

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 678**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06 (2006.01)

C12P 7/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2016 PCT/EP2016/051631**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016 WO16120296**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2016 E 16701543 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 3250698**

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

30 Prioridad:

28.01.2015 EP 15152900

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

18.06.2020

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 2 767 678 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para hidrólisis enzimática de material lignocelulósico y fermentación de azúcares

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un procedimiento integrado para la producción de alcohol y producción de ácidos orgánicos a partir de material lignocelulósico.

Antecedentes de la invención

10 El material lignocelulósico se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina, y proporciona una plataforma atractiva para generar energía alternativa y fuentes químicas para los combustibles fósiles. El material está disponible en grandes cantidades y puede convertirse en azúcares que nuevamente pueden convertirse en valiosos productos de fermentación, como biocombustibles y ácidos orgánicos.

La producción de productos de fermentación a partir de material lignocelulósico es conocida en la técnica, y generalmente incluye las etapas de pretratamiento, hidrólisis, fermentación y, opcionalmente, recuperación de los productos de fermentación.

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

20 El ácido succínico es un conocido ácido orgánico de cuatro carbonos que tiene un alto valor, ya que puede usarse como precursor de muchos productos químicos industriales y productos de consumo importantes. Actualmente, el ácido succínico se produce petroquímicamente a partir del butano a través del anhídrido maleico. Sin embargo, recientemente se ha centrado mucha atención en la producción microbiológica de ácido succínico utilizando microorganismos como alternativa a la síntesis química. En los últimos años, en gran medida en respuesta al suministro incierto de combustible y los esfuerzos para reducir las emisiones de dióxido de carbono, la producción de etanol a partir de recursos de biomasa renovables se está volviendo extremadamente importante desde el punto de vista del medio ambiente global. El bioetanol se considera una buena alternativa de combustible, porque los cultivos de origen se pueden cultivar de manera renovable y en la mayoría de los climas del mundo. Además, el uso de bioetanol es generalmente neutral en CO₂.

35 En los últimos años, ha surgido el concepto de biorrefinería. En el concepto de biorrefinería, se integran los procesos de conversión de biomasa y la tecnología para producir una variedad de productos que incluyen combustibles, energía, productos químicos y piensos para el ganado. De esta manera se aprovecha la ventaja de las diferencias naturales en la composición química y estructural de las reservas de alimentación de biomasa. El manejo cuidadoso y la utilización de materiales, productos y desechos son deseables, lo que hace que el concepto de biorrefinería sea un claro ejemplo de simbiosis industrial. Al producir múltiples productos e integrar el tratamiento de residuos, las biorrefinerías pueden maximizar los valores derivados de las reservas de alimentación de biomasa y convertir el procesamiento de biomasa en oportunidades reales.

40 La optimización de los procedimientos realizados dentro de las biorrefinerías y el diseño general de las biorrefinerías son herramientas cruciales para aumentar la eficiencia de las biorrefinerías y reducir sus costes generales.

Los documentos US2014/170723 y US2014/0356915 describen procedimientos para producir alcohol y ácidos orgánicos que incluyen etapas de hidrólisis enzimática y fermentación, y etapas para la propagación de microorganismos.

45 El documento WO2014/144574 enseña un procedimiento integrado para producir etanol y ácido succínico, que comprende hidrólisis enzimática, separación sólido/líquido, y fermentaciones.

Por lo tanto, es deseable incluir conceptos, diseños y configuraciones de procedimientos nuevos e innovadores destinados a maximizar la producción de biorrefinerías y reducir sus costes generales.

Sumario de la invención

50 Un objeto de la invención es proporcionar un procedimiento integrado mejorado para la producción de alcohol y la producción de ácido orgánico a partir de material lignocelulósico. La optimización y la mejora radican en muchas características que incluyen, entre otras, la valorización de las corrientes secundarias, la separación de las corrientes, el (re)uso de ciertos materiales y corrientes, las condiciones de hidrólisis enzimática y fermentaciones, la integración de una variedad de procedimientos de conversión. El procedimiento integrado para la producción de alcohol y la producción de ácido orgánico a partir de material lignocelulósico comprende las etapas de:

- hidrólisis enzimática del material lignocelulósico para obtener material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente,
- separación sólido/líquido del material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente para obtener una fracción sólida y una fracción líquida, en el que la fracción líquida:
 - 5 - se fermenta mediante un microorganismo productor de alcohol para producir alcohol,
 - se fermenta mediante un microorganismo productor de ácido orgánico para producir un ácido orgánico,
 - se fermenta mediante un microorganismo productor de alcohol para la propagación del microorganismo productor de alcohol,
 - 10 - se fermenta mediante un microorganismo productor de ácido orgánico para la propagación del microorganismo productor de ácido orgánico,
- propagación de un hongo, y
- producción de enzimas por el hongo, en el que las enzimas producidas por el hongo se usan en la hidrólisis enzimática.

Descripción detallada de la invención

15 A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las palabras “comprenden” e “incluyen” y las variaciones tales como “comprende”, “que comprende”, “incluye” y “que incluye” deben interpretarse de manera inclusiva. Es decir, estas palabras tienen la intención de transmitir la posible inclusión de otros elementos o enteros no específicamente citados, cuando el contexto lo permita. 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
 20 ejemplo, “un elemento” puede significar un elemento o más de un elemento. El término “microorganismo”, como se usa en el presente documento, significa uno o más microorganismos. A menos que se indique lo contrario, las expresiones “la fracción sólida” y “la fracción líquida” significan la fracción sólida y la fracción líquida, respectivamente, obtenidas después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente. Como se describe en el presente documento, después de una separación sólido/líquido, se obtienen una fracción sólida y una fracción
 25 líquida.

La invención se refiere a un procedimiento integrado de coproducción de alcohol y ácido orgánico. La expresión “procedimiento integrado” es conocida por una persona experta en la técnica, y significa un procedimiento en el que se combinan dos o más etapas de procedimiento relacionadas de al menos dos procedimientos industriales separados, que pueden realizarse por separado, de modo que al menos una etapa de procedimiento es común para los dos
 30 procedimientos. Además, en un “procedimiento integrado” como se define en el presente documento, las corrientes, fracciones y/o porciones producidas y/u obtenidas en un procedimiento industrial pueden usarse en otro procedimiento industrial, mejorando así el procedimiento global de manera más eficiente que la suma de cada procedimiento individual. El procedimiento integrado optimiza la utilización de biomasa y reduce los subproductos que de otro modo requerirían tratamiento. En otras palabras, la expresión “procedimiento integrado” significa una combinación de al
 35 menos dos operaciones unitarias que explota las interacciones entre diferentes unidades para emplear recursos de manera efectiva, mejorar la eficiencia energética, mejorar el equilibrio de materiales, maximizar las ganancias y/o minimizar los costes. Al menos una de las dos operaciones de la unidad recibe material y/o energía, y puede depender de éstos, de la otra operación de la unidad. En un procedimiento integrado, las interacciones entre diferentes operaciones unitarias se consideran desde el principio, en lugar de optimizarse por separado. La integración de
 40 procedimientos no se limita al diseño de nuevas plantas, sino que también cubre el diseño de reacondicionamiento, por ejemplo nuevas unidades que se instalarán en una planta antigua, y la operación de los sistemas existentes. La presente invención también proporciona procedimientos de producción de alcohol y ácido orgánico, en los que las unidades de tales procedimientos están completamente integradas, y por lo tanto los procedimientos son de bajo coste, de operación simple, y versátiles, debido a las alternativas e interconexiones dentro de sus etapas. El
 45 procedimiento integrado es más eficiente en cuanto a energía y materiales que los procedimientos individuales juntos, y, como tal, produce una mayor productividad con la utilización y valorización completas de la biomasa lignocelulósica.

La presente invención se refiere a un procedimiento integrado para la producción de alcohol y producción de ácido orgánico a partir de material lignocelulósico, en el que el procedimiento comprende:

- 50 - hidrólisis enzimática del material lignocelulósico para obtener material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente,
- separación sólido/líquido del material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente para obtener una fracción sólida y una fracción líquida, en el que la fracción líquida:
 - se fermenta mediante un microorganismo productor de alcohol para la propagación del microorganismo productor de alcohol,

- se fermenta mediante un microorganismo productor de ácido orgánico para la propagación del microorganismo productor de ácido orgánico,
 - se fermenta mediante el microorganismo productor de alcohol para producir alcohol,
 - se fermenta mediante el microorganismo productor de ácido orgánico para producir un ácido orgánico, y
- 5 - propagación de un hongo y producción de enzimas por el hongo, en el que las enzimas producidas por el hongo se usan en la hidrólisis enzimática.

La presente invención también se refiere a un procedimiento integrado para la producción de alcohol y la producción de ácido orgánico a partir de material lignocelulósico, en el que el procedimiento comprende:

- pretratamiento del material lignocelulósico para obtener material lignocelulósico pretratado,
- 10 - hidrólisis enzimática del material lignocelulósico pretratado para obtener material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente,
- separación sólido/líquido del material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente para obtener una fracción sólida y una fracción líquida,
 - fermentación de la fracción líquida por un microorganismo productor de alcohol para producir alcohol,
- 15 - fermentación de la fracción líquida por un microorganismo productor de ácido orgánico para producir un ácido orgánico,
- propagación del microorganismo productor de alcohol por fermentación de la fracción líquida,
 - propagación del microorganismo productor de ácido orgánico por fermentación de la fracción líquida,
- 20 - propagación de un hongo y producción de enzimas por el hongo, en el que las enzimas producidas por el hongo se usan en la hidrólisis enzimática.

