente distinta de *Rasamsonia*. Se pueden usar junto con una o más enzimas de *Rasamsonia* o se pueden usar sin estar presentes enzimas de *Rasamsonia* adicionales.

Por ejemplo, las enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención pueden comprender una beta-glucosidasa (BG) de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus oryzae*, tal como la desvelada en el documento de patente
 10 WO 02/095014 o la proteína de fusión que tiene actividad de beta-glucosidasa desvelada en el documento de patente WO 2008/057637, o *Aspergillus fumigatus*, tal como la desvelada como SEQ ID NO: 2 en el documento de patente WO 2005/047499 o SEQ ID NO: 5 en el documento de patente WO 2014/130812 o una variante beta-glucosidasa de de *Aspergillus fumigatus*, tal como una desvelada en el documento de patente WO 2012/044915, tal como una con las siguientes sustituciones: F100D, S283G, N456E, F512Y (usando SEQ ID NO: 5 en el documento de patente
 15 WO 2014/130812 para numeración), o *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus kawachii*. En otra realización, la beta-glucosidasa deriva de *Penicillium*, tal como *Penicillium brasilianum* desvelado como SEQ ID NO: 2 en el documento de patente WO 2007/019442, o de *Trichoderma*, tal como *Trichoderma reesei*, tal como las descritas en los documentos de patente US 6.022.725, US 6.982.159, US 7.045.332, US 7.005.289, US 2006/0258554, US 2004/0102619. Se puede usar una beta-glucosidasa bacteriana. La beta-glucosidasa se pueden derivar de *Thielavia*
 20 *terrestris* (documento de patente WO 2011/035029) o *Trichophaea saccata* (documento de patente WO 2007/019442).

Por ejemplo, las enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención pueden comprender una endoglucanasa (EG) de *Trichoderma*, tal como *Trichoderma reesei*; de *Humicola*, tal como una cepa de *Humicola*
 25 *insolens*; de *Aspergillus*, tales como *Aspergillus aculeatus* o *Aspergillus kawachii*; de *Erwinia*, tal como *Erwinia carotovora*; de *Fusarium*, tal como *Fusarium oxysporum*; de *Thielavia*, tal como *Thielavia terrestris*; de *Humicola*, tal como *Humicola grisea var. thermoidea* o *Humicola insolens*; de *Melanocarpus*, tal como *Melanocarpus albomyces*; de *Neurospora*, tal como *Neurospora crassa*; de *Myceliophthora*, tal como *Myceliophthora thermophila*; de *Cladorrhinum*, tal como *Cladorrhinum foecundissimum* y/o de *Chrysosporium*, tal como una cepa de *Chrysosporium lucknowense*. Se puede usar una endoglucanasa bacteriana que incluye, pero no se limita a, endoglucanasa de *Acidothermus*
 30 *cellulolyticus* (véanse los documentos de patente WO 91/05039; WO 93/15186; US 5.275.944; WO 96/02551; US 5.536.655. WO 00/70031. WO 05/093050); endoglucanasa III de *Thermobifida fusca* (véase el documento de patente WO 05/093050); y endoglucanasa V de *Thermobifida fusca* (véase el documento de patente WO 05/093050).

Por ejemplo, las enzimas para su uso en los procesos integrados de la presente invención pueden comprender una celobiohidrolasa I de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus fumigatus*, tal como Cel7A CBH I desvelada en SEQ ID NO:6
 35 en el documento de patente WO 2011/057140 o SEQ ID NO:6 en el documento de patente WO 2014/130812, o de *Trichoderma*, tal como *Trichoderma reesei*.

Por ejemplo, las enzimas para su uso en los procesos integrados de la presente invención pueden comprender una celobiohidrolasa II de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus fumigatus*, tal como aquella en SEQ ID NO:7 en el documento de patente WO 2014/130812 o de *Trichoderma*, tal como *Trichoderma reesei*, o de *Thielavia*, tal como *Thielavia*
terrestris, tal como CEL6A de celobiohidrolasa II de *Thielavia terrestris*.

Por ejemplo, las enzimas para su uso en los procesos integrados de la presente invención pueden comprender un polipéptido GH61 (una monooxigenasa lítica de polisacárido) de *Thermoascus*, tal como *Thermoascus aurantiacus*, tal como la descrita en el documento de patente WO 2005/074656 como SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:1 en el documento de patente WO2014/130812 y en el documento de patente WO 2010/065830; o de *Thielavia*, tal como
 40 *Thielavia terrestris*, tal como la descrita en el documento de patente WO 2005/074647 como SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO:4 en el documento de patente WO2014/130812 y en el documento de patente WO 2008/148131, y el documento de patente WO 2011/035027; o de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus fumigatus*, tal como la descrita en el documento de patente WO 2010/138754 como SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO: 3 en el documento de patente WO2014/130812; o de *Penicillium*, tal como *Penicillium emersonii*, tal como la desvelada como SEQ ID NO:2 en el documento de patente WO 2011/041397 o SEQ ID NO:2 en el documento de patente WO2014/130812. Otros polipéptidos GH61 adecuados incluyen, pero no se limitan a, *Trichoderma reesei* (véase el documento de patente
 45 WO 2007/089290), *Myceliophthora thermophila* (véanse los documentos de patente WO 2009/085935, WO 2009/085859, WO 2009/085864, WO 2009/085868), *Penicillium pinophilum* (véase documento de patente WO 2011/005867), *Thermoascus sp.* (véase el documento de patente WO 2011/039319) y *Thermoascus crustaceus* (véase el documento de patente WO 2011/041504). El polipéptido GH61 se puede usar en presencia de un catión metálico divalente activante soluble según el documento de patente WO 2008/151043, por ejemplo, sulfato de manganeso. El polipéptido GH61 se puede usar en presencia de un compuesto de dióxido, un compuesto bicíclico, un compuesto heterocíclico, un compuesto que contiene nitrógeno, un compuesto de quinona, un compuesto que contiene azufre, o un líquido obtenido de un material celulósico pretratado tal como hojas y tallos pretratados.
 55

Otras enzimas celulolíticas que se pueden usar en los procesos integrados de la presente invención se describen en los documentos de patente WO 98/13465, WO 98/015619, WO 98/015633, WO 99/06574, WO 99/10481, WO 99/025847, WO 99/031255, WO 2002/101078, WO 2003/027306, WO 2003/052054, WO 2003/052055, WO 2003/052056, WO 2003/052057, WO 2003/052118, WO 2004/016760, WO 2004/043980, WO 2004/048592, WO 2005/001065, WO 2005/028636, WO 2005/093050, WO 2005/093073, WO 2006/074005, WO 2006/117432, WO 2007/071818, WO 2007/071820, WO 2008/008070, WO 2008/008793, US 5.457.046, US 5.648.263 y US 5.686.593, por nombrar algunos.

Además, los ejemplos de xilanasas útiles en los procesos integrados de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, xilanasas de *Aspergillus aculeatus* (véase el documento de patente WO 94/21785), *Aspergillus fumigatus* (véase el documento de patente WO 2006/078256), *Penicillium pinophilum* (véase el documento de patente WO 2011/041405), *Penicillium sp.* (véase el documento de patente WO 2010/126772), *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (véase el documento de patente WO 2009/079210) y *Trichophaea saccata* GH10 (véase el documento de patente WO 2011/057083). Los ejemplos de beta-xilosidasas útiles en los procesos integrados de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, beta-xilosidasas de *Neurospora crassa* y *Trichoderma reesei*. Los ejemplos de acetilxilano esterasas útiles en los procesos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, acetilxilano esterasas de *Aspergillus aculeatus* (véase el documento de patente WO 2010/108918), *Chaetomium globosum*, *Chaetomium gracile*, *Humicola insolens* DSM 1800 (véase el documento de patente WO 2009/073709), *Hypocrea jecorina* (véase el documento de patente WO 2005/001036), *Myceliophthora thermophila* (véase el documento de patente WO 2010/014880), *Neurospora crassa*, *Phaeosphaeria nodorum* y *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (véase el documento de patente WO 2009/042846). Los ejemplos de feruloil esterasas (esterasas de ácido ferúlico) útiles en los procesos integrados de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, feruloil esterasas de *Humicola insolens* DSM 1800 (véase el documento de patente WO 2009/076122), *Neosartorya fischeri*, *Neurospora crassa*, *Penicillium aurantiogriseum* (véase el documento de patente WO 2009/127729) y *Thielavia terrestris* (véanse los documentos de patente WO 2010/053838 y WO 2010/065448). Los ejemplos de arabinofuranosidasas útiles en los procesos integrados de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, arabinofuranosidasas de *Aspergillus niger*, *Humicola insolens* DSM 1800 (véanse los documentos de patente WO 2006/114094 y WO 2009/073383) y *M. giganteus* (véase el documento de patente WO 2006/114094). Los ejemplos de alfa-glucuronidasas útiles en los procesos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, alfa-glucuronidasas de *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Humicola insolens* (véase el documento de patente WO 2010/014706), *Penicillium aurantiogriseum* (véase el documento de patente WO 2009/068565) y *Trichoderma reesei*.

Las enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención pueden comprender uno, dos, tres, cuatro clases o más de celulasa, por ejemplo uno, dos, tres o cuatro o todas las de una monooxigenasa lítica de polisacárido (LPMO), una endoglucanasa (EG), una o dos exo-celobiohidrolasas (CBH) y una beta-glucosidasa (BG). Las enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención pueden comprender dos o más de cualquiera de estas clases de celulasa.

Las enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención pueden comprender un tipo de actividad de celulasa y/o actividad de hemicelulasa y/o actividad de pectinasa proporcionada por enzimas como se describe en el presente documento y un segundo tipo de actividad de celulasa y/o actividad de hemicelulasa y/o actividad de pectinasa proporcionada por una celulasa/hemicelulasa/pectinasa adicional.

Como se usa en este documento, una celulasa es cualquier polipéptido que es capaz de degradar o modificar celulosa. Un polipéptido que es capaz de degradar celulosa es uno que es capaz de catalizar el proceso de degradación de la celulosa en unidades más pequeñas, o parcialmente, por ejemplo en celodextrinas, o completamente en monómeros de glucosa. Una celulasa para su uso en el proceso de la invención puede dar lugar a una población mixta de celodextrinas y monómeros de glucosa. Dicha degradación normalmente tendrá lugar a modo de una reacción de hidrólisis.