La fracción líquida se usa como sustrato en la producción de un ácido orgánico por el microorganismo productor de ácido orgánico. En otras palabras, el microorganismo productor de ácido orgánico fermenta la fracción líquida para producir un ácido orgánico. En una realización, el microorganismo productor de ácido orgánico no fermenta la fracción sólida para producir un ácido orgánico. En una realización, el alcohol producido por el microorganismo productor de alcohol se usa como sustrato en la fermentación por el microorganismo productor de ácido orgánico.

25

En todas las realizaciones, 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. En una realización, el microorganismo productor de alcohol no fermenta la fracción sólida para producir alcohol. La fracción líquida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico pretratado se usa como sustrato en la producción de alcohol por el microorganismo productor de alcohol. La fracción líquida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico pretratado se usa como sustrato en la producción de alcohol por el microorganismo productor de alcohol. El material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente se puede usar como sustrato en la producción de alcohol por el microorganismo productor de alcohol. En otras palabras, el material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente, antes de ser sometido a una separación sólido/líquido, se puede usar como sustrato en la producción de alcohol por el microorganismo productor de alcohol.

30

35

La presente invención se refiere a un procedimiento integrado para la producción de alcohol y la producción de ácido orgánico a partir de material lignocelulósico como se define en las reivindicaciones, en el que el procedimiento comprende la etapa de propagación del microorganismo productor de alcohol por fermentación de la fracción líquida. Si es necesario, se pueden añadir una o más fuentes externas de carbono y nutrientes antes y/o durante la propagación. Las condiciones para la propagación dependerán del tipo de microorganismo utilizado, y están dentro del alcance del experto.

40

La presente invención se refiere a un procedimiento integrado para la producción de alcohol y producción de ácido orgánico a partir de material lignocelulósico como se describe en el presente documento, en el que el procedimiento comprende la etapa de propagación del microorganismo productor de ácido orgánico por fermentación de la fracción líquida. Si es necesario, se pueden añadir una o más fuentes externas de carbono y nutrientes antes y/o durante la propagación. Las condiciones para la propagación dependerán del tipo de microorganismo utilizado, y están dentro del alcance del experto.

45

La presente invención se refiere a un procedimiento integrado para la producción de alcohol y producción de ácido orgánico a partir de material lignocelulósico como se describe aquí, en el que el procedimiento comprende la etapa de propagación de un hongo y producción de enzimas por el hongo, en el que las enzimas producidas por el hongo se usan en la hidrólisis enzimática. Si es necesario, se pueden añadir una o más fuentes externas de carbono y nutrientes

50

antes y/o durante la propagación. Las condiciones para la propagación dependerán del tipo de hongo utilizado, y están dentro del alcance del experto.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento integrado para la producción de alcohol y producción de ácido orgánico a partir de material lignocelulósico como se define en las reivindicaciones, en el que el procedimiento comprende la etapa de producción de enzimas por un hongo y producción de enzimas por el hongo, en el que las enzimas producidas por el hongo se usan en la hidrólisis enzimática. Si es necesario, se pueden añadir una o más fuentes externas de carbono y nutrientes antes y/o durante la producción. Las condiciones para la producción dependerán del tipo de hongo utilizado, y están dentro del alcance del experto.

10 La hidrólisis enzimática y la fermentación son etapas separadas. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a, hidrólisis y fermentación separadas (SHF), hidrólisis y co-fermentación separadas (SHCF).

15 El material lignocelulósico puede someterse a al menos una separación sólido/líquido antes de la hidrólisis enzimática. El material lignocelulósico pretratado puede someterse a al menos una separación sólido/líquido antes de la hidrólisis enzimática. Así, antes de someter el material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado a hidrólisis enzimática, puede someterse a al menos una separación sólido/líquido. Los métodos y condiciones de separación sólido/líquido dependerán del tipo de material lignocelulósico utilizado y están 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 ayudas para mejorar la separación.

20 La fracción líquida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado se somete a hidrólisis enzimática. La fracción sólida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado puede someterse a una separación sólido/líquido adicional. Este ciclo puede repetirse varias veces.

25 La fracción sólida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado se somete 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 usa como sustrato en al menos uno de los procedimientos de fermentación. La fracción líquida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado puede usarse como sustrato en una propagación del microorganismo productor de alcohol y/o puede usarse como sustrato en una fermentación por el microorganismo productor de alcohol para producir alcohol.

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

Las enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática se añaden antes de someter el material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado a una etapa de separación sólido/líquido. Las enzimas luego terminan en parte en la fracción líquida.

35 En una realización, una parte del material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente se usa en la propagación del hongo productor de enzimas y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzimas. La parte del material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente que se usa en la propagación del hongo productor de enzimas y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzimas es la fracción líquida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente. En una realización, una parte del material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente y una parte del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado se usa en la propagación del hongo productor de enzimas y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzimas. Esto significa que una parte del material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente, y opcionalmente una parte del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado se añade al hongo productor de enzimas antes y/o durante la propagación y/o antes y/o durante la producción de enzimas por el hongo productor de enzimas. Por supuesto, el hongo productor de enzimas también se puede añadir a la parte del material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente y/o la parte del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado. El material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado utilizado en la propagación del hongo productor de enzimas y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzimas no ha sufrido hidrólisis enzimática. En una realización, la parte del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado que se usa en la propagación del hongo productor de enzimas y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzimas no se ha sometido a una separación sólido/líquido. En otra realización, la parte del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado que se usa en la propagación del hongo productor de enzimas y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzimas se ha 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 enzimas y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzimas.

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

En una realización, la propagación del hongo productor de enzimas y la producción de enzimas por el hongo productor de enzimas son una sola etapa, lo que significa que durante la propagación del hongo productor de enzimas, las enzimas ya son producidas por el microorganismo.

5 El material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente que se añade al hongo productor de enzimas antes y/o durante la propagación del hongo productor de enzimas y/o antes y/o durante la producción de enzimas por el hongo productor de enzimas puede concentrarse antes de la adición. En una realización, la parte del material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente que se usa en la propagación del hongo productor de enzimas y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzimas se ha sometido a una separación sólido/líquido. La fracción líquida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente puede usarse en la propagación del hongo productor de enzimas y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzimas. En una realización, esa fracción líquida puede someterse a una etapa de concentración antes de usarse en la propagación del hongo productor de enzimas y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzimas.

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

20 En una realización, la relación entre la parte del material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente y la parte del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado que se usa en la propagación del hongo productor de enzimas y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzimas está entre 1% en peso:99% en peso y 99% en peso:1% en peso. Por supuesto, la relación puede diferir en caso de que una o más fuentes de carbono externas se utilicen en la propagación del hongo productor de enzimas y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzimas. En una realización alternativa, cuando la hidrólisis enzimática comprende una etapa de licuefacción separada y una etapa de sacarificación (como se describe con más detalle a continuación), el producto de la etapa de licuefacción se puede usar en la propagación del hongo productor de enzimas y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzimas. Esto se puede hacer con o sin adición de material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente. Por supuesto, también todas y cada una de las combinaciones de parte del material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente, parte del material lignocelulósico pretratado, producto de la etapa de licuefacción y fuente externa de carbono y nutrientes pueden usarse en la propagación del hongo productor de enzimas y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzimas.

30 La parte del material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente y la parte del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado que se usan en la propagación del hongo productor de enzimas y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzimas pueden variar. La parte del material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente que se usa en la propagación del hongo productor de enzimas y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzimas 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 hidrolizado enzimáticamente total.

40 La parte del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado que se usa en la propagación del hongo productor de enzimas y/o la producción de enzimas por el hongo productor de enzimas 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.

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

50 Después de la hidrólisis enzimática, el material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente se somete a una separación sólido/líquido. Los métodos para la 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 ayudas para mejorar la separación.

55 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 de C5. En una realización, la al menos fracción líquida comprende entre 1 y 97% en peso de azúcares de C6.