Las monooxigenasas líticas de polisacárido (LPMO) se clasificaron recientemente por CAZy en la familia AA9 (Familia de actividad auxiliar 9) o la familia AA10 (Familia de actividad auxiliar 10). Como se ha mencionado anteriormente, las monooxigenasas líticas de polisacárido son capaces de abrir una estructura cristalina de glucano. Las monooxigenasas líticas de polisacárido también pueden afectar los celooligosacáridos. Las proteínas GH61 (familia 61 de la glucósido hidrolasa o algunas veces denominada EGIV) son monooxigenasas (líticas) de polisacárido dependientes de oxígeno (PMO's/LPMO's) según la bibliografía más reciente (véase Isaksen et al., Journal of Biological Chemistry, vol. 289, no. 5, pp. 2632-2642). PMO y LPMO se usan en el presente documento indistintamente. Frecuentemente se menciona en la bibliografía que estas proteínas potencian la acción de celulasas sobre sustratos de lignocelulosa. GH61 se clasificó originalmente como endoglucanasa basándose en la medición de actividad muy débil de endo-1,4-β-d-glucanasa en un miembro de la familia. El término "GH61", como se usa en este documento, se debe entender como una familia de enzimas, que comparten porciones de secuencias conservadas comunes y plegamiento a clasificar en la familia 61 del sistema de clasificación CAZy GH bien establecido (<http://www.cazy.org/GH61.html>). La familia 61 de la glucósido hidrolasa es un miembro de la familia de glucósido hidrolasas EC 3.2.1. GH61 se han reclasificado ahora recientemente por CAZy en la familia AA9 (Familia de actividad auxiliar 9). GH61 se usa en el presente documento como parte de las celulasas.

CBM33 (módulo de unión a hidratos de carbono de la familia 33) es una monooxigenasa lítica de polisacárido (véase Isaksen et al., Journal of Biological Chemistry, vol. 289, no. 5, pp. 2632-2642), CAZy ha reclasificado recientemente CBM33 en AA10 (Familia de actividad auxiliar 10).

5 Como se usa en este documento, una hemicelulasa es cualquier polipéptido que es capaz de degradar o modificar hemicelulosa. Es decir, una hemicelulasa puede ser capaz de degradar o modificar una o más de xilano, glucuronoxilano, arabinoxilano, glucomanano y xiloglucano. Un polipéptido que es capaz de degradar una hemicelulosa es uno que es capaz de catalizar el proceso de degradación de la hemicelulosa en polisacáridos más pequeños, o parcialmente, por ejemplo en oligosacáridos, o completamente en monómeros de azúcar, por ejemplo monómeros de azúcar hexosa o pentosa. Una hemicelulasa usada en el proceso integrado de la invención puede dar lugar a una población mixta de oligosacáridos y monómeros de azúcar. Dicha degradación tendrá lugar normalmente a modo de una reacción de hidrólisis.

10 Como se usa en este documento, una pectinasa es cualquier polipéptido que es capaz de degradar o modificar pectina. Un polipéptido que es capaz de degradar pectina es uno que es capaz de catalizar el proceso de degradación de la pectina en unidades más pequeñas, o parcialmente, por ejemplo en oligosacáridos, o completamente en monómeros de azúcar. Una pectinasa usada en el proceso integrado de la invención puede dar lugar a una población mixta de oligosacáridos y monómeros de azúcar. Dicha degradación tendrá lugar normalmente a modo de una reacción de hidrólisis.

15 Por consiguiente, las enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención pueden comprender cualquier celulasa, por ejemplo, una monooxigenasa lítica de polisacárido (por ejemplo GH61), una celobiohidrolasa, una endo- β -1,4-glucanasa, una beta-glucosidasa o una β -(1,3)(1,4)-glucanasa.

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

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

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

35 Como se usa en este documento, una β -(1,3)(1,4)-glucanasa (EC 3.2.1.73) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de enlaces 1,4- β -D-glucosídicos en β -D-glucanos que contienen enlaces 1,3 y 1,4. Dicho polipéptido puede actuar sobre liquenina y β -D-glucanos de cereal, pero no sobre β -D-glucanos que solo contienen enlaces 1,3 y 1,4. Esta enzima también se puede denominar liqueninasa, 1,3-1,4- β -D-glucano 4-glucanohidrolasa, β -glucanasa, endo- β -1,3-1,4 glucanasa, liquenasa o β -glucanasa de enlaces mixtos. Una alternativa a este tipo de enzima es EC 3.2.1.6, que se describe como endo-1,3(4)-beta-glucanasa. Este tipo de enzima hidroliza enlaces 1,3 o 1,4 en beta-D-glucanosa cuando el resto de glucosa cuyo grupo reductor está implicado en el enlace a ser hidrolizado está él mismo sustituido en C-3. Los nombres alternativos incluyen endo-1,3-beta-glucanasa, laminarinasa, 1,3-(1,3;1,4)-beta-D-glucano 3 (4) glucanohidrolasa. Los sustratos incluyen laminarina, liquenina y beta-D-glucanos de cereal.

40 Las enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención pueden comprender cualquier hemicelulasa, por ejemplo, una endoxilanas, una β -xilosidasa, una α -L-arabionofuranosidasa, una α -D-glucuronidasa, una acetil xilano esterasa, una feruloil esterasa, una cumaroil esterasa, una α -galactosidasa, una β -galactosidasa, una β -mananasa o una β -manosidasa.

45 Como se usa en este documento, una endoxilanas (EC 3.2.1.8) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,4- β -D-xilosídicos en xilanos. Esta enzima también se puede denominar endo-1,4- β -xilanas o 1,4- β -D-xilano xilanhidrolasa. Una alternativa es EC 3.2.1.136, una glucuronoarabinoxilano endoxilanas, una enzima que es capaz de hidrolizar enlaces 1,4-xilosídicos en glucuronoarabinoxilanos.

50 Como se usa en este documento, una β -xilosidasa (EC 3.2.1.37) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de 1,4- β -D-xilanos, para retirar restos de D-xilosa sucesivos de los extremos no reductores. Dichas enzimas también pueden hidrolizar xilobiosa. Esta enzima también se puede denominar xilano 1,4- β -xilosidasa, 1,4- β -D-xilano xilohidrolasa, exo-1,4- β -xilosidasa o xilobiasa.

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

5 Como se usa en este documento, una α -D-glucuronidasa (EC 3.2.1.139) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar una reacción de la siguiente forma: α -D-glucuronósido + H(2)O = un alcohol + D-glucuronato. Esta enzima también se puede denominar α -glucuronidasa o α -glucosiduronasa. Estas enzimas también pueden hidrolizar ácido glucurónico 4-O-metilado, que también puede estar presente como un sustituyente en xilanos. Una alternativa es EC 3.2.1.131: xilano α -1,2-glucuronosidasa, que cataliza la hidrólisis de enlaces α -1,2-(4-O-metil)glucuronosilo.

10 Como se usa en este documento, una acetil xilano esterasa (EC 3.1.1.72) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la desacetilación de xilanos y xilo-oligosacáridos. Dicho polipéptido puede catalizar la hidrólisis de grupos acetilo de xilano polimérico, xilosa acetilada, glucosa acetilada, acetato de α -naftilo o acetato de p-nitrofenilo, pero, normalmente, no de triacilglicerol. Dicho polipéptido no actúa normalmente sobre manano acetilado o pectina.

15 Como se usa en este documento, una feruloil esterasa (EC 3.1.1.73) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar una reacción de la forma: feruloil-sacárido + H₂O = ferulato + sacárido. El sacárido puede ser, por ejemplo, un oligosacárido o un polisacárido. Normalmente puede catalizar la hidrólisis del grupo 4-hidroxi-3-metoxicinnamoilo (feruloilo) de un azúcar esterificado, que es normalmente arabinosa en sustratos 'naturales'. El acetato de p-nitrofenol y ferulato de metilo son normalmente sustratos más pobres. Esta enzima también se puede denominar cinnamoil éster hidrolasa, ácido ferúlico esterasa o hidroxicinnamoil esterasa. También se puede denominar una enzima accesoria de hemicelulasa, puesto que puede ayudar a xilanasas y pectinasas a degradar la hemicelulosa y pectina de la pared celular vegetal.

20 Como se usa en este documento, una cumaroil esterasa (EC 3.1.1.73) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar una reacción de la forma: cumaroil-sacárido + H(2)O = cumarato + sacárido. El sacárido puede ser, por ejemplo, un oligosacárido o un polisacárido. Esta enzima también se puede denominar trans-4-cumaroil esterasa, trans-p-cumaroil esterasa, p-cumaroil esterasa o esterasa de ácido p-cumárico. Esta enzima también entra dentro de EC 3.1.1.73, por lo que también se puede denominar una feruloil esterasa.

25 Como se usa en este documento, una α -galactosidasa (EC 3.2.1.22) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de restos de α -D-galactosa no reductores terminales en α -D-galactósidos, que incluyen oligosacáridos de galactosa, galactomananos, galactanos y arabinogalactanos. Dicho polipéptido también puede ser capaz de hidrolizar α -D-fucósidos. Esta enzima también se puede denominar melibiasa.

30 Como se usa en este documento, una β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de restos de β -D-galactosa no reductores terminales en β -D-galactósidos. Dicho polipéptido también puede ser capaz de hidrolizar α -L-arabinósidos. Esta enzima también se puede denominar exo-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactanasa o lactasa.

35 Como se usa en este documento, una β -mananasa (EC 3.2.1.78) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis al azar de enlaces 1,4- β -D-manosídicos en mananos, galactomananos y glucomananos. Esta enzima también se puede denominar manano endo-1,4- β -manosidasa o endo-1,4-mananasa.

40 Como se usa en este documento, una β -manosidasa (EC 3.2.1.25) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de restos de β -D-manosa no reductores terminales en β -D-manósidos. Esta enzima también se puede denominar mananasa o manasa.

45 Las enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención pueden comprender cualquier pectinasa, por ejemplo una endo-poligalacturonasa, una pectin metil esterasa, una endo-galactanasa, una beta-galactosidasa, una pectin acetil esterasa, una endo-pectin liasa, pectato liasa, alfa ramnosidasa, una exo-galacturonasa, una expoligalacturonato liasa, una ramnogalacturonano hidrolasa, una ramnogalacturonano liasa, una ramnogalacturonano acetil esterasa, una ramnogalacturonano galacturonohidrolasa, una xilogalacturonasa.

50 Como se usa en este documento, una endo-poligalacturonasa (EC 3.2.1.15) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis al azar de enlaces 1,4- α -D-galactosidurónicos en pectato y otros galacturonanos. Esta enzima también se puede denominar poligalacturonasa pectin despolimerasa, pectinasa, endopoligalacturonasa, pectolasa, pectin hidrolasa, pectin poligalacturonasa, poli- α -1,4-galacturónido glucanohidrolasa, endogalacturonasa; endo-D-galacturonasa o poli(1,4- α -D-galacturónido) glucanohidrolasa.

Como se usa en este documento, una pectin metil esterasa (EC 3.1.1.11) es cualquier enzima que es capaz de catalizar la reacción: pectina + n H₂O = n metanol + pectato. La enzima también se puede conocer como pectin esterasa, pectin demetoxilasa, pectin metoxilasa, pectin metilesterasa, pectasa, pectinoesterasa o pectin pectilhidrolasa.

55 Como se usa en este documento, una endo-galactanasa (EC 3.2.1.89) es cualquier enzima capaz de catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,4- β -D-galactosídicos en arabinogalactanos. La enzima también se puede conocer como

arabinogalactano endo-1,4-β-galactosidasa, endo-1,4-β-galactanasa, galactanasa, arabinogalactanasa o arabinogalactano 4-β-D-galactanohidrolasa.