En una realización, la hidrólisis enzimática comprende al menos una etapa de licuefacción en la que el material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado se hidroliza en al menos un primer recipiente, y una etapa de

- sacarificación en la que el material licuado se hidroliza en al menos el 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 primer recipiente), también se puede hacer en un recipiente separado (es decir, al menos un segundo recipiente). Así, en la hidrólisis enzimática de los procedimientos integrados según la presente invención, se pueden combinar la
- 5 licuefacción y la sacarificación. Alternativamente, la licuefacción y la sacarificación pueden ser etapas separadas. La licuefacción y la sacarificación pueden realizarse a diferentes temperaturas, pero también pueden realizarse a una sola temperatura. La temperatura de la licuefacción puede ser más alta que la temperatura de la sacarificación. La licuefacción se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura de 60-75°C, y la sacarificación se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura de 50-65°C.
- 10 La hidrólisis enzimática se puede realizar en uno o más recipientes, pero también se puede realizar en uno o más tubos o en cualquier otro sistema continuo. Esto también es cierto 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 en cualquier otro sistema continuo, y/o la etapa de
- 15 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 usarán en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, recipientes agitados por lotes alimentados, recipientes agitados por lotes, recipientes agitados de flujo continuo con ultrafiltración, y reactores continuo de columna de flujo pistón. La agitación puede realizarse mediante uno o más impulsores, bombas y/o mezcladoras estáticas.
- 20 El material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado se pueden añadir al uno o más recipientes utilizados para la hidrólisis enzimática. Las enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática ya pueden estar presentes en uno o más recipientes antes de que se añada el material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado. Alternativamente, las enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática pueden añadirse a uno o más recipientes. El material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado ya pueden estar presentes en uno o más recipientes
- 25 antes de que se añadan las enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática. El material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado y las enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática pueden añadirse simultáneamente a uno o más recipientes. Las enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática pueden ser una composición acuosa. Esto también es cierto cuando la hidrólisis enzimática comprende una etapa de licuefacción y una etapa de sacarificación.
- 30 Las enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática pueden añadirse antes y/o durante la hidrólisis enzimática. Como se indicó anteriormente, cuando el material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado se somete a una separación sólido/líquido antes de la hidrólisis enzimática, las enzimas utilizadas 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 una etapa de sacarificación, se pueden añadir enzimas adicionales durante y/o después de la etapa de licuefacción. Las enzimas
- 35 adicionales se pueden añadir antes y/o durante la etapa de sacarificación. También se pueden añadir enzimas adicionales después de la etapa de sacarificación.
- 40 En una realización, el tiempo total de hidrólisis enzimática es de 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.
- 45 En una realización, el tiempo total de hidrólisis enzimática es 10 a 300 horas, 16 a 275 horas, preferiblemente 20 a 250 horas, más preferiblemente 30 a 200 horas, lo más preferiblemente 40 a 150 horas.
- 50 La viscosidad del material lignocelulósico en uno o más recipientes utilizados para la hidrólisis enzimática se mantiene entre 10 y 4000 cP, entre 10 y 2000 cP, preferiblemente entre 10 y 1000 cP.
- 55 En caso de que el procedimiento integrado comprenda una hidrólisis enzimática que comprende 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, preferiblemente 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, preferiblemente entre 10 y 800 cP.
- La viscosidad se puede determinar con un reómetro Brookfield DV III a la temperatura utilizada para la hidrólisis.
- En una realización, se añade oxígeno durante la hidrólisis enzimática. En una realización, se añade oxígeno durante al menos una parte de la hidrólisis enzimática. Se puede añadir oxígeno de forma continua o discontinua durante la hidrólisis enzimática. En una realización, se añade oxígeno una o más veces durante la hidrólisis enzimática. En una
- 55 realización, se puede añadir oxígeno antes de la hidrólisis enzimática, durante la adición de material lignocelulósico 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 las mismas. Se añade oxígeno a uno o más recipientes utilizados en la hidrólisis enzimática.

5 El oxígeno se puede añadir de varias formas. Por ejemplo, el oxígeno se puede añadir como gas oxígeno, gas enriquecido con oxígeno, como aire enriquecido con oxígeno, o aire. El oxígeno también se puede añadir mediante la generación de oxígeno *in situ*. Por ejemplo, el oxígeno puede generarse por electrólisis, el oxígeno puede producirse enzimáticamente, por ejemplo mediante la adición de peróxido, o se puede producir oxígeno químicamente, por ejemplo por un sistema generador de oxígeno como KHSO_5 . Por ejemplo, el oxígeno es producido a partir de peróxido por catalasa. El peróxido se puede añadir en forma de peróxido disuelto, o se puede generar por una reacción enzimática o química. En caso de que la catalasa se use 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.

10 Los ejemplos de cómo añadir oxígeno incluyen, pero sin limitarse a, la adición de oxígeno por medio de rociado, electrólisis, adición química de oxígeno, llenado del uno o más recipientes utilizados en la hidrólisis enzimática desde la parte superior (sumergir el hidrolizado en el tanque y en consecuencia, introducir oxígeno en el hidrolizado), y la adición de oxígeno al espacio de cabeza de dicho uno o más recipientes. Cuando se añade oxígeno al espacio de cabeza del recipiente o recipientes, se puede suministrar suficiente oxígeno necesario para la reacción de hidrólisis. En general, la cantidad de oxígeno añadida al recipiente o recipientes puede controlarse y/o variarse. La restricción del oxígeno suministrado es posible añadiendo solo oxígeno durante parte del tiempo de hidrólisis en dicho recipiente o recipientes. Otra opción es añadir oxígeno a una concentración baja, por ejemplo usando una mezcla de aire y aire reciclado (aire que sale del recipiente), o "diluyendo" el aire con un gas inerte. El aumento de la cantidad de oxígeno añadido se puede lograr mediante la adición de oxígeno durante períodos más largos del tiempo de hidrólisis, añadiendo oxígeno a una concentración más alta, 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 introducirse, por ejemplo soplado, en los contenidos del recipiente de hidrólisis líquida de material lignocelulósico. También se puede soplar en el espacio de cabeza del recipiente.

25 En una realización, se añade oxígeno al uno o más recipientes usados en la hidrólisis enzimática antes y/o durante y/o después de la adición del material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado a dicho uno o más recipientes. El oxígeno puede introducirse junto con el material lignocelulósico y/o el material lignocelulósico pretratado que ingresa en el recipiente o recipientes de hidrólisis. El oxígeno puede introducirse en la corriente de material que entrará en el recipiente o recipientes o con parte de los contenidos del recipiente o recipientes que pasa un bucle externo del recipiente o recipientes.

30 En la hidrólisis enzimática, los polisacáridos amorfos y cristalinos o la celulosa se hidrolizan a azúcares como la glucosa. Los polisacáridos amorfos se convierten, por ejemplo, en oligosacáridos mediante endoglucanasas, y luego los oligosacáridos se pueden convertir mediante celobiohidrolasas y beta-glucosidasas en glucosa. La conversión de los polisacáridos cristalinos puede ocurrir en paralelo o secuencial y continuar incluso cuando la mayoría de los polisacáridos amorfos se hidrolizan. La adición de oxígeno en combinación con monooxigenasas de polisacáridos líticas es beneficiosa durante la hidrólisis de los polisacáridos cristalinos, por ejemplo en la degradación de los polisacáridos en oligosacáridos. La estructura cristalina del glucano se puede abrir mediante monooxigenasas de polisacárido líticas. Este tipo de enzima abre la estructura oxidando los enlaces glucosídicos y haciéndola accesible para las otras enzimas celulolíticas para hidrolizar aún más los oligosacáridos en glucosa. La adición de oxígeno es muy útil, especialmente en la fase en la que los polisacáridos cristalinos son convertidos por enzimas.

40 En una realización, el recipiente o recipientes utilizados en la hidrólisis enzimática de los procedimientos integrados de la presente invención tienen un volumen de al menos 1 m^3 . Preferiblemente, los recipientes tienen un volumen de al menos 1 m^3 , al menos 2 m^3 , al menos 3 m^3 , al menos 4 m^3 , al menos 5 m^3 , al menos 6 m^3 , al menos 7 m^3 , al menos 8 m^3 , al menos 9 m^3 , al menos 10 m^3 , al menos 15 m^3 , al menos 20 m^3 , al menos 25 m^3 , al menos 30 m^3 , al menos 35 m^3 , al menos 40 m^3 , al menos 45 m^3 , al menos 50 m^3 , al menos 60 m^3 , al menos 70 m^3 , al menos 75 m^3 , al menos 80 m^3 , al menos 90 m^3 , al menos 100 m^3 , al menos 200 m^3 , al menos 300 m^3 , al menos 400 m^3 , al menos 500 m^3 , al menos 600 m^3 , al menos 700 m^3 , al menos 800 m^3 , al menos 900 m^3 , al menos 1000 m^3 , al menos 1500 m^3 , al menos 2000 m^3 , al menos 2500 m^3 . En general, el recipiente o recipientes serán más pequeños que 3000 m^3 o 5000 m^3 . En caso de que se usen varios recipientes en la hidrólisis enzimática de los procedimientos 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 procedimientos integrados de la presente invención comprenda una etapa de licuefacción y una etapa de sacarificación separadas, el recipiente o recipientes utilizados para la etapa de licuefacción y el recipiente o recipientes utilizados para la etapa de sacarificación pueden tener el mismo volumen, pero también pueden tener un volumen diferente.