5 Como se usa en este documento, una pectin acetil esterasa se define en el presente documento como cualquier enzima que tenga una actividad de acetil esterasa que cataliza la desacetilación de los grupos acetilo en los grupos hidroxilo de restos GalUA de pectina.

10 Como se usa en este documento, una endo-pectin liasa (EC 4.2.2.10) es cualquier enzima capaz de catalizar la escisión eliminativa de éster metílico de (1→4)-α-D-galacturonano para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi-6-O-metil-α-D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. La enzima también se puede conocer como pectin liasa, pectin trans-eliminasa; endo-pectin liasa, transeliminasa polimetilgalacturónica, pectin metiltranseliminasa, pectoliasa, PL, PNL o PMGL o (1→4)-6-O-metil-α-D-galacturonano liasa.

15 Como se usa en este documento, una pectato liasa (EC 4.2.2.2) es cualquier enzima capaz de catalizar la escisión eliminativa de (1→4)-α-D-galacturonano para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi-α-D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. La enzima también se puede conocer como transeliminasa poligalacturónica, ácido péctico transeliminasa, poligalacturonato liasa, endopectin metiltranseliminasa, pectato transeliminasa, endogalacturonato transeliminasa, ácido péctico, liasa péctica, ácido α-1,4-D-endopoligalacturónico liasa, PGA liasa, PPasa-N, ácido endo-α-1,4-poligalacturónico liasa, ácido poligalacturónico liasa, pectin trans-eliminasa, ácido poligalacturónico *trans*-eliminasa o (1→4)-α-D-galacturonano liasa.

20 Como se usa en este documento, una alfa ramnosidasa (EC 3.2.1.40) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de restos de α-L-ramnosa no reductores terminales en α-L-ramnósidos o alternativamente en ramnogalacturonano. Esta enzima también se puede conocer como α-L-ramnosidasa T, α-L-ramnosidasa N o α-L-ramnósido ramnoidrolasa.

Como se usa en este documento, una exo-galacturonasa (EC 3.2.1.82) es cualquier polipéptido capaz de hidrólisis de ácido péctico del digalacturonato liberador de extremos no reductores. La enzima también se puede conocer como exo-poli-α-galacturonosidasa, exopoligalacturonosidasa o exopoligalacturanosidasa.

25 Como se usa en este documento, una exo-galacturonasa (EC 3.2.1.67) es cualquier polipéptido capaz de catalizar: $(1,4\text{-}\alpha\text{-D-galacturónido})_n + \text{H}_2\text{O} = (1,4\text{-}\alpha\text{-D-galacturónido})_{n-1} + \text{D-galacturonato}$. La enzima también se puede conocer como galacturano 1,4-α-galacturonidasa, exopoligalacturonasa, poli(galacturonato) hidrolasa, exo-D-galacturonasa, exo-D-galacturonanasa, exopoli-D-galacturonasa o poli(1,4-α-D-galacturónido) galacturonohidrolasa.

30 Como se usa en este documento, una exopoligalacturonato liasa (EC 4.2.2.9) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la escisión eliminativa de 4-(4-desoxi-α-D-galact-4-enuronosil)-D-galacturonato del extremo reductor de pectato, es decir, pectina desesterificada. Esta enzima se puede conocer como pectato disacárido-liasa, pectato exo-liasa, ácido exopéctico transeliminasa, exopectato liasa, ácido exopoligalacturónico-trans-eliminasa, PATE, exo-PATE, exo-PGL o (1→4)-α-D-galacturonano disacárido-liasa reductora de extremos.

35 Como se usa en este documento, la ramnogalacturonano hidrolasa es cualquier polipéptido que es capaz de hidrolizar el enlace entre ácido galactosilurónico y ramnopiranosilo en un modo endo en estructuras de ramnogalacturonano estrictamente alternantes que consisten en el disacárido [ácido (1,2)-alfa-L-ramnoil-(1,4)-alfa-galactosilurónico].

Como se usa en este documento, una ramnogalacturonano liasa es cualquier polipéptido que es cualquier polipéptido que es capaz de escindir enlaces α-L-Rhap-(1→4)-α-D-GalpA en un modo endo en ramnogalacturonano por beta-eliminación.

40 Como se usa en este documento, una ramnogalacturonano acetil esterasa es cualquier polipéptido que cataliza la desacetilación del esqueleto de ramnosa alternante y restos de ácido galacturónico en ramnogalacturonano.

Como se usa en este documento, una ramnogalacturonano galacturonohidrolasa es cualquier polipéptido que es capaz de hidrolizar ácido galacturónico del extremo no reductor de estructuras de ramnogalacturonano estrictamente alternantes en un modo exo.

45 Como se usa en este documento, una xilogalacturonasa es cualquier polipéptido que actúa sobre xilogalacturonano escindiendo el esqueleto de ácido galacturónico sustituido con β-xilosa en un modo endo. Esta enzima también se puede conocer como xilogalacturonano hidrolasa.

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

Como se usa en este documento, una endo-arabinanasa (EC 3.2.1.99) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,5-α-arabinofuranosídicos en 1,5-arabinanos. La enzima también se puede

conocer como endo-arabinasa, arabinano endo-1,5- α -L-arabinosidasa, endo-1,5- α -L-arabinanasa, endo- α -1,5-arabanasa; endo-arabanasa o 1,5- α -L-arabinano 1,5- α -L-arabinanohidrolasa.

5 Las enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención comprenderán normalmente al menos dos celulasas y opcionalmente al menos una hemicelulasa y opcionalmente al menos una pectinasa. Las enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención pueden comprender una monooxigenasa lítica de polisacárido (tal como GH61), una celobiohidrolasa, una endoglucanasa y/o una beta-glucosidasa. Dichas enzimas también pueden comprender una o más hemicelulasas y/o una o más pectinasas.

10 Además, una o más (por ejemplo dos, tres, cuatro o todas) de una amilasa, una proteasa, una lipasa, una ligninasa, una hexosiltransferasa, una glucuronidasa, una expansina, una proteína inducida por celulosa o una proteína integrante de celulosa o proteína similar pueden estar presentes en las enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención (éstas se denominan actividades auxiliares anteriormente).

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

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

25 "Ligninasa" incluye enzimas que pueden hidrolizar o degradar la estructura de polímeros de lignina. Las enzimas que pueden degradar lignina incluyen lignina peroxidadas, manganeso peroxidadas, lacasas y feruloil esterasas, y otras enzimas descritas en la materia conocidas por despolimerizar o romper de otro modo los polímeros de lignina. También están incluidas enzimas capaces de hidrolizar enlaces formados entre azúcares hemicelulósicos (en particular arabinosa) y lignina. Las ligninasas incluyen, pero no se limitan a, el siguiente grupo de enzimas: lignina peroxidadas (EC 1.11.1.14), manganeso peroxidadas (EC 1.11.1.13), lacasas (EC 1.10.3.2) y feruloil esterasas (EC 3.1.1.73).

30 "Hexosiltransferasa" (2.4.1-) incluye enzimas que son capaces de catalizar una reacción de transferasa, pero que también pueden catalizar una reacción de hidrólisis, por ejemplo de celulosa y/o productos de degradación de celulosa. Un ejemplo de una hexosiltransferasa que se puede usar en el proceso de la invención es una β -glucanosiltransferasa. Dicha enzima puede ser capaz de catalizar la degradación de (1,3)(1,4)glucano y/o celulosa y/o un producto de degradación de celulosa.

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

Las enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención pueden comprender una expansina o proteína similar a expansina, tal como una swolenina (véase Salheimo et al., Eur. J. Biochem. 269, 4202-4211, 2002) o una proteína similar a swolenina.

40 Las expansinas participan en la relajación de la estructura de la pared celular durante el crecimiento de las células vegetales. Se ha propuesto que las expansinas rompen enlaces de hidrógeno entre celulosa y otros polisacáridos de la pared celular sin tener actividad hidrolítica. De esta forma, se cree que permiten el deslizamiento de las fibras de celulosa y la dilatación de la pared celular. La swolenina, una proteína similar a expansina, contiene un dominio de la familia 1 del módulo de unión a hidratos de carbono del extremo N (CBD) y un dominio similar a expansina del extremo C. A efectos de la presente invención, una proteína similar a expansina o proteína similar a swolenina puede comprender uno o ambos de dichos dominios y/o puede romper la estructura de paredes celulares (tal como romper la estructura de celulosa), opcionalmente sin producir cantidades detectables de azúcares reductores.

50 Las enzimas para su uso en los procesos integrados de la presente invención pueden comprender una proteína inducida por celulosa, por ejemplo el producto de polipéptido del gen *cip1* o *cip2* o genes similares (véase Foreman et al., J. Biol. Chem. 278(34), 31988-31997, 2003), una proteína de integración de celulosa/celulosoma, por ejemplo el producto de polipéptido del gen *cipA* o *cipC*, o una escafoldina o una proteína de tipo escafoldina. Las escafoldinas y las proteínas de integración de celulosa son subunidades de integración multifuncionales que pueden organizar subunidades celulolíticas en un complejo multi-enzimático. Esto se lleva a cabo por la interacción de dos clases complementarias de dominio, es decir, un dominio de cohesión sobre escafoldina y un dominio de dockerina sobre cada unidad enzimática. La subunidad de dockerina también lleva un módulo de unión a celulosa (CBM) que media en la unión del celulosoma a su sustrato. Una escafoldina o proteína de integración de celulosa a efectos de la presente invención puede comprender uno o ambos de dichos dominios.

- Las enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención también pueden comprender una catalasa. El término "catalasa" significa un peróxido de hidrógeno: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa (EC 1.11.1.6 o EC 1.11.1.21) que cataliza la conversión de dos peróxidos de hidrógeno en oxígeno y dos aguas. La actividad de catalasa se puede determinar monitorizando la degradación de peróxido de hidrógeno a 240 nm basándose en la siguiente reacción: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. La reacción se realiza en fosfato 50 mM a pH 7,0 a 25 °C con sustrato 10,3 mM (H_2O_2) y aproximadamente 100 unidades de enzima por mL. La absorbancia se monitoriza espectrofotométricamente en el plazo de 16-24 segundos, que debe corresponder a una reducción de la absorbancia desde 0,45 hasta 0,4. Una unidad de actividad de catalasa se puede expresar como un micromol de H_2O_2 degradado por minuto a pH 7,0 y 25 °C.
- Las enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención se pueden componer de un miembro de cada una de las clases de enzimas mencionadas anteriormente, varios miembros de una clase de enzimas, o cualquier combinación de estas clases de enzimas o proteínas auxiliares (es decir, las proteínas mencionadas en el presente documento que no tienen actividad enzimática por sí mismas pero, sin embargo, ayudan en la degradación lignocelulósica).
- Las enzimas para su uso en los procesos integrados de la invención se pueden componer de enzimas de (1) proveedores comerciales; (2) genes clonados que expresan enzimas; (3) caldo (tal como el resultante del crecimiento de una cepa microbiana en medio, en donde las cepas secretan proteínas y enzimas en el medio; (4) lisados celulares de cepas cultivadas como en (3); y/o (5) material vegetal que expresa enzimas. Se pueden obtener diferentes enzimas de diferentes fuentes.
- Las enzimas se pueden producir o exógenamente en microorganismos, levaduras, hongos, bacterias o plantas, luego se aíslan y añaden, por ejemplo, a material lignocelulósico (pretratado). Alternativamente, la enzima se puede producir en una fermentación que usa material lignocelulósico (pretratado) (tal como hojas y tallos de maíz o paja de trigo) para proporcionar nutrición a un organismo que produce una enzima(s). De este modo, las plantas que producen las enzimas pueden servir ellas mismas de material lignocelulósico y se añaden al material lignocelulósico.
- En los usos y procesos descritos en el presente documento, las enzimas descritas anteriormente se pueden proporcionar concomitantemente (es decir, en una composición individual de enzimas) o por separado o secuencialmente.
- En una realización, las enzimas pueden estar presentes en forma de un caldo de fermentación completo. El caldo de fermentación completo se puede preparar a partir de la fermentación de hongos filamentosos no recombinantes y/o recombinantes. El hongo filamentososo puede ser un hongo filamentososo recombinante que comprende uno o más genes que pueden ser homólogos o heterólogos al hongo filamentososo. El hongo filamentososo puede ser un hongo filamentososo recombinante que comprende uno o más genes que pueden ser homólogos o heterólogos al hongo filamentososo, en donde el uno o más genes codifican enzimas que pueden degradar un sustrato celulósico. Todo el caldo de fermentación puede comprender cualquiera de los polipéptidos o cualquier combinación de los mismos.
- Preferentemente, la composición de enzimas es caldo de fermentación completo en donde se destruyen las células. El caldo de fermentación completo puede contener ácido(s) orgánico(s) (usados para destruir las células), células destruidas y/o residuo celular, y medio de cultivo.
- En general, los hongos filamentosos se cultivan en un medio de cultivo celular adecuado para la producción de enzimas capaces de hidrolizar un sustrato celulósico. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y de nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Se conocen en la técnica medios de cultivo adecuados, intervalos de temperatura y otras condiciones adecuadas para el crecimiento y la producción de celulasa y/o hemicelulasa y/o pectinasa. El caldo de fermentación completo se puede preparar cultivando los hongos filamentosos hasta la fase estacionaria y manteniendo los hongos filamentosos en condiciones limitantes de carbono durante un periodo de tiempo suficiente para expresar la una o más celulasas y/o hemicelulasas y/o pectinasas. Una vez son secretadas las enzimas, tales como las celulasas y/o hemicelulasas y/o pectinasas, por los hongos filamentosos en el medio de fermentación, se puede usar el caldo de fermentación completo. El caldo de fermentación completo puede comprender hongos filamentosos. En algunas realizaciones, el caldo de fermentación completo comprende los contenidos sin fraccionar de los materiales de fermentación obtenidos al final de la fermentación. Normalmente, el caldo de fermentación completo comprende el medio de cultivo agotado y el residuo celular presente después de que los hongos filamentosos crezcan hasta la saturación, incubados en condiciones limitantes de carbono para permitir la síntesis de proteínas (particularmente, expresión de celulasas y/o hemicelulasas y/o pectinasas). El caldo de fermentación completo puede comprender el medio de cultivo celular agotado, enzimas extracelulares y hongos filamentosos. Los hongos filamentosos presentes en el caldo de fermentación completo pueden ser lisados, permeabilizados o destruidos usando métodos conocidos en la técnica para producir un caldo de fermentación completo de células destruidas. El caldo de fermentación completo puede ser un caldo de fermentación completo de células destruidas, en donde el caldo de fermentación completo que contiene las células de hongos filamentosos que están lisadas o destruidas. Las células pueden ser destruidas lisando los hongos filamentosos por tratamiento químico y/o por pH para generar el caldo completo de células destruidas de una fermentación de los hongos filamentosos. Las células pueden ser destruidas lisando los hongos filamentosos por tratamiento químico y/o por pH y ajustando el pH de la mezcla de fermentación de células destruidas hasta un pH

adecuado. El caldo de fermentación completo puede comprender un primer componente de ácido orgánico que comprende al menos un ácido orgánico de 1-5 carbonos y/o una sal del mismo y un segundo componente de ácido orgánico que comprende al menos un ácido orgánico de 6 o más carbonos y/o una sal del mismo. El componente de ácido orgánico puede ser ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, una sal de los mismos, o cualquier combinación de los mismos, y el segundo componente de ácido orgánico es ácido benzoico, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido 4-metilvalérico, ácido fenilacético, una sal de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

El término "caldo de fermentación completo", como se usa en este documento, se refiere a una preparación producida por fermentación celular que no experimenta recuperación y/o purificación o experimenta recuperación y/o purificación mínima. Por ejemplo, los caldos de fermentación completos se producen cuando los cultivos microbianos se cultivan hasta la saturación, incubados en condiciones limitantes de carbono para permitir la síntesis de proteínas (por ejemplo, expresión de enzimas por células hospedadoras) y secreción en medio de cultivo celular. Normalmente, el caldo de fermentación completo no está fraccionado y comprende medio de cultivo celular agotado, enzimas extracelulares y células microbianas, preferentemente no viables.

Si se necesita, el caldo de fermentación completo se puede fraccionar y se pueden usar el uno o más de los contenidos fraccionados. Por ejemplo, se pueden retirar las células destruidas y/o residuo celular de un caldo de fermentación completo para proporcionar una composición que está libre de estos componentes.

El caldo de fermentación completo puede comprender además un conservante y/o agente antimicrobiano. Dichos conservantes y/o agentes se conocen en la técnica.

El caldo de fermentación completo como se describe en el presente documento normalmente es un líquido, pero puede contener componentes insolubles, tales como células destruidas, residuo celular, componentes de medios de cultivo y/o enzima(s) insoluble(s). En algunas realizaciones, los componentes insolubles se pueden retirar para proporcionar un caldo de fermentación completo clarificado.

En una realización, el caldo de fermentación completo puede ser complementado con una o más actividades de enzima que no se expresan endógenamente, o se expresan a nivel relativamente bajo por los hongos filamentosos, para mejorar la degradación del sustrato celulósico, por ejemplo, a azúcares fermentables tales como glucosa o xilosa. La(s) enzima(s) complementaria(s) se pueden añadir como complemento al caldo de fermentación completo y las enzimas pueden ser un componente de un caldo de fermentación completo separado, o se pueden purificar, o recuperar y/o purificar mínimamente.

El caldo de fermentación completo puede comprender un caldo de fermentación completo de una fermentación de un hongo filamentoso recombinante que expresa en exceso una o más enzimas para mejorar la degradación del sustrato celulósico. Alternativamente, el caldo de fermentación completo puede comprender una mezcla de un caldo de fermentación completo de una fermentación de un hongo filamentoso recombinante y un hongo filamentoso recombinante que expresa en exceso una o más enzimas para mejorar la degradación del sustrato celulósico. El caldo de fermentación completo puede comprender un caldo de fermentación completo de una fermentación de un hongo filamentoso que expresa en exceso beta-glucosidasa. Alternativamente, el caldo de fermentación completo para su uso en los presentes métodos y las composiciones reactivas puede comprender una mezcla de un caldo de fermentación completo de una fermentación de un hongo filamentoso no recombinante y un caldo de fermentación completo de una fermentación de un hongo filamentoso recombinante que expresa en exceso una beta-glucosidasa.

Las enzimas están presentes en la etapa de licuefacción y en la etapa de sacarificación de la hidrólisis enzimática. Estas enzimas pueden ser la misma o pueden ser diferentes. Además, como se ha descrito anteriormente, se añaden enzimas adicionales durante la etapa de licuefacción y la etapa de sacarificación de los procesos integrados según la presente invención. Las enzimas añadidas pueden ser enzimas que ya están presentes en la etapa de licuefacción y en la etapa de sacarificación. Alternativamente, pueden ser enzimas diferentes. Además, las enzimas adicionales añadidas durante la etapa de licuefacción se pueden diferenciar o pueden ser las mismas que las enzimas adicionales añadidas durante la etapa de sacarificación de los procesos integrados según la presente invención.

El material lignocelulósico como se usa en este documento incluye cualquier material lignocelulósico. El material lignocelulósico adecuado para su uso en los procesos de la presente invención incluye biomasa, por ejemplo, biomasa virgen y/o biomasa no virgen tal como biomasa agrícola, extractos orgánicos comerciales, escombros de construcción y demolición, residuos sólidos municipales, papel usado y desechos de jardín. Las formas comunes de biomasa incluyen árboles, arbustos y pastos, trigo, paja de trigo, caña de azúcar, paja de caña, bagazo de caña de azúcar, pasto varilla, miscanto, caña energética, maíz, hojas y tallos de maíz, cascarillas de maíz, mazorcas de maíz, tallos de colza, tallos de soja, sorgo dulce, grano de maíz que incluye fibra de los granos, productos y subproductos de la molienda de granos, tales como maíz, trigo y cebada (incluyendo molienda en húmedo y molienda en seco) frecuentemente denominados "salvado o fibra", así como residuos sólidos municipales, papel residual y restos de jardín. La biomasa también puede ser, pero no se limita a, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos forestales, residuos sólidos municipales, papel usado y residuos de fábricas de pulpa y papel. "Biomasa agrícola" incluye ramas, matas, cañas, maíz y cascaras de maíz, cultivos energéticos, bosques, frutos, flores, granos, pastos, cultivos herbáceos, hojas, corteza, agujas, leños, raíces, árboles jóvenes, cultivos madereros de rotación corta, arbustos,

5 pastos varilla, árboles, verduras, cáscaras de fruta, parras, pulpa de remolacha azucarera, harinillas de trigo, vainas de avena, y maderas duras y blandas (que no incluyen maderas con materiales perjudiciales). Además, la biomasa agrícola incluye materiales residuales orgánicos generados a partir de procesos agrícolas que incluyen actividades agrarias y forestales, que incluyen específicamente desechos de madera forestal. La biomasa agrícola puede ser cualquiera de la individualmente anteriormente mencionada o en cualquier combinación o mezcla de los mismos. En una realización preferida, el material lignocelulósico es bagazo de caña de azúcar o paja de caña de azúcar.

10 La celulosa es un compuesto orgánico con la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$, un polisacárido que consiste en una cadena lineal de varios cientos a más de diez mil unidades de D-glucosa unidas en $\beta(1\rightarrow4)$. Una molécula de glucano es un polisacárido de monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos. En el presente documento, glucano y celulosa se usan indistintamente para un polisacárido de monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos. Los métodos para el análisis cuantitativo de las composiciones de glucano o polisacárido son bien conocidos y se describen en la materia y se resumen, por ejemplo, en Carvalho de Souza et al., Carbohydrate Polymers 95 (2013) 657-663. En general, 50 a 70 % del glucano es celulosa cristalina, el resto es celulosa amorfa.