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

- 5 En una realización, el recipiente o recipientes utilizados en la fermentación de la fracción líquida y/o la fracción sólida por un microorganismo productor de ácido orgánico para producir un ácido orgánico tienen un volumen de al menos 1 m³. Preferiblemente, 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 recipiente o recipientes serán más pequeños que 2000 m³.
- 10 En una realización, el recipiente o recipientes utilizados 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. Preferiblemente, 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 recipiente o recipientes serán más pequeños que 500 m³.
- 15
- 20 En una realización, el recipiente o recipientes utilizados en la propagación del microorganismo productor de ácido orgánico por fermentación de la fracción líquida y/o la fracción sólida tienen un volumen de al menos 1 m³. Preferiblemente, 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 150 m³. En general, el recipiente o recipientes serán más pequeños que 200 m³.
- 25
- 30 En una realización, el recipiente o recipientes utilizados en la propagación de un microorganismo productor de enzimas tienen un volumen de al menos 1 m³. Preferiblemente, 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 recipiente o recipientes serán más pequeños que 500 m³.
- 35
- 40 En una realización, el recipiente o recipientes utilizados en la producción de enzimas por el microorganismo productor de enzimas tienen un volumen de al menos 1 m³. Preferiblemente, 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 recipiente o recipientes serán más pequeños que 100 m³.
- 45
- 50 El microorganismo productor de enzimas es un hongo. En una realización, las enzimas se derivan de un hongo filamentosos, o las enzimas comprenden una enzima fúngica filamentosos. En una realización preferida, el hongo es *Rasamsonia*, siendo *Rasamsonia emersonii* el más preferido. Las enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática de los procedimientos integrados de la presente invención se derivan de un hongo, o las enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática de los procedimientos integrados de la presente invención comprenden una enzima fúngica. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (según lo definido por Hawksworth et al., en Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK). Los hongos filamentosos se caracterizan por una pared micelial compuesta de quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal, y el catabolismo del carbono es aeróbico obligatorio. Cepas de hongos filamentosos incluyen, pero no se limitan a, las 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*, *Scylatidium*, *Schizophyllum*, *Stagonospora*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thermomyces*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes pleurotus*, *Trichoderma* y *Trichophyton*..
- 55
- 60 Varias cepas de hongos filamentosos son fácilmente accesibles al público en varias colecciones de cultivos, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL). Los ejemplos de tales 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 sus derivados.

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

La hidrólisis enzimática de la primera etapa se realiza preferiblemente a 50–90°C. En esta etapa, se prefieren las enzimas celulolíticas termoestables. Una enzima “termoestable”, como se usa en el presente documento, significa que la enzima tiene un óptimo de temperatura 50°C o mayor, 60°C o mayor, 70°C o mayor, 75°C o mayor, 80°C o mayor, 85°C o mayor. Por ejemplo, pueden aislarse de microorganismos termófilos, o pueden ser diseñados por un experto y sintetizados artificialmente. Los polinucleótidos pueden aislarse u obtenerse de hongos filamentosos termófilos o termotolerantes, o aislarse de hongos no termófilos o no termotolerantes, pero se encuentra que son termoestables.

Por “hongo termófilo” se entiende un hongo que crece a una temperatura de 50°C o mayor. Por hongo “termotolerante” se entiende un hongo que crece a una temperatura de 45°C o mayor, que tiene un máximo cercano a 50°C.

Las células fúngicas termófilas o termotolerantes adecuadas pueden ser una célula de *Humicola*, *Rhizomucor*, *Myceliophthora*, *Rasamsonia*, *Talaromyces*, *Thermomyces*, *Thermoascus* o *Thielavia*, preferiblemente 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 aparecen en todo el árbol fúngico de la vida. Ejemplos son *Rhizomucor* en los Mucorales, *Myceliophthora* en los Sordariales y *Talaromyces*, *Thermomyces* y *Thermoascus* en los Eurotiales (véase Mouchacca, 1997). La mayoría de las especies de *Talaromyces* son mesófilas, pero las excepciones son especies dentro de las secciones *Emersonii* y *Thermophila*. La sección *Emersonii* incluye *Talaromyces emersonii*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Talaromyces bacillisporus* y *Talaromyces leycettanus*, todos los cuales crecen bien a 40°C. *Talaromyces bacillisporus* es termotolerante, *Talaromyces leycettanus* es termotolerante a termófilo, y *Talaromyces emersonii* y *Talaromyces byssochlamydoides* son realmente termófilos (véanse Stolk y Samson, 1972). El único miembro de la sección *Thermophila* de *Talaromyces*, *Talaromyces thermophilus*, crece rápidamente a 50°C (véanse Stolk y Samson, 1972). La clasificación actual de estas especies termófilas de *Talaromyces* se basa principalmente en caracteres fenotípicos y fisiológicos, tal como su capacidad para crecer por encima de 40°C, color de ascosporas, la estructura del recubrimiento ascornatal, y la formación de cierto tipo de anamorfo. Stolk y Samson (1972) declararon que los miembros de la sección *Emersonii* tienen anamorfos de *Paecilomyces* (*Talaromyces byssochlamydoides* y *Talaromyces leycettanus*) o de la serie *Penicillium cylindrosporum* (*Talaromyces emersonii* y *Talaromyces bacillisporus*). Más tarde, Pitt (1979) transfirió las especies pertenecientes a la serie *Penicillium cylindrosporum* al género *Geosmithia*, basándose en diversos caracteres tales como la formación de conidios a partir de poros terminales en lugar de collula (cuellos), un carácter de *Penicillium* y *Paecilomyces*. Dentro del género *Geosmithia*, solo *Geosmithia argillacea* es termotolerante, y Stolk et al. (1969) y Evans (1971) propusieron una conexión con miembros de la sección *Emersonii* de *Talaromyces*. Se desconoce la relación filogenética de las especies de *Talaromyces* termófilas dentro de *Talaromyces* y Trichocomaceae. (Véase J. Houbraken, Antonie van Leeuwenhoek 2012 Feb; 101(2): 403-21).

Rasamsonia es un nuevo género que comprende especies de *Talaromyces* y *Geosmithia* termotolerantes y termófilas (J. Houbraken et al., más arriba). Basado en datos fenotípicos, fisiológicos y moleculares, Houbraken et al. propusieron transferir las especies *Talaromyces emersonii*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Talaromyces eburneus*, *Geosmithia argillacea* y *Geosmithia cylindrospora* al género *Rasamsonia* nov. Los hongos termófilos preferidos son *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 tasas de conversión máximas a temperatura dentro del intervalo de 50 a 70°C. Las enzimas permanecen activas en estas circunstancias durante 14 días y más sin cesar por completo la actividad. Al usar condiciones de temperatura óptimas, se puede liberar una cantidad máxima de azúcares reductores del material lignocelulósico (hidrólisis total) dentro del tiempo de hidrólisis más corto posible. De esta manera, se puede lograr una conversión del 100% de la celulosa en glucosa en menos de 5 días. El rendimiento máximo teórico (Yps máx en g de producto por gramo de glucosa) de un producto de fermentación puede derivarse de la bioquímica de los libros de texto. Para el etanol, 1 mol de glucosa (180 g) rinde, según la ruta de fermentación de la glucólisis normal en levadura, 2 moles de etanol (= 2 x 46 = 92 g de etanol). El rendimiento máximo teórico de etanol en glucosa es, por lo tanto, 92/180 = 0,511 g de etanol/g de glucosa. 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 el ácido láctico, el rendimiento de

5 fermentación para la fermentación homoláctica es 2 moles de ácido láctico (MW = 90 g/mol) por mol de glucosa. Según esta estequiometría, el Yps máx = 1 g de ácido láctico/g de glucosa. El rendimiento teórico máximo de ácido succínico en 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 costes lograda con la aplicación de enzimas celulolíticas de *Rasamsonia* es el resultado de una reducción general del tiempo de procedimiento.

10 Debido a la alta estabilidad de las enzimas utilizadas en los procedimientos de la presente invención, es posible reducir la dosis de la enzima y extender el uso de la enzima prolongando los tiempos de hidrólisis. Por ejemplo, 0,175 ml de enzima/g de material seco de material lignocelulósico da como resultado la liberación de aproximadamente el 90% del máximo teórico de azúcares reductores a partir del material lignocelulósico pretratado dentro de las 72 h. Cuando se usan 0,075 ml de enzima/g de material seco de material lignocelulósico, se logra aproximadamente un 90% de conversión del máximo teórico en 120 h. Los resultados muestran que, debido a la estabilidad de la actividad enzimática, la reducción de la dosis de la enzima se puede compensar prolongando el tiempo de hidrólisis para obtener la misma cantidad de azúcares reductores. La reducción de costes lograda mediante el uso de enzimas celulolíticas estables, como las de *Rasamsonia*, da como resultado dosis de enzimas más bajas que, sin embargo, dan como resultado rendimientos de conversión de hidrólisis similares.

15 En un procedimiento común para convertir material lignocelulósico en etanol, las etapas del procedimiento se realizan preferiblemente en condiciones sépticas para reducir los costes operativos. Por lo tanto, la contaminación y el crecimiento de microorganismos contaminantes pueden ocurrir y dar lugar a efectos secundarios indeseables, tales como la producción de ácido láctico, ácido fórmico y ácido acético, pérdidas de rendimiento de etanol en el sustrato, producción de toxinas y polisacáridos extracelulares. Estos efectos pueden afectar significativamente los costes de producción. Una temperatura de procedimiento alta y/o un tiempo de procedimiento corto limitan el riesgo de contaminación durante la hidrólisis y la fermentación. Las enzimas termoestables, 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 cause efectos secundarios no deseados es poco o casi nulo.