15 El material lignocelulósico se pretrata antes y/o durante la hidrólisis enzimática. Se conocen en la técnica métodos de pretratamiento e incluyen, pero no se limitan a, calor, modificación mecánica, química, modificación biológica, y cualquier combinación de las mismas. El pretratamiento se realiza normalmente para potenciar la accesibilidad del material lignocelulósico a la hidrólisis enzimática y/o hidrolizar la hemicelulosa y/o solubilizar la hemicelulosa y/o celulosa y/o lignina, en el material lignocelulósico. El pretratamiento puede comprender tratar el material lignocelulósico con explosión de vapor, tratamiento con agua caliente o tratamiento con ácido diluido o base diluida. Los ejemplos de métodos de pretratamiento incluyen, pero no se limitan a, tratamiento con vapor de agua (por ejemplo, tratamiento a 100-260 °C, a una presión de 7-45 bares, a pH neutro, durante 1-10 minutos), tratamiento con ácido diluido (por ejemplo, tratamiento con 0,1 - 5 % de H_2SO_4 y/o SO_2 y/o HNO_3 y/o HCl, en presencia o ausencia de vapor de agua, a 120-200 °C, a una presión de 2-15 bares, a pH ácido, durante 2-30 minutos), tratamiento organosolv (por ejemplo, tratamiento con 1 - 1,5 % de H_2SO_4 en presencia de disolvente orgánico y vapor de agua, a 160-200 °C, a una presión de 7-30 bares, a pH ácido, durante 30-60 minutos), tratamiento con cal (por ejemplo tratamiento con 0,1 - 2 % de NaOH/Ca(OH)₂ en presencia de agua/vapor de agua a 60-160 °C, a una presión de 1-10 bares, a pH alcalino, durante 60-4800 minutos), tratamiento con ARP (por ejemplo, tratamiento con 5 - 15 % de NH_3 , a 150-180 °C, a una presión de 9-17 bares, a pH alcalino, durante 10-90 minutos), tratamiento con AFEX (por ejemplo, tratamiento con > 15 % de NH_3 , a 60-140 °C, a una presión de 8-20 bares, a pH alcalino, durante 5-30 minutos).

20 El material lignocelulósico se puede lavar. El material lignocelulósico se puede lavar antes y/o después del pretratamiento. La etapa de lavado se puede realizar antes y/o después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado. Si se realiza después de la separación sólido/líquido, se puede lavar la fracción sólida obtenida después de la separación sólido/líquido. La etapa de lavado se puede usar para retirar los compuestos solubles en agua que pueden actuar de inhibidores para la etapa de fermentación y/o hidrólisis. La etapa de lavado se puede realizar de una manera conocida para el experto. A continuación del lavado, existen otros métodos de desintoxicación. El material lignocelulósico pretratado también puede ser desintoxicado por cualquiera (o cualquier combinación) de estos métodos, que incluyen, pero no se limitan a, separación sólido/líquido, evaporación a vacío, extracción, adsorción, neutralización, tratamiento con hidróxido de calcio ("overliming"), adición de agentes reductores, adición de enzimas desintoxicantes tales como lacasas o peroxidases, adición de microorganismos capaces de la desintoxicación de hidrolizados.

25 Las enzimas usadas en los procesos integrados de la invención pueden hidrolizar extremadamente eficazmente material lignocelulósico, por ejemplo, hojas y tallos de maíz, paja de trigo, paja de caña, y/o bagazo de caña de azúcar, que entonces se puede convertir adicionalmente en un producto, tal como etanol, biogás, butanol, un plástico, un ácido orgánico tal como ácido succínico, un disolvente, un suplemento para piensos para animales, un producto farmacéutico, una vitamina, un aminoácido, una enzima o una materia prima química. Además, se pueden usar productos intermedios de un proceso tras la hidrólisis, por ejemplo ácido láctico como producto intermedio en la producción de biogás, como elemento estructural para otros materiales. La presente invención se ejemplifica con la producción de etanol y ácido succínico.

30 La cantidad de enzima añadida (en el presente documento también se denomina la dosificación de enzima o carga de enzima) es baja. En una realización, la cantidad de enzima es 10 mg de proteína / g de peso de materia seca o inferior, 9 mg de proteína / g de peso de materia seca o inferior, 8 mg de proteína / g de peso de materia seca o inferior, 7 mg de proteína / g de peso de materia seca o inferior, 6 mg de proteína / g de peso de materia seca o inferior, 5 mg de proteína / g de materia seca o inferior, 4 mg de proteína / g de materia seca o inferior, 3 mg de proteína / g de materia seca o inferior, 2 mg de proteína / g de materia seca o inferior, o 1 mg de proteína / g de materia seca o inferior (expresada como proteína en mg de proteína / g de materia seca). En una realización, la cantidad de enzima es 5 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 4 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 3 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 2 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 1 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,5 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,4 mg composición de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,3 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,25 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,20 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,18 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,15 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior o 0,10 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior (expresada como total de enzimas celulosa en mg de enzima / g de

materia seca). Es posible una baja dosificación de enzima, debido a la actividad y estabilidad de las enzimas. Cuando la hidrólisis enzimática comprende una etapa de licuefacción separada y una etapa de sacarificación, la enzima se puede añadir antes y/o durante solo una de las etapas o antes y/o durante ambas etapas.

5 El experto puede elegir el pH durante la hidrólisis enzimática. En una realización, el pH durante la hidrólisis puede ser 3,0 a 6,4. Las enzimas estables de la invención pueden tener un amplio intervalo de pH de hasta 2 unidades de pH, hasta 3 unidades de pH, hasta 5 unidades de pH. El pH óptimo puede estar dentro de los límites de pH 2,0 a 8,0, 2,5 a 7,5, 3,0 a 7,0, 3,5 a 6,5, 4,0 a 5,0, 4,0 a 4,5, o es aproximadamente 4,2. Se puede diferenciar el pH usado en la etapa de licuefacción de la hidrólisis enzimática y la etapa de sacarificación de la hidrólisis enzimática, o pueden ser el mismo. En caso de usar diferentes enzimas durante la etapa de licuefacción y la etapa de sacarificación, se puede diferenciar el pH óptimo de dichas enzimas, o puede ser el mismo.

10 La etapa de hidrólisis se puede realizar hasta que se libere 70 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 92 % o más, 95 % o más del azúcar disponible en el material lignocelulósico.

15 Significativamente, un proceso de la invención se puede llevar a cabo usando altos niveles de materia seca (del material lignocelulósico) en la reacción de hidrólisis. En una realización, el contenido de materia seca al final de la hidrólisis enzimática es 5 % en peso o superior, 6 % en peso o superior, 7 % en peso o superior, 8 % en peso o superior, 9 % en peso o superior, 10 % en peso o superior, 11 % en peso o superior, 12 % en peso o superior, 13 % en peso o superior, 14 % en peso o superior, 15 % en peso o superior, 16 % en peso o superior, 17 % en peso o superior, 18 % en peso o superior, 19 % en peso o superior, 20 % en peso o superior, 21 % en peso o superior, 22 % en peso o superior, 23 % en peso o superior, 24 % en peso o superior, 25 % en peso o superior, 26 % en peso o superior, 27 % en peso o superior, 28 % en peso o superior, 29 % en peso o superior, 30 % en peso o superior, 31 % en peso o superior, 32 % en peso o superior, 33 % en peso o superior, 34 % en peso o superior, 35 % en peso o superior, 36 % en peso o superior, 37 % en peso o superior, 38 % en peso o superior o 39 % en peso o superior. En una realización, el contenido de materia seca al final de la hidrólisis enzimática es entre 5 % en peso - 40 % en peso, 6 % en peso - 40 % en peso, 7 % en peso - 40 % en peso, 8 % en peso - 40 % en peso, 9 % en peso - 40 % en peso, 10 % en peso - 40 % en peso, 11 % en peso - 40 % en peso, 12 % en peso - 40 % en peso, 13 % en peso - 40 % en peso, 14 % en peso - 40 % en peso, 15 % en peso - 40 % en peso, 16 % en peso - 40 % en peso, 17 % en peso - 40 % en peso, 18 % en peso - 40 % en peso, 19 % en peso - 40 % en peso, 20 % en peso - 40 % en peso, 21 % en peso - 40 % en peso, 22 % en peso - 40 % en peso, 23 % en peso - 40 % en peso, 24 % en peso - 40 % en peso, 25 % en peso - 40 % en peso, 26 % en peso - 40 % en peso, 27 % en peso - 40 % en peso, 28 % en peso - 40 % en peso, 29 % en peso - 40 % en peso, 30 % en peso - 40 % en peso, 31 % en peso - 40 % en peso, 32 % en peso - 40 % en peso, 33 % en peso - 40 % en peso, 34 % en peso - 40 % en peso, 35 % en peso - 40 % en peso, 36 % en peso - 40 % en peso, 37 % en peso - 40 % en peso, 38 % en peso - 40 % en peso, 39 % en peso - 40 % en peso.

20 En una realización, el contenido de materia seca al final de la etapa de licuefacción de la hidrólisis enzimática es 5 % en peso o superior, 6 % en peso o superior, 7 % en peso o superior, 8 % en peso o superior, 9 % en peso o superior, 10 % en peso o superior, 11 % en peso o superior, 12 % en peso o superior, 13 % en peso o superior, 14 % en peso o superior, 15 % en peso o superior, 16 % en peso o superior, 17 % en peso o superior, 18 % en peso o superior, 19 % en peso o superior, 20 % en peso o superior, 21 % en peso o superior, 22 % en peso o superior, 23 % en peso o superior, 24 % en peso o superior, 25 % en peso o superior, 26 % en peso o superior, 27 % en peso o superior, 28 % en peso o superior, 29 % en peso o superior, 30 % en peso o superior, 31 % en peso o superior, 32 % en peso o superior, 33 % en peso o superior, 34 % en peso o superior, 35 % en peso o superior, 36 % en peso o superior, 37 % en peso o superior, 38 % en peso o superior o 39 % en peso o superior. En una realización, el contenido de materia seca al final de la etapa de licuefacción de la hidrólisis enzimática es entre 5 % en peso - 40 % en peso, 6 % en peso - 40 % en peso, 7 % en peso - 40 % en peso, 8 % en peso - 40 % en peso, 9 % en peso - 40 % en peso, 10 % en peso - 40 % en peso, 11 % en peso - 40 % en peso, 12 % en peso - 40 % en peso, 13 % en peso - 40 % en peso, 14 % en peso - 40 % en peso, 15 % en peso - 40 % en peso, 16 % en peso - 40 % en peso, 17 % en peso - 40 % en peso, 18 % en peso - 40 % en peso, 19 % en peso - 40 % en peso, 20 % en peso - 40 % en peso, 21 % en peso - 40 % en peso, 22 % en peso - 40 % en peso, 23 % en peso - 40 % en peso, 24 % en peso - 40 % en peso, 25 % en peso - 40 % en peso, 26 % en peso - 40 % en peso, 27 % en peso - 40 % en peso, 28 % en peso - 40 % en peso, 29 % en peso - 40 % en peso, 30 % en peso - 40 % en peso, 31 % en peso - 40 % en peso, 32 % en peso - 40 % en peso, 33 % en peso - 40 % en peso, 34 % en peso - 40 % en peso, 35 % en peso - 40 % en peso, 36 % en peso - 40 % en peso, 37 % en peso - 40 % en peso, 38 % en peso - 40 % en peso, 39 % en peso - 40 % en peso.