20 Durante la etapa de fermentación, en la que se produce etanol, las temperaturas están típicamente entre 30 y 38°C, y preferiblemente no se elevan debido a las pérdidas de producción. Al aplicar tiempos cortos de procedimiento de fermentación, los riesgos y efectos de la contaminación y/o el crecimiento de contaminantes se reducen tanto como sea posible. Con enzimas estables, como las de *Rasamsonia*, se puede aplicar un corto tiempo de fermentación y, por lo tanto, los riesgos de contaminación y/o crecimiento de contaminantes se reducen tanto como sea posible. La reducción de costes lograda con la aplicación de enzimas celulolíticas termoestables de *Rasamsonia* de esta manera, da como resultado un menor riesgo de fallos en el procedimiento debido a la contaminación.

25 La primera etapa después del pretratamiento térmico es enfriar el material pretratado a temperaturas en las que las enzimas tienen una actividad óptima. A gran escala, esto generalmente se hace añadiendo agua (enfriada), que, además de disminuir la temperatura, reduce el contenido de materia seca. Al usar enzimas termoestables, como las de *Rasamsonia*, se puede lograr una reducción de costes, porque (i) se requiere menos enfriamiento del material pretratado ya que se permiten temperaturas más altas durante la hidrólisis, y (ii) se añade menos agua, lo que aumenta el contenido de materia seca durante la hidrólisis y la fermentación y, por lo tanto, aumenta la capacidad de producción de etanol (cantidad producida por unidad de tiempo por volumen) de una planta de etanol. Al usar enzimas termoestables, como las de *Rasamsonia*, la reducción de costes también se puede lograr usando agua de enfriamiento que tenga una temperatura más alta que el agua que se usa en un procedimiento con enzima no termoestable.

30 Al final de la hidrólisis, las actividades enzimáticas parecen ser bajas, ya que se liberan pocos azúcares reductores una vez que se convierte casi toda la celulosa. Sin embargo, la cantidad de actividad enzimática presente ha disminuido solo un poco, suponiendo principalmente que es debido a la absorción de las enzimas al sustrato. Al aplicar la separación sólido-líquido después de la hidrólisis, tal como la centrifugación, filtración, decantación, sedimentación, el 60% o más (por ejemplo 70%) de la actividad enzimática en disolución puede recuperarse y reutilizarse para la hidrólisis de un nuevo material lignocelulósico pretratado durante la siguiente hidrólisis. Además, después de la separación sólido-líquido, la enzima en disolución puede separarse de la disolución que contiene azúcares reductores y otros productos de hidrólisis de las acciones enzimáticas. Esta separación se puede realizar mediante técnicas que incluyen, pero sin limitarse a, ultra- y microfiltración, centrifugación, decantación, sedimentación, con o sin la primera adsorción de la enzima a un portador de cualquier tipo. Por ejemplo, después de la hidrólisis del material pretratado con 0,175 ml/g de carga de enzima de materia seca de material durante 20 h, se libera el 50% de la cantidad máxima teórica de azúcares reductores y, después de la misma hidrólisis durante 72 h, se libera el 90% de la cantidad máxima teórica de azúcares reductores. Por centrifugación y ultrafiltración, el 60-70% de la actividad enzimática se recuperó en el retenido, mientras que el filtrado contenía más del 80% de los azúcares reductores liberados. Al reutilizar el producto retenido, ya sea como tal o después de una purificación y/o concentración adicional, la dosis de enzima durante la siguiente etapa de hidrólisis puede reducirse del 60 al 70%. La reducción de costes lograda mediante el uso de enzimas celulolíticas estables, tales como las de *Rasamsonia*, es de esta manera la consecuencia de una menor dosis de enzima.

35 Los procedimientos integrados de la presente invención se pueden combinar con el reciclaje de enzimas después de la hidrólisis, el reciclaje del microorganismo productor de etanol después de la fermentación, y/o el reciclaje del

microorganismo productor de ácido orgánico después de la fermentación, y/o el reciclaje del hongo productor de enzimas después de la producción de las enzimas.

5 La termoestabilidad de las enzimas, como las de *Rasamsonia*, causa la actividad celulolítica restante después de la hidrólisis, la fermentación y la destilación al vacío en el destilado fino. La actividad total de la enzima se reduce durante las tres etapas sucesivas del procedimiento. Por lo tanto, el destilado fino obtenido después de la destilación a vacío se puede reutilizar como fuente de enzima para un nuevo ciclo de procedimiento de hidrólisis-fermentación-destilación de conversión de material pretratado en etanol. El destilado fino puede usarse en forma concentrada o (no) diluida y/o purificada, y con o sin suplementación enzimática adicional.

10 En un procedimiento óptimo, una cantidad de enzima se suplementa en el destilado fino, antes de su reutilización en un nuevo ciclo de procedimiento, igual a la cantidad de actividad perdida durante las tres etapas sucesivas del procedimiento del ciclo de procedimiento anterior. De esta manera, se evita la dosificación excesiva de enzima y, por lo tanto, se obtiene el uso más eficiente de la enzima. Además, al proporcionar una dosis alta de enzima en el primer ciclo del procedimiento, y suplementar la enzima igual a la cantidad de actividad perdida durante las tres etapas sucesivas del procedimiento en los siguientes ciclos del procedimiento, se pueden obtener las tasas de hidrólisis más altas posibles en cada ciclo del procedimiento, lo que da como resultado tiempos cortos de hidrólisis de menos de 48 h en combinación con el uso más eficiente de enzimas.

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

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

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

30 Las enzimas se pueden preparar por fermentación de un sustrato adecuado con un hongo adecuado, por ejemplo *Rasamsonia emersonii* o *Aspergillus niger*, en el que las enzimas son producidas por el microorganismo. El microorganismo puede alterarse para mejorar o para producir las enzimas. Por ejemplo, el microorganismo puede mutar mediante procedimientos clásicos de mejora de la cepa o mediante técnicas de ADN recombinante. Por lo tanto, los microorganismos mencionados en este documento pueden usarse como tales para producir las enzimas, o pueden alterarse para aumentar la producción o para producir enzimas alteradas que pueden incluir enzimas heterólogas, por ejemplo celulasas, por lo tanto, enzimas que originalmente no son producidas por ese microorganismo. Preferiblemente, se usa un hongo, más preferiblemente 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 enzimas.

35 Las enzimas se usan para liberar azúcares del material lignocelulósico, que comprende polisacáridos. Los principales polisacáridos son celulosa (glucanos), hemicelulosas (xilanos, heteroxilanos y xiloglucanos). Además, algo de hemicelulosa puede estar presente como glucomanos, por ejemplo en material lignocelulósico derivado de la madera. La hidrólisis enzimática de estos polisacáridos a azúcares solubles, incluidos monómeros y multímeros, por ejemplo glucosa, celobiosa, xilosa, arabinosa, galactosa, fructosa, manosa, ramnosa, ribosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico y otras hexosas y pentosas ocurre bajo la acción de diferentes enzimas que actúan en concierto. Por producto de azúcar se entiende el producto de hidrólisis enzimática del material lignocelulósico. El producto de azúcar comprende azúcares solubles, que incluyen tanto monómeros como multímeros. Preferiblemente, comprende glucosa. Ejemplos de otros azúcares son celobiosa, xilosa, arabinosa, galactosa, fructosa, manosa, ramnosa, ribosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico y otras hexosas y pentosas. El producto de azúcar puede usarse como tal o puede procesarse adicionalmente, por ejemplo recuperarse, concentrarse y/o purificarse.

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

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

Las enzimas que pueden usarse en la invención se describen con más detalle a continuación.

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

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

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.

Las sustancias pécticas incluyen pectinas, arabinanos, galactanos y arabinogalactanos. Las pectinas son los polisacáridos más complejos en la pared celular de la planta. Se construyen alrededor de una cadena central de unidades de ácido D-galacturónico con enlaces α (1,4) intercaladas en algún grado con L-ramnosa. En cualquier pared celular hay una serie de unidades estructurales que se ajustan a esta descripción, y generalmente se ha considerado que en una sola molécula péctica, las cadenas centrales de diferentes unidades estructurales son continuas entre sí. Los principales tipos de unidades estructurales son: galacturonano (homogalacturonano), que puede estar sustituido con metanol en el grupo carboxilo y acetato en O-2 y O-3; rhamnogalacturonano I (RGI), en el que las unidades de ácido galacturónico se alternan con las unidades de ramnosa que llevan cadenas laterales de galactano enlazado (1,4) y arabinano (1,5). Las cadenas laterales de arabinano pueden estar unidas directamente a ramnosa o indirectamente a través de las cadenas de galactano; xilogalacturonano, con unidades individuales de xilosilo en O-3 de ácido galacturónico (estrechamente asociado con RGI); y rhamnogalacturonano II (RGII), una unidad menor particularmente compleja que contiene azúcares inusuales, por ejemplo apiosis. Una unidad RGII puede contener dos restos de apiosilo que, bajo condiciones iónicas adecuadas, pueden formar reversiblemente ésteres con borato.

Las enzimas para uso en los procedimientos integrados de la invención comprenden preferiblemente al menos dos actividades, aunque típicamente las enzimas comprenderán más de dos actividades, por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o incluso más actividades. Típicamente, las enzimas para uso en los procedimientos integrados de la invención comprenden al menos dos celulasas. Las al menos dos celulasas pueden contener las mismas o diferentes actividades. Las enzimas para su uso en los procedimientos integrados de la invención también pueden comprender al menos una enzima que no sea una celulasa. Preferiblemente, la al menos otra enzima tiene una actividad enzimática auxiliar, es decir, una actividad adicional que, directa o indirectamente conduce a la degradación de la lignocelulosa. Los ejemplos de tales actividades auxiliares se mencionan aquí e incluyen, pero no se limitan a hemicelulasas.

Por lo tanto, las enzimas para su uso en los procedimientos integrados de la invención pueden comprender actividad de monooxigenasa de polisacárido lítica, actividad de endoglucanasa y/o actividad de celobiohidrolasa y/o actividad de beta-glucosidasa. Las enzimas para uso en la invención pueden comprender más de una actividad enzimática por clase de actividad. Por ejemplo, las enzimas para 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.

Las enzimas para uso en los procedimientos integrados de la invención se derivan de un hongo, tal como un hongo filamentoso tal como *Rasamsonia*, tal como *Rasamsonia emersonii*. Un conjunto central de actividades enzimáticas (degradantes de la lignocelulosa) puede derivarse de *Rasamsonia emersonii*. *Rasamsonia emersonii* puede proporcionar un conjunto altamente efectivo de actividades como se demuestra aquí para la hidrólisis de material lignocelulósico. Si es necesario, el conjunto de actividades se puede complementar con actividades enzimáticas adicionales de otras fuentes. Dichas actividades adicionales pueden derivarse de fuentes clásicas y/o producirse por organismos genéticamente modificados.

Las actividades enzimáticas para uso en los procedimientos integrados de la invención pueden ser termoestables. Aquí, esto significa que la actividad tiene un óptimo de temperatura de 60 °C o mayor, 70°C o mayor, 75°C o mayor, 80°C o mayor, 85°C o mayor. Las actividades para uso en los procedimientos integrados de la invención típicamente no tendrán los mismos óptimos de temperatura, pero preferiblemente, sin embargo, serán termoestables.

Además, las actividades enzimáticas para uso en los procedimientos integrados de la invención pueden funcionar a pH bajo. Para los fines 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.

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

Las enzimas para uso en los procedimientos 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 enzimas de *Rasamsonia* adicionales.

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

- 25 Por ejemplo, las enzimas para uso en los procedimientos integrados de la invención pueden comprender una endoglucanasa (EG) de *Trichoderma*, tal como *Trichoderma reesei*; de *Humicola*, tal como una cepa de *Humicola insolens*; de *Aspergillus*, tal 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*.

- 30 Por ejemplo, las enzimas para uso en los procedimientos integrados de la invención pueden comprender una celobiohidrolasa I de *Aspergillus*, como *Aspergillus fumigatus*, tal como la Cel7A CBH I descrita en la SEC ID NO: 6 en el documento WO 2011/057140 o SEC ID NO: 6 en el documento WO 2014/130812, o de *Trichoderma*, tal como *Trichoderma reesei*.

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

- 40 Por ejemplo, las enzimas para uso en los procedimientos integrados de la invención pueden comprender un polipéptido GH61 (una monooxigenasa de polisacárido lítica) de *Thermoascus*, tal como *Thermoascus aurantiacus*, tal como la descrita en el documento WO 2005/074656 como SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 1 en el documento WO2014/130812 y en el documento WO 2010/065830; o de *Thielavia*, tal como *Thielavia terrestris*, tal como la descrita en el documento WO 2005/074647 como SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 4 en el documento WO2014/130812 y en el documento WO 2008/148131, y en el documento WO 2011/035027; o de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus fumigatus*, tal como la descrita en el documento WO 2010/138754 como SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 en el documento WO 2014/130812; o de *Penicillium*, tal como *Penicillium emersonii*, tal como la descrita como SEQ ID NO: 2 en el documento WO 2011/041397 o SEQ ID NO: 2 en el documento WO 2014/130812. Otros polipéptidos GH61 adecuados incluyen, pero no se limitan a, *Trichoderma reesei* (véase el documento WO 2007/089290), *Myceliophthora thermophila* (véase los documentos WO 2009/085935, WO 2009/085859, WO 2009/085864, WO 2009/085868), *Penicillium pinophilum* (véase el documento WO 2011/005867), *Thermoascus sp.* (véase el documento WO 2011/039319), y *Thermoascus crustaceus* (véase el documento WO 2011/041504). El polipéptido GH61 puede usarse en presencia de un catión de metal divalente activador soluble según el documento WO 2008/151043, por ejemplo sulfato de manganeso. En un aspecto, el polipéptido GH61 se usa en presencia de un compuesto dioxo, un compuesto bicíclico, un compuesto heterocíclico, un compuesto que contiene nitrógeno, un compuesto de quinona, un compuesto que contiene azufre, o un licor obtenido de un material celulósico pretratado como rastrojo de maíz pretratado.

- 55 Otras enzimas celulolíticas que pueden usarse en los procedimientos integrados de la presente invención se describen en los documentos 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 solo algunos.

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

Las enzimas para uso en los procedimientos integrados de la invención pueden comprender una, dos, tres, cuatro clases o más de celulasa, por ejemplo una, dos, tres o cuatro o la totalidad de monooxigenasas de polisacárido líticas (LPMO), una endoglucanasa (EG), una o dos exo-celobiohidrolasas (CBH) y una beta-glucosidasa (BG). Las enzimas para uso en los procedimientos integrados de la presente invención pueden comprender dos o más de cualquiera de estas clases de celulasa.

Las enzimas para uso en los procedimientos integrados de la invención pueden comprender un tipo de actividad de celulasa y/o actividad de hemicelulasa y/o actividad de pectinasa proporcionadas 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 proporcionadas por una celulasa/hemicelulasa/pectinasa adicional.

Como se usa en el presente documento, una celulasa es cualquier polipéptido que es capaz de degradar o modificar la celulosa. Un polipéptido que es capaz de degradar la celulosa es aquel que es capaz de catalizar el procedimiento de ruptura de la celulosa en unidades más pequeñas, ya sea parcialmente, por ejemplo en celodextrinas, o completamente en monómeros de glucosa. Una celulasa usada en el procedimiento de la invención puede dar lugar a una población mixta de celodextrinas y monómeros de glucosa. Dicha degradación típicamente tendrá lugar mediante una reacción de hidrólisis.

Las monooxigenasas de polisacáridos líticas (LPMO) se clasifican recientemente por CAZy en la familia AA9 (Familia de Actividad Auxiliar 9) o la familia AA10 (Familia de Actividad Auxiliar 10). Como se mencionó anteriormente, las monooxigenasas de polisacáridos líticas pueden abrir una estructura de glucano cristalino. Las monooxigenasas de polisacáridos líticas también pueden afectar a los celooligosacáridos. Las proteínas GH61 (familia de la glucósido hidrolasa 61, o algunas veces referidas a EGIV) son monooxigenasas de polisacáridos (líticas) dependientes de oxígeno (PMO/LPMO) según la bibliografía más reciente (véase Isaksen et al., Journal of Biological Chemistry, vol. 289, nº 5, p. 2632-2642). PMO y LPMO se usan aquí de manera intercambiable. A menudo, en la bibliografía, se mencionan estas proteínas para mejorar la acción de las celulasas en sustratos de lignocelulosa. GH61 se clasificó originalmente como endoglucanasa en función de la medida de la actividad muy débil de endo-1,4-β-d-glucanasa en un miembro de la familia. El término "GH61", como se usa en el presente documento, debe entenderse como una familia de enzimas, que comparten porciones de secuencia conservadas comunes y plegamiento para clasificarse en la familia 61 del sistema de clasificación CAZy GH bien establecido (<http://www.cazy.org/GH61.html>). La familia de glucósido hidrolasas 61 es un miembro de la familia de glucósido hidrolasas EC 3.2.1. GH61 recientemente ha sido reclasificada por CAZy en la familia AA9 (Familia de Actividad Auxiliar 9). GH61 se usa aquí como parte de las celulasas.

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

Como se usa aquí, una hemicelulasa es cualquier polipéptido que es capaz de degradar o modificar hemicelulosa. Es decir, una hemicelulasa puede ser capaz de degradar o modificar uno o más de xilano, glucuronoxilano, arabinoxilano, glucomanano y xiloglucano. Un polipéptido que es capaz de degradar una hemicelulosa es aquel que es capaz de

catalizar el procedimiento de ruptura de la hemicelulosa en polisacáridos más pequeños, ya sea parcialmente, por ejemplo en oligosacáridos, o completamente en monómeros de azúcar, por ejemplo monómeros de azúcar hexosa o pentosa. Una hemicelulasa puede dar lugar a una población mixta de oligosacáridos y monómeros de azúcar. Tal degradación tendrá lugar típicamente mediante una reacción de hidrólisis.

5 Como se usa aquí, una pectinasa es cualquier polipéptido que es capaz de degradar o modificar pectina. Un polipéptido que es capaz de degradar pectina es aquel que es capaz de catalizar el procedimiento de ruptura de pectina en unidades más pequeñas, ya sea parcialmente, por ejemplo en oligosacáridos, o completamente en monómeros de azúcar. Una pectinasa puede dar lugar a una población mixta de oligosacáridos y monómeros de azúcar. Tal degradación típicamente tendrá lugar mediante una reacción de hidrólisis.