25 En una realización, el contenido de materia seca al final de la etapa de sacarificación de la hidrólisis enzimática es 5 % en peso o superior, 6 % en peso o superior, 7 % en peso o superior, 8 % en peso o superior, 9 % en peso o superior, 10 % en peso o superior, 11 % en peso o superior, 12 % en peso o superior, 13 % en peso o superior, 14 % en peso o superior, 15 % en peso o superior, 16 % en peso o superior, 17 % en peso o superior, 18 % en peso o superior, 19 % en peso o superior, 20 % en peso o superior, 21 % en peso o superior, 22 % en peso o superior, 23 % en peso o superior, 24 % en peso o superior, 25 % en peso o superior, 26 % en peso o superior, 27 % en peso o superior, 28 % en peso o superior, 29 % en peso o superior, 30 % en peso o superior, 31 % en peso o superior, 32 % en peso o superior, 33 % en peso o superior, 34 % en peso o superior, 35 % en peso o superior, 36 % en peso o superior, 37 % en peso o superior, 38 % en peso o superior o 39 % en peso o superior. En una realización, el contenido de materia seca al final de la etapa de sacarificación de la hidrólisis enzimática es entre 5 % en peso - 40 % en peso, 6 % en peso - 40 % en peso, 7 % en peso - 40 % en peso, 8 % en peso - 40 % en peso, 9 % en peso - 40 % en peso,

10 % en peso - 40 % en peso, 11 % en peso - 40 % en peso, 12 % en peso - 40 % en peso, 13 % en peso - 40 % en peso, 14 % en peso - 40 % en peso, 15 % en peso - 40 % en peso, 16 % en peso - 40 % en peso, 17 % en peso - 40 % en peso, 18 % en peso - 40 % en peso, 19 % en peso - 40 % en peso, 20 % en peso - 40 % en peso, 21 % en peso - 40 % en peso, 22 % en peso - 40 % en peso, 23 % en peso - 40 % en peso, 24 % en peso - 40 % en peso, 25 % en peso - 40 % en peso, 26 % en peso - 40 % en peso, 27 % en peso - 40 % en peso, 28 % en peso - 40 % en peso, 29 % en peso - 40 % en peso, 30 % en peso - 40 % en peso, 31 % en peso - 40 % en peso, 32 % en peso - 40 % en peso, 33 % en peso - 40 % en peso, 34 % en peso - 40 % en peso, 35 % en peso - 40 % en peso, 36 % en peso - 40 % en peso, 37 % en peso - 40 % en peso, 38 % en peso - 40 % en peso, 39 % en peso - 40 % en peso.

Las etapas de fermentación en los procesos integrados según la presente invención se pueden realizar en uno o más recipientes. La fermentación de la fracción líquida por un microorganismo productor de alcohol para producir alcohol se puede realizar en uno o más recipientes. La fermentación de la fracción líquida por un microorganismo productor de alcohol para producir alcohol se puede hacer en el mismo (los mismos) recipiente(s) en donde se realiza la hidrólisis enzimática.

El microorganismo productor de alcohol es capaz de fermentar al menos un azúcar C5 y al menos un azúcar C6.

El microorganismo productor de alcohol también puede ser capaz de producir ácido orgánico, tal como ácido succínico. En una realización, el microorganismo productor de alcohol es una levadura.

En un aspecto adicional, el proceso integrado incluye así los procesos de fermentación en los que se usa un microorganismo para la fermentación de una fuente de carbono que comprende azúcar(es), por ejemplo glucosa, L-arabinosa y/o xilosa. La fuente de carbono puede incluir cualquier oligómero o polímero de hidrato de carbono que comprende unidades de L-arabinosa, xilosa o glucosa, tales como, por ejemplo, lignocelulosa, xilanos, celulosa, almidón, arabinano y similares. Para la liberación de unidades de xilosa o glucosa de dichos hidratos de carbono, se pueden añadir carbohidrasas apropiadas (tales como xilanasas, glucanasas, amilasas y similares) al medio de fermentación, o se pueden producir por la célula hospedadora modificada. En el último caso, la célula hospedadora modificada puede ser genéticamente manipulada para producir y eliminar dichas carbohidrasas. Una ventaja adicional de uso de fuentes de oligómeros o polímeros de glucosa es que permite mantener una concentración (más) baja de glucosa libre durante la fermentación, por ejemplo usando cantidades limitantes de la velocidad de las carbohidrasas. Esto, a su vez, prevendrá la represión de los sistemas requeridos para el metabolismo de azúcares distintos de la glucosa, tales como xilosa. En un proceso preferido, la célula hospedadora modificada fermenta tanto la L-arabinosa (opcionalmente xilosa) como glucosa, preferentemente simultáneamente, en cuyo caso se usa preferentemente una célula hospedadora modificada que no es sensible a la represión de glucosa para prevenir el crecimiento diaúxico. Además de una fuente de L-arabinosa, opcionalmente xilosa (y glucosa), como fuente de carbono, el medio de fermentación comprenderá además el componente apropiado requerido para el crecimiento de la célula hospedadora modificada. Se conocen bien en la técnica composiciones de medios de fermentación para el crecimiento de microorganismos tales como levaduras u hongos filamentosos.

El tiempo de fermentación puede ser más corto que en la fermentación convencional a las mismas condiciones, en donde parte de la hidrólisis enzimática todavía tiene que tener lugar durante la fermentación. El tiempo de fermentación puede ser 100 horas o menos, 90 horas o menos, 80 horas o menos, 70 horas o menos, o 60 horas o menos, para una composición de azúcar de 50 g/L de glucosa y otros azúcares correspondientes del material lignocelulósico (por ejemplo, 50 g/L de xilosa, 35 g/L de L-arabinosa y 10 g/L de galactosa). Para composiciones de azúcar más diluidas, el tiempo de fermentación se puede reducir correspondientemente. El tiempo de fermentación de la etapa de producción de etanol puede ser entre 10 y 50 horas para el etanol que comprende azúcares C6 y entre 20 y 100 horas para el etanol que comprende azúcares C5.

El proceso de fermentación puede ser un proceso de fermentación aerobio o uno anaerobio. Un proceso de fermentación anaerobio se define en el presente documento como un proceso de fermentación realizado en ausencia de oxígeno o en el que sustancialmente no se consume oxígeno, preferentemente se consume menos de 5, 2,5 o 1 mmol/L/h, más preferentemente 0 mmol/L/h (es decir, el consumo de oxígeno no es detectable), y en donde las moléculas orgánicas sirven tanto de donante de electrones como de aceptores de electrones. En ausencia de oxígeno, la NADH producida en la glicólisis y la formación de biomasa no se puede oxidar por fosforilación oxidativa. Para resolver este problema, muchos microorganismos usan piruvato o uno de sus derivados como electrón y aceptor de hidrógeno, regenerando así NAD⁺. Así, en un proceso de fermentación anaerobia preferido se usa piruvato como electrón (y aceptor de hidrógeno) y se reducen a productos de fermentación tales como etanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico, un aminoácido, 1,3-propano-diol, etileno, glicerol, butanol, un antibiótico β-lactámico y una cefalosporina. En una realización preferida, el proceso de fermentación es anaerobio. Un proceso anaerobio es ventajoso, puesto que es más barato que los procesos aerobios: se necesita menos equipo especial. Además, se espera que los procesos anaerobios den un mayor rendimiento de producto que los procesos aerobios. En condiciones aerobias, normalmente el rendimiento de biomasa es más alto que en condiciones anaerobias. Como consecuencia, normalmente en condiciones aerobias, el rendimiento de producto esperado es inferior que en condiciones anaerobias.

El proceso de fermentación se puede realizar en condiciones de oxígeno limitado. Más preferentemente, el proceso de fermentación es aerobio y en condiciones de oxígeno limitado. Un proceso de fermentación de oxígeno limitado es

un proceso en el que el consumo de oxígeno está limitado por la transferencia de oxígeno del gas al líquido. El grado de limitación del oxígeno se determina por la cantidad y la composición del flujo de gas de entrada, así como las propiedades reales de la mezcla / transferencia de masa del equipo de fermentación usado. Preferentemente, en un proceso en condiciones de oxígeno limitado, la velocidad de consumo de oxígeno es al menos 5,5, más preferentemente al menos 6, e incluso más preferentemente al menos 7 mmol/L/h.

El proceso de fermentación de alcohol puede ser aerobio.

El proceso de fermentación se realiza preferentemente a una temperatura que es óptima para la célula modificada. Así, para la mayoría de las levaduras o células fúngicas, el proceso de fermentación se realiza a una temperatura que es inferior a 42 °C, preferentemente 38 °C o inferior. Para levadura o células hospedadoras fúngicas filamentosas, el proceso de fermentación se realiza preferentemente a una temperatura que es inferior a 35, 33, 30 o 28 °C y a una temperatura que es superior a 20, 22, o 25 °C. La etapa de fermentación de alcohol se puede realizar entre 25 °C y 35 °C.

Las fermentaciones se realizan con un microorganismo fermentante que es capaz de fermentar al menos un azúcar C5 y al menos un azúcar C6.

Las levaduras comercialmente disponibles adecuadas para la producción de etanol incluyen, pero no se limitan a, BIOFERM™ AFT y XR (NABC-North American Bioproducts Corporation, GA, EE. UU.), levadura ETHANOL RED™ (Fermentis/Lesaffre, EE. UU.), FALI™ (Fleischmann's Yeast, EE. UU.), FERMOL™ (DSM Specialties), GERT STRAND™ (Gert Strand AB, Suecia) y levadura fresca SUPERSTART™ y THERMOSACC™ (Ethanol Technology, WI, EE. UU.). Las fermentaciones se pueden realizar en uno o más recipientes. Las fermentaciones se pueden realizar en el uno o más recipientes de fermentación. La propagación del microorganismo productor de alcohol por fermentación de la fracción líquida se realiza en uno o más recipientes de propagación. Después de la propagación, el microorganismo productor de alcohol se puede añadir a uno o más recipientes de fermentación. Alternativamente, la propagación del microorganismo productor de alcohol se combina con la fermentación de la fracción líquida por el microorganismo productor de alcohol para producir alcohol y/o ácido orgánico, respectivamente.

El microorganismo productor de alcohol es un microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar C5 y al menos un azúcar C6. En una realización, la invención se refiere a un proceso integrado que comprende la producción como se define en las reivindicaciones, en donde el proceso comprende la etapa de fermentar un medio que contiene azúcar(es) con un microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar C5 y al menos un azúcar C6.

Los microorganismos productores de alcohol pueden ser un organismo procarionta o eucariota. El microorganismo usado en el proceso puede ser un microorganismo genéticamente manipulado. Los ejemplos de organismos productores de alcohol adecuados son levaduras, por ejemplo, *Saccharomyces*, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus* o *Saccharomyces uvarum*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, por ejemplo *Issatchenkia orientalis*, *Pichia*, por ejemplo *Pichia stipites* o *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces*, por ejemplo *Kluyveromyces fragilis*, *Candida*, por ejemplo *Candida pseudotropicalis* o *Candida acidothermophilum*, *Pachysolen*, por ejemplo *Pachysolen tannophilus*, o bacterias, por ejemplo *Lactobacillus*, por ejemplo *Lactobacillus lactis*, *Geobacillus*, *Zymomonas*, por ejemplo *Zymomonas mobilis*, *Clostridium*, por ejemplo *Clostridium phytofermentans*, *Escherichia*, por ejemplo *E. coli*, *Klebsiella*, por ejemplo *Klebsiella oxytoca*. En una realización, el microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar C5 y al menos un azúcar C6 es una levadura.

En una realización, la levadura pertenece al género *Saccharomyces*, preferentemente de las especies *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, usada en los procesos según la presente invención es capaz de convertir azúcares de hexosa (C6) y azúcares de pentosa (C5). La levadura, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, usada en los procesos según la presente invención puede fermentar anaeróticamente al menos un azúcar C6 y al menos un azúcar C5. Por ejemplo, la levadura es capaz de usar L-arabinosa y xilosa, además de glucosa anaeróticamente. En una realización, la levadura es capaz de convertir L-arabinosa en L-ribulosa y/o xilulosa 5-fosfato y/o en un producto de fermentación deseado, por ejemplo en etanol. Los organismos, por ejemplo las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, capaces de producir etanol a partir de L-arabinosa se pueden producir modificando una levadura hospedadora introduciendo los genes *araA* (L-arabinosa isomerasa), *araB* (L-ribuloglioxalato y *araD* (L-ribulosa-5-P4-epimerasa) de una fuente adecuada. Dichos genes pueden ser introducidos en una célula hospedadora con el fin de que sea capaz de usar arabinosa. Dicho enfoque se da se describe en el documento de patente WO2003/095627. Se pueden usar los genes *araA*, *araB* y *araD* de *Lactobacillus plantarum* y se desvelan en el documento de patente WO2008/041840. Se puede usar el gen *araA* de *Bacillus subtilis* y los genes *araB* y *araD* de *Escherichia coli* y se desvelan en el documento de patente EP1499708. En otra realización, los genes *araA*, *araB* y *araD* pueden derivar de al menos uno del género *Clavibacter*, *Arthrobacter* y/o *Gramella*, en particular uno de *Clavibacter michiganensis*, *Arthrobacter aurescens* y/o *Gramella forsetii*, como se desvela en el documento de patente WO 2009011591. La levadura también puede comprender una o más copias del gen xilosa isomerasa y/o una o más copias de xilosa reductasa y/o xilitol deshidrogenasa.

La levadura puede comprender una o más modificaciones genéticas para permitir que la levadura fermente xilosa. Los ejemplos de modificaciones genéticas son la introducción de uno o más genes *xyIA*, genes *XYL1* y genes *XYL2* y/o genes *XKS1*; delección del gen aldosa reductasa (*GRE3*); expresión en exceso de genes de PPP *TAL1*, *TKL1*, *RPE1*

y *RK11* para permitir el incremento de flujo a través de la vía de la pentosa-fosfato en la célula. Los ejemplos de levaduras genéticamente manipuladas se describen en los documentos de patente EP1468093 y/o WO2006/009434.

Un ejemplo de una levadura comercial adecuada es RN1016, que es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* fermentadora de xilosa y glucosa de DSM, Países Bajos.

- 5 El proceso de fermentación para la producción de etanol puede ser anaerobio. Anaerobio ya se ha definido anteriormente en el presente documento. El proceso de fermentación para la producción de etanol también puede ser aerobio. El proceso de fermentación para la producción de etanol también se puede realizar en condiciones limitadas de oxígeno, más preferentemente aerobias, y en condiciones limitadas de oxígeno. Las condiciones limitadas de oxígeno ya se han definido anteriormente en el presente documento.
- 10 La productividad volumétrica de etanol es preferentemente al menos 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 5,0 o 10,0 g de etanol por litro por hora. El rendimiento de etanol sobre L-arabinosa y opcionalmente xilosa y/o glucosa en el proceso es preferentemente al menos 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 98 %. El rendimiento de etanol se define en el presente documento como un porcentaje del rendimiento máximo teórico que, para glucosa y L-arabinosa y opcionalmente xilosa, es 0,51 g de etanol por g de glucosa o xilosa.
- 15 En un aspecto, el proceso de fermentación que conduce a la producción de etanol tiene varias ventajas en comparación con los procesos de fermentación de etanol conocidos: son posibles procesos anaerobios; son posibles condiciones limitadas de oxígeno; se pueden obtener rendimientos de etanol y velocidades de producción de etanol más altos; la cepa usada puede ser capaz de usar L-arabinosa y opcionalmente xilosa.

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

25 Los procesos de fermentación se pueden llevar a cabo sin ningún requisito para ajustar el pH durante los procesos. Es decir, los procesos son aquellos que se pueden llevar a cabo sin la adición de ningún ácido o base. Sin embargo, esto excluye una etapa de pretratamiento, donde se puede añadir ácido. La cuestión es que las enzimas usadas en los procesos de la invención son capaces de actuar a pH bajo y, por tanto, no existe una necesidad de ajustar el pH de ácido de una materia prima pretratada con ácido con el fin de que pueda tener lugar la hidrólisis. Por consiguiente, los procesos de la invención pueden ser procesos de residuos cero usando solo productos orgánicos sin requisito de salida química inorgánica.

30 Se puede reducir el tiempo de reacción global (o el tiempo de reacción de la etapa de hidrólisis y la etapa de fermentación juntas). El tiempo de reacción total puede ser 300 horas o menos, 200 horas o menos, 150 horas o menos, 140 horas o menos, 130 o menos, 120 horas o menos, 110 horas o menos, 100 horas de menos, 90 horas o menos, 80 horas o menos, 75 horas o menos, o aproximadamente 72 horas a 90 % de rendimiento de glucosa. Correspondientemente, se pueden alcanzar tiempos de reacción global inferiores a rendimiento de glucosa más bajo.

35 Otros productos de la fermentación, además de los alcoholes (tales como arabinitol, butanol, etanol, glicerol, metanol, 1,3-propanodiol, sorbitol y xilitol) que se pueden producir por los procesos integrados de la invención pueden ser cualquier sustancia derivada de la fermentación. Incluyen, pero no se limitan a, ácido orgánico (tal como ácido acético, ácido acetónico, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido acrílico, ácido cítrico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucárico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutárico, ácido 3-hidroxi propiónico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido oxaloacético, ácido propiónico, ácido succínico y ácido xilónico); cetonas (tales como acetona); aminoácidos (tales como ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina, serina, triptófano y treonina); alcanos (tales como pentano, hexano, heptano, octano, nonano, decano, undecano y dodecano), cicloalcanos (tales como ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano y ciclooctano), alquenos (tales como penteno, hexeno, hepteno y octeno); y gases (tales como metano, hidrógeno (H₂), dióxido de carbono (CO₂) y monóxido de carbono (CO)). El producto de fermentación también puede ser una proteína, una vitamina, un producto farmacéutico, un suplemento para piensos para animales, un producto químico de especialidad, una materia prima química, un plástico, un disolvente, etileno, una enzima, tal como una proteasa, una celulasa, una amilasa, una glucanasa, una lactasa, una lipasa, una liasa, una oxidorreductasa, una transferasa o una xilanasa. En una realización preferida, el alcohol es etanol.

40 En una realización, se recuperan el alcohol, las enzimas, el hongo productor de enzima, el microorganismo productor de alcohol. Los procesos integrados según la invención comprenden la recuperación de todos los tipos de productos producidos durante los procesos integrados, incluyendo los productos de fermentación tales como el etanol. Un producto de fermentación se puede separar del caldo de fermentación en un modo conocido por el experto. Los ejemplos de técnicas para la recuperación incluyen, pero no se limitan a, cromatografía, procedimientos electroforéticos, solubilidad diferencial, destilación, o extracción. Para cada producto de fermentación, el experto será así capaz de seleccionar una técnica de separación apropiada. Por ejemplo, se puede separar etanol de un caldo de

fermentación de levadura mediante destilación, por ejemplo destilación con vapor de agua / destilación a vacío en la forma convencional.

Los procesos integrados de la invención también pueden producir energía, calor, electricidad y/o vapor de agua.

5 La fracción sólida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado, y/o los sólidos obtenidos después de la destilación/recuperación del etanol, se pueden usar en la producción de electricidad. La electricidad se puede hacer por incineración de uno cualquiera de los materiales anteriormente mencionados. La electricidad se puede usar en una cualquiera de las etapas de los procesos integrados según la presente invención.

10 Los efectos beneficiosos de la presente invención se encuentran para varios materiales lignocelulósicos y, por tanto, se cree que están presentes para la hidrólisis de todos los tipos de materiales lignocelulósicos. Estos efectos beneficiosos de la presente invención se encuentran para varias enzimas y, por tanto, se cree que están presentes para todos los tipos de composiciones de enzimas de hidrólisis.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

15 **Proceso integrado para la producción de alcoholes y la producción de ácidos orgánicos a partir de material lignocelulósico**

Se separó por centrifugación en una fracción sólida y una fracción líquida un lote individual de material lignocelulósico pretratado. La fracción sólida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico pretratado se lavó para obtener una pulpa rica en celulosa.

20 Parte de la pulpa se sometió a hidrólisis enzimática. En este caso, se hidrolizaron 64 kg de pulpa de materia seca en un recipiente con agitación de 400 litros añadiéndolo a 254 litros de una composición acuosa que contenía enzimas celulolíticas de *Rasamsonia* (que estaba a una temperatura de 62 °C). La primera dosificación de pulpa produjo 10 % p/p de materia seca de pH 4,2, que se licuó por las enzimas en el plazo de 3 horas. A partir de ese momento, se añadieron porciones de 5 kg de pulpa de materia seca cada hora hasta que se obtuvieron 350 kg de puré, mientras que el pH se ajustó a 4,2 con una disolución al 10 % de amoniaco. La hidrólisis continuó mientras se agitaba a 62 °C durante otros 4 días y produjo un hidrolizado rico en glucosa.

25 Se centrifugó el hidrolizado para obtener una fracción sólida y una fracción líquida. La fracción sólida se lavó con agua. El agua de lavado se añadió a la fracción líquida y las fracciones líquidas combinadas se concentraron por evaporación hasta que se obtuvo una fracción líquida concentrada final que contuvo glucosa a una concentración de aproximadamente 450 g/kg.