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

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

20 Como se usa aquí, una endo- β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la endohidrólisis de las uniones 1,4- β -D-glucosídicas en la celulosa, β -D-glucanos de liquenina o cereal. Tal polipéptido también puede ser capaz de hidrolizar las uniones 1,4 en β -D-glucanos que contienen también uniones 1,3. Esta enzima puede denominarse también celulasa, avicelasa, β -1,4-endoglucano hidrolasa, β -1,4-glucanasa, carboximetilcelulasa, celudextrinasa, endo-1,4- β -D-glucanasa, endo-1,4- β -D-glucanohidrolasa, endo-1,4- β -glucanasa o endoglucanasa.

25 Como se usa aquí, 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. Tal polipéptido puede tener una amplia especificidad por β -D-glucósidos, y también puede hidrolizar uno o más de los siguientes: un β -D-galactósido, un α -L-arabinósido, un β -D-xilósido o un β -D-fucósido. Esta enzima puede denominarse también amigdalasa, β -D-glucósido glucohidrolasa, celobiasa o gentobiasa.

30 Como se usa aquí, una β -(1,3)(1,4)-glucanasa (EC 3.2.1.73) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de las uniones 1,4- β -D-glucosídicas en los β -D-glucanos que contienen enlaces 1,3 y 1,4. Tal polipéptido puede actuar sobre los β -D-glucanos de liquenina y cereal, pero no sobre los β -D-glucanos que contienen solo enlaces 1,3- y 1,4. Esta enzima puede denominarse también liqueninasa, 1,3-1,4- β -D-glucano 4-glucanohidrolasa, β -glucanasa, endo- β -1,3-1,4-glucanasa, liquenasa o β -glucanasa de unión mixta. Una alternativa para este tipo de enzima es EC 3.2.1.6, que se describe como endo-1,3(4)-beta-glucanasa. Este tipo de enzima hidroliza uniones 1,3 o 1,4 en beta-D-glucanasa cuando el resto de glucosa cuyo grupo reductor está implicado en la unión a hidrolizar está sustituido él mismo 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 beta-D-glucanos de laminarina, liquenina y cereal.

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

40 Como se usa aquí, una endoxilanas (EC 3.2.1.8) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la endohidrólisis de las uniones 1,4- β -D-xilosídicas en xilanos. Esta enzima puede denominarse también endo-1,4- β -xilanas o 1,4- β -D-xilano xilano hidrolasa. Una alternativa es EC 3.2.1.136, una glucuronoarabinoxilano endoxilanas, una enzima que es capaz de hidrolizar las uniones 1,4 xilosídicas en los glucuronoarabinoxilanos.

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

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

55 Como se usa aquí, una α -D-glucuronidasa (EC 3.2.1.139) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar una reacción de la siguiente forma: alfa-D-glucuronósido + H(2)O = un alcohol + D-glucuronato. Esta enzima puede

denominarse también alfa-glucuronidasa o alfa-glucosiduronasa. Estas enzimas pueden también hidrolizar el ácido glucurónico 4-O-metilado que también puede estar presente como un sustituyente en xilanos. Una alternativa es EC 3.2.1.131: xilano alfa-1,2-glucuronosidasa, que cataliza la hidrólisis de las uniones de alfa-1,2-(4-O-metil)glucuronosilo.

5 Como se usa aquí, una acetil xilano esterasa (EC 3.1.1.72) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la desacetilación de xilanos y xilo-oligosacáridos. Tal polipéptido puede catalizar la hidrólisis de los grupos acetilo a partir de xilano polimérico, xilosa acetilada, glucosa acetilada, alfa-naftil acetato o p-nitrofenil acetato, pero, típicamente, no a partir de triacetilglicerol. Tal polipéptido típicamente no actúa sobre el manano acetilado o la pectina.

10 Como se usa aquí, 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. Típicamente puede catalizar la hidrólisis del grupo 4-hidroxi-3-metoxicinamoilo (feruloilo) a partir de un azúcar esterificado, que normalmente es arabinosa en sustratos "naturales". El acetato de p-nitrofenol y ferulato de metilo típicamente son sustratos más pobres. Esta enzima también puede denominarse cinamoil éster hidrolasa, esterasa de ácido ferúlico o hidroxicinamoil esterasa. Puede denominarse también enzima auxiliar de hemicelulasa, puesto que puede ayudar a las xilanasas y pectinasas a romper hemicelulosa y pectina de la pared celular vegetal.

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

20 Como se usa aquí, 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, incluyendo oligosacáridos de galactosa, galactomananos, galactanos y arabinogalactanos. Tal polipéptido puede ser capaz también de hidrolizar α -D-fucósidos. Esta enzima puede denominarse también melibiasa.

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

30 Como se usa aquí, una β -mananasa (EC 3.2.1.78) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis aleatoria de las uniones 1,4- β -D-manosídicas en mananos, galactomananos y glucomananos. Esta enzima puede denominarse también manano endo-1,4- β -manosidasa o endo-1,4-mananasa.

Como se usa aquí, 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 puede denominarse también mananasa o manasa.

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

40 Como se usa aquí, una endo-poligalacturonasa (EC 3.2.1.15) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis aleatoria de uniones 1,4- α -D-galactosidurónicas en pectato y otros galacturonanos. Esta enzima puede denominarse también poligalacturonasa pectina despolimerasa, pectinasa, endopoligalacturonasa, pectolasa, pectina hidrolasa, pectina poligalacturonasa, poli- α -1,4-galacturónido glucanohidrolasa, endogalacturonasa; endo-D-galacturonasa o poli(1,4- α -D-galacturónido) glucanohidrolasa.

45 Como se usa aquí, una pectina 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 puede conocerse también como pectinesterasa, pectina desmetoxilasa, pectina metoxilasa, pectina metilestera, pectasa, pectinoesterasa o pectina pectilhidrolasa.

50 Como se usa aquí, una endo-galactanasa (EC 3.2.1.89) es cualquier enzima capaz de catalizar la endohidrólisis de las uniones 1,4- β -D-galactosídicas en arabinogalactanos. La enzima puede conocerse también como arabinogalactano endo-1,4- β -galactosidasa, endo-1,4- β -galactanasa, galactanasa, arabinogalactanasa o arabinogalactano 4- β -D-galactanohidrolasa.

Como se usa aquí, una pectina acetil esterasa se define aquí como cualquier enzima que tenga una actividad de acetil esterasa que cataliza la desacetilación de los grupos acetilo en los grupos hidroxilo de los restos de GalUA de la pectina.

- 5 Como se usa aquí, una endo-pectina liasa (EC 4.2.2.10) es cualquier enzima capaz de catalizar la escisión eliminativa de (1→4)- α -D-galacturonano metil éster para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi-6-O-metil- α -D-galact-4-enuronosílicos en sus extremos no reductores. La enzima puede conocerse también como pectina liasa, pectina *trans*-eliminasa; endo-pectina liasa, polimetilgalacturónico transeeliminasa, pectina metiltranseeliminasa, pectoliasa, PL, PNL o PMGL o (1→4)-6-O-metil- α -D-galacturonano liasa.
- 10 Como se usa aquí, 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-enuronosílicos en sus extremos no reductores. La enzima puede conocerse también como poligalacturónico transeeliminasa, transeeliminasa de ácido péctico, poligalacturonato liasa, endopectina metiltranseeliminasa, pectato transeeliminasa, endogalacturonato transeeliminasa, liasa de ácido péctico, liasa péctica, liasa de ácido α -1,4-D-endopoligalacturónico, PGA liasa, PPasa-N, liasa del ácido endo- α -1,4-poligalacturónico, liasa del ácido poligalacturónico, pectina *trans*-eliminasa, *trans*-eliminasa del ácido poligalacturónico o (1→4)- α -D-galacturonano liasa.
- 15 Como se usa aquí, 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, como alternativa, en ramnogalacturonanos. Esta enzima puede conocerse también como α -L-ramnosidasa T, α -L-ramnosidasa N o α -L-ramnósido ramnohidrolasa.
- 20 Como se usa aquí, la exo-galacturonasa (EC 3.2.1.82) es cualquier polipéptido capaz de hidrolizar ácido péctico a partir del extremo no reductor, liberando digalacturonato. La enzima puede conocerse también como exo-poli- α -galacturonosidasa, exopoligalacturonosidasa o exopoligalacturanosidasa.
- 25 Como se usa aquí, la 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 puede conocerse también 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 aquí, la 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 puede conocerse como pectato disacárido-liasa, pectato exo-liasa, transeeliminasa de ácido exopéctico, exopectato liasa, *trans*-eliminasa del ácido exopoligalacturónico, PATE, exo-PATE, exo-PGL o disacárido-liasa del extremo reductor de (1→4)- α -D-galacturonano.
- 35 Como se usa aquí, la ramnogalacturonano hidrolasa es cualquier polipéptido que es capaz de hidrolizar la unión entre ácido galactosilurónico y ramnopiranosilo de una manera endo en estructuras de ramnogalacturonano estrictamente alternas, que consiste en disacárido [ácido (1,2-alfa-L-ramnoil-(1,4)-alfa-galactosilurónico].
- 40 Como se usa aquí, ramnogalacturonano liasa es cualquier polipéptido que es cualquier polipéptido que es capaz de escindir las uniones α -L-Rhap-(1→4)- α -D-GalpA de una manera endo en ramnogalacturonano por beta-eliminación.
- 45 Como se usa aquí, la ramnogalacturonano acetil esterasa es cualquier polipéptido que cataliza la desacetilación de la cadena principal de restos alternos de ramnosa y ácido galacturónico en ramnogalacturonano.
- 50 Como se usa aquí, la ramnogalacturonano galacturonohidrolasa es cualquier polipéptido que es capaz de hidrolizar el ácido galacturónico del extremo no reductor de estructuras de ramnogalacturonano estrictamente alternas de una manera exo.
- Como se usa aquí, la xilogalacturonasa es cualquier polipéptido que actúa sobre xilogalacturonano por escisión de la cadena principal del ácido galacturónico sustituido con β -xilosa de una manera *endo*. Esta enzima también puede conocerse como xilogalacturonano hidrolasa.
- Como se usa aquí, una α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) es cualquier polipéptido que es capaz de actuar sobre α -L-arabinofuranósidos, α -L-arabinanos que contienen uniones (1,2) y/o (1,3) y/o (1,5), arabinoxilanos y arabinogalactanos. Esta enzima puede denominarse también α -N-arabinofuranosidasa, arabinofuranosidasa o arabinosidasa.
- Como se usa aquí, la endo-arabinanasa (EC 3.2.1.99) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la endohidrólisis de las uniones 1,5- α -arabinofuranosídicas en 1,5-arabinanos. La enzima puede conocerse también 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.
- Las enzimas para uso en los procedimientos integrados de la invención comprenderán típicamente al menos dos celulasas y opcionalmente al menos una hemicelulasa y opcionalmente al menos una pectinasa. Las enzimas para uso en los procedimientos integrados de la actual invención pueden comprender una monooxigenasa de polisacárido lítica (tal como GH61), una celobiohidrolasa, una endoglucanasa y/o una beta-glucosidasa. Tales enzimas también pueden comprender también una o más hemicelulasas y/o una o más pectinasas.

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 que integra celulosa o una proteína similar pueden estar presentes en las enzimas para uso en los procedimientos integrados de la invención (éstas se han denominado actividades auxiliares anteriormente).

5 Una "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 según EC 3.4, y son adecuadas para uso en los procedimientos de la actual invención. Algunos tipos específicos de proteasas incluyen cisteína proteasas, que incluyen pepsina, papaína, y serina proteasas, que incluyen quimiotripsinas, carboxipeptidasas y metaloendopeptidasas.

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

15 Una "ligninasa" incluye enzimas que pueden hidrolizar o romper la estructura de los polímeros de lignina. Las enzimas que pueden romper la lignina incluyen lignina peroxidasas, manganeso peroxidasas, lacasas y feruloil esterasas, y otras enzimas descritas en la técnica que se sabe que despolimerizan o rompen de otra manera los polímeros de lignina. También se incluyen enzimas capaces de hidrolizar los enlaces formados entre azúcares hemicelulósicos (en concreto arabinosa) y lignina. Las ligninasas incluyen, aunque sin limitación, el siguiente grupo de enzimas: lignina peroxidasas (EC 1.11.1.14), manganeso peroxidasas (EC 1.11.1.13), lacasas (EC 1.10.3.2) y feruloil esterasas (EC 3.1.1.73).

20 Una "hexosiltransferasa" (2.4.1.-) incluye enzimas que son capaces de catalizar una reacción de transferasa, pero que pueden catalizar también una reacción de hidrólisis, por ejemplo de celulosa y/o productos de degradación de celulosa. Un ejemplo de una hexosiltransferasa que puede usarse en la invención es una β -glucanosiltransferasa. Tal 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.

25 Una "glucuronidasa" incluye enzimas que catalizan la hidrólisis de un glucoronósido, por ejemplo β -glucuronósido, para producir un alcohol. Se han caracterizado muchas glucuronidasas, y pueden ser adecuadas para 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 uso en los procedimientos integrados de la invención pueden comprender una expansina o proteína similar a expansina, tal como swollenina (véase Salheimo et al., Eur. J. Biochem. 269, 4202-4211, 2002) o una proteína similar a swollenina.

35 Las expansinas están implicadas en la pérdida de la estructura de la pared celular durante el crecimiento celular vegetal. Las expansinas se han propuesto para alterar el enlace de hidrógeno entre la celulosa y otros polisacáridos de la pared celular sin tener actividad hidrolítica. De esta manera, se piensa que permiten el deslizamiento de las fibras de celulosa y el agrandamiento de la pared celular. La swollenina, una proteína similar a expansina, contiene un dominio de la familia del módulo de unión a carbohidrato N-terminal 1 (CBD) y un dominio similar a expansina C-terminal. Para los fines de esta invención, una proteína similar a expansina o proteína similar a swollenina puede comprender uno o
40 ambos de tales dominios y/o puede alterar la estructura de las paredes celulares (tal como alterar la estructura de la celulosa), opcionalmente sin producir cantidades detectables de azúcares reductores.

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

Las enzimas para uso en los procedimientos 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 en base a la siguiente reacción:
55 $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. La reacción se lleva a cabo en fosfato 50 mM pH 7,0 a 25°C con sustrato (H_2O_2) 10,3 mM y aproximadamente 100 unidades de enzima por ml. La absorbancia se monitoriza espectrofotométricamente en 16-24

segundos, que debería corresponder a una reducción de la absorbancia de 0,45 a 0,4. Una unidad de actividad de catalasa se puede expresar como un micromol de H₂O₂ degradado por minuto a pH 7,0 y 25°C.

5 Las enzimas para uso en los procedimientos integrados de la invención pueden estar compuestas de un miembro de cada una de las clases de enzimas mencionadas anteriormente, varios miembros de una clase de enzima, o cualquier combinación de estas clases de enzimas o proteínas auxiliares (es decir, las proteínas mencionadas en este documento que no tienen actividad enzimática per se, pero que no obstante ayudan en la degradación lignocelulósica).

10 Las enzimas para uso en los procedimientos integrados de la invención pueden estar compuestas 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 un medio, en el que las cepas segregan proteínas y enzimas al medio; (4) lisados celulares de cepas cultivadas como en (3); y/o (5) material vegetal que expresa enzimas. Pueden obtenerse diferentes enzimas a partir de diferentes fuentes.

15 Las enzimas pueden producirse ya sea exógenamente en hongos tales como levaduras, después se aíslan y añaden material lignocelulósico (pretratado). Como alternativa, la enzima se puede producir en una fermentación que usa material lignocelulósico (pretratado) (tal como rastrojo de maíz o paja de trigo) para proporcionar alimentación a un hongo que produce enzima o enzimas.

En los usos y procedimientos descritos aquí, las enzimas descritas anteriormente pueden proporcionarse simultáneamente (es decir, como una única composición de enzimas) o por separado o secuencialmente.

20 En una realización, las enzimas están 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. En una realización, el hongo filamentosos es un hongo filamentosos recombinante que comprende uno o más genes que pueden ser homólogos o heterólogos al hongo filamentosos. En una realización, el hongo filamentosos es un hongo filamentosos recombinante que comprende uno o más genes que pueden ser homólogos o heterólogos al hongo filamentosos, en el que el uno o más genes codifican enzimas que pueden degradar un sustrato celulósico. El caldo de fermentación completo puede comprender cualquiera de los polipéptidos o cualquier combinación de los mismos.

25 Preferiblemente, la composición de enzimas es un caldo de fermentación completo en el que las células se destruyen. El caldo de fermentación completo puede contener ácido o ácidos orgánicos (utilizados para destruir las células), células destruidas y/o restos celulares, y medio de cultivo.

30 Generalmente, 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 se lleva a cabo en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios de cultivo adecuados, los intervalos de temperatura y otras condiciones adecuadas para el crecimiento y la producción de celulasa y/o hemicelulasa y/o pectinasa son conocidos en la técnica. El caldo de fermentación completo se puede preparar haciendo crecer los hongos filamentosos a una fase estacionaria y manteniendo los hongos filamentosos en condiciones limitantes de carbono durante un período de tiempo suficiente para expresar la una o más celulasas y/o hemicelulasas y/o pectinasas. Una vez que las enzimas, tales como celulasas y/o hemicelulasas y/o pectinasas, son segregadas 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 no fraccionados de los materiales de fermentación derivados al final de la fermentación. Típicamente, el caldo de fermentación completo comprende el medio de cultivo gastado y los restos celulares presentes después de que los hongos filamentosos se hacen crecer hasta la saturación, incubados en condiciones limitantes de carbono para permitir la síntesis de proteínas (particularmente, la expresión de celulasas y/o hemicelulasas y/o pectinasas). En algunas realizaciones, el caldo de fermentación completo comprende el medio de cultivo celular gastado, enzimas extracelulares y hongos filamentosos. En algunas realizaciones, los hongos filamentosos presentes en el caldo de fermentación completo se pueden lisar, permeabilizar o destruir usando métodos conocidos en la técnica para producir un caldo de fermentación completo con células destruidas. En una realización, el caldo de fermentación completo es un caldo de fermentación completo con células destruidas, en el que el caldo de fermentación completo que contiene las células de hongos filamentosos se lisan o destruyen. En algunas realizaciones, las células se destruyen al lisar los hongos filamentosos mediante un tratamiento químico y/o de pH para generar el caldo