30 Parte de la fracción líquida concentrada se usó para la propagación de levadura del género *Saccharomyces cerevisiae* que produjo en exceso ácido succínico genéticamente modificado. El medio para la propagación de la levadura se basó en medio de glucosa Verduyn y contuvo sulfato de amonio, fosfato de potasio, fosfato de magnesio, oligoelementos y vitaminas y 8 g/kg de la fracción líquida concentrada como fuente de carbono (para medio Verduyn véase Yeast 8, (1992), página 201-517). La propagación se hizo durante 68 horas en un recipiente con agitación a 30 °C con agitación continua.

35 El cultivo de semilla así obtenido se añadió para inocular un fermentador que contenía medio Verduyn con, entre otros, componentes tales como urea, biotina y carbonato cálcico en concentraciones definidas. Como fuente de carbono, se añadió la fracción líquida concentrada alimentándola durante la duración de la fermentación a una tasa de 16 mL/kg·h. Después de 48 horas, se detuvo la fermentación y se centrifugó el caldo. El sobrenadante se sometió repetidamente a evaporación, cristalización, pulido y secado, dando como resultado cristales en bruto de ácido succínico.

40 Otra parte de la fracción líquida concentrada se usó para la propagación de un microorganismo productor de enzima y la producción de enzimas por el microorganismo productor de enzima. Se inoculó un fermentador que contenía medio mineral con 20 g/kg de concentrado y 40 g/kg de pulpa de materia seca sólida con el hongo *Rasamsonia emersonii*. Durante la primera fase del proceso de fermentación, también denominada la fase de crecimiento o fase de propagación, la biomasa fúngica aumenta sin producción de proteínas. En la segunda fase del proceso de fermentación, también denominada la fase de producción de enzimas, se producen enzimas. La fermentación se realizó en condiciones aerobias asépticas a 37 °C, pH 6, durante 120 horas, mientras que la fracción líquida concentrada se añadió como alimentación. La concentración final de proteína obtenida al final de la fermentación fue 65 g/kg de sobrenadante. El sobrenadante obtenido mostró actividad celulolítica.

45 Se mezcló una parte de la fracción líquida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico pretratado con una parte de la fracción líquida concentrada para conseguir una mezcla fermentable. Esta mezcla se fermentó con la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* fermentadora de pentosas RN1016 y dio 5,1 % p/p de etanol después de la fermentación durante 48 horas a pH 5,5.

En un experimento separado, se fermentó hidrolizado rico en glucosa como tal con la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* RN1016 en una fermentación de 34 horas a pH 4,2. El rendimiento de etanol sobre los azúcares fue 90 %.

Ejemplo 2

Proceso integrado para la producción de alcohol a partir de material lignocelulósico

5 Se separó por centrifugación en una fracción sólida y una fracción líquida un lote individual de material lignocelulósico pretratado. La fracción líquida se almacenó a 4 °C hasta que se usó en la producción de etanol (véase a continuación). La fracción sólida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico pretratado se lavó para obtener una pulpa rica en celulosa.

10 Parte de la pulpa se sometió a hidrólisis enzimática. En este caso, se hidrolizaron 64 kg de pulpa de materia seca en un recipiente con agitación de 400 litros añadiéndolo a 254 litros de una composición acuosa que contenía enzimas celulolíticas de *Rasamsonia* (que estaba a una temperatura de 62 °C). La primera dosificación de pulpa produjo 10 % p/p de materia seca de pH 4,2, que se licuó por las enzimas en el plazo de 3 horas. A partir de ese momento, se añadieron porciones de 5 kg de pulpa de materia seca cada hora hasta que se obtuvieron 350 kg de puré, mientras que el pH se ajustó a 4,2 con una disolución al 10 % de amoníaco. La hidrólisis continuó mientras se agitaba a 62 °C durante otros 4 días y produjo un hidrolizado rico en glucosa.

Se centrifugó el hidrolizado rico en glucosa para obtener una fracción sólida y una fracción líquida. La fracción sólida se lavó con agua. El agua de lavado se añadió a la fracción líquida y las fracciones líquidas combinadas se concentraron por evaporación hasta que se obtuvo una fracción líquida concentrada final que contuvo glucosa a una concentración de aproximadamente 450 g/kg.

20 Se dividió la fracción líquida obtenida después del pretratamiento del material lignocelulósico en cuatro porciones iguales. La primera porción se mantuvo tal cual (porción no diluida) y se fermentó tal cual. La segunda porción se diluyó hasta 70 % p/p de su concentración original con agua y se fermentó. La tercera porción se diluyó hasta 70 % p/p con 13 % p/p de fracción líquida concentrada y 17 % p/p de agua y se fermentó. La cuarta porción se diluyó hasta 70 % p/p con 20 % p/p de fracción líquida concentrada y 10 % p/p de agua y se fermentó.

25 Las porciones se fermentaron con la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* fermentadora de pentosas RN1016 durante 48 horas a pH 5,5 para producir etanol y se midió la concentración de etanol usando HPLC. Las concentraciones de etanol medidas se expresan como % p/p de material fermentado al final de la fermentación. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

30 La Tabla 1 muestra que diluir la fracción líquida obtenida después del pretratamiento del material lignocelulósico da como resultado un mayor rendimiento de etanol. La Tabla 1 también muestra que se obtuvieron rendimientos de producción de etanol incluso más altos cuando la fracción líquida obtenida después del pretratamiento del material lignocelulósico se diluyó con una fracción líquida concentrada obtenida después de la separación sólido/líquido del hidrolizado en comparación con cuando la fracción líquida obtenida después del pretratamiento del material lignocelulósico se diluyó con agua solo.

Ejemplo 3

Proceso integrado para la producción de alcohol a partir de material lignocelulósico

El ejemplo se hace esencialmente como se describe en el Ejemplo 2 con la condición de que la dilución no se haga con la fracción líquida concentrada, sino con la fracción sólida obtenida después de la separación sólido/líquido del hidrolizado. La fracción sólida contiene azúcares solubles residuales (aproximadamente 17 % p/p de sólidos totales en la fracción sólida) que son atrapados en la fracción de azúcar insoluble restante y la lignina presente en la fracción sólida.

La fracción líquida se diluye hasta 70 % p/p/ con la fracción sólida. La dilución con la fracción sólida da como resultado una mayor concentración de etanol (aproximadamente 4 % p/p de etanol).

Ejemplo 4

Proceso integrado para la producción de enzimas por un microorganismo productor de enzima

Se separó por centrifugación en una fracción sólida y una fracción líquida un lote individual de material lignocelulósico pretratado. La fracción sólida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico pretratado se lavó para obtener sólidos ricos en celulosa.

50 Parte de los sólidos se usaron como un sustrato (denominado sustrato A) para inducir la producción de enzimas. Otra parte de los sólidos se sometió a hidrólisis enzimática como se describe en el Ejemplo 1. El hidrolizado obtenido después de la hidrólisis enzimática se centrifugó para obtener una fracción sólida y una fracción líquida. La fracción sólida (denominada sustrato B) se lavó con agua y se usó para inducir la producción de enzima.

Se añadió el agua de lavado a la fracción líquida y se concentró por evaporación la fracción líquida resultante hasta que se obtuvo una fracción líquida concentrada final que contuvo glucosa a una concentración de aproximadamente 450 g/kg.

- 5 Se usó la fracción líquida concentrada como una fuente de carbono en dos procesos de producción de enzimas en el hongo *Rasamsonia*. En un proceso, se usó el sustrato A como inductor de la producción de enzimas, mientras que en el otro proceso se usó el sustrato B como un inductor de la producción de enzimas. Los procesos de producción consistieron en una fase de crecimiento y una fase de producción de enzima. Al final de la fase de producción de enzima, se determinó la cantidad de enzima presente en la fracción líquida del caldo de fermentación usando un ensayo convencional de determinación de proteínas y mostró que era de un nivel comparable (50 +/- 5 g/L),
- 10 demostrando que tanto la fracción sólida obtenida después de la separación sólido/líquido de material lignocelulósico pretratado como tal, como la fracción sólida obtenida después de la separación sólido/líquido de un hidrolizado enzimático, se pueden usar como inductor en la producción de enzimas.

Tabla 1: Producción de etanol después de una fermentación de 48 horas de porciones diluidas y no diluidas.

	Etanol concentración (en % p/p)
Porción 1 (no diluida)	1,2
Porción 2 (diluida hasta 70 % con agua)	2,0
Porción 3 (diluida hasta 70 % con 13 % de fracción líquida concentrada y 17 % de agua)	4,5
Porción 4 (diluida hasta 70 % con 20 % de fracción líquida concentrada y 10 % agua)	5,3

REIVINDICACIONES

1. Un proceso integrado para la producción de alcohol a partir de material lignocelulósico, en donde el proceso comprende:
- pretratamiento del material lignocelulósico para obtener material lignocelulósico pretratado,
- 5
- hidrólisis enzimática del material lignocelulósico pretratado para obtener material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado, en donde se añade oxígeno durante la hidrólisis enzimática,
 - separación sólido/líquido del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado para obtener una fracción sólida y una fracción líquida,
- 10
- propagación del microorganismo productor de alcohol por fermentación de la fracción líquida y fermentación de la fracción líquida por el microorganismo productor de alcohol para producir alcohol, en donde el microorganismo productor de alcohol es capaz de fermentar al menos un azúcar C5 y al menos un azúcar C6,
 - propagación de un hongo y producción de enzimas por el hongo, en donde una parte del material lignocelulósico enzimáticamente hidrolizado y una parte del material lignocelulósico pretratado se usa en la propagación del hongo y/o la producción de enzimas por el hongo y en donde las enzimas producidas por el hongo se usan en la hidrólisis enzimática.
- 15
2. Proceso según la reivindicación 1, en donde la fracción sólida comprende entre 3 y 97 % en peso de azúcares C5.
3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, en donde la fracción líquida comprende entre 1 y 97 % en peso de azúcares C6.
4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la hidrólisis enzimática comprende al menos:
- 20
- una etapa de licuefacción en donde el material lignocelulósico se hidroliza en al menos un primer recipiente, y
 - una etapa de sacarificación en donde el material licuado lignocelulósico se hidroliza en el al menos primer recipiente y/o en al menos un segundo recipiente.
5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde se recuperan el alcohol, las enzimas, el hongo y/o el microorganismo productor de alcohol.
- 25
6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el material lignocelulósico se somete a al menos una separación sólido/líquido antes de la hidrólisis enzimática.
7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el hongo es *Rasamsonia*.
8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde las enzimas están en forma de un caldo de fermentación completo.
- 30
9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el microorganismo productor de alcohol es una levadura.
10. Proceso según la reivindicación 9, en donde el microorganismo productor de alcohol es *Sacaromyces cerevisiae*.
11. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el contenido de materia seca al final de la hidrólisis enzimática es 5 % en peso o superior.
- 35
12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el alcohol es etanol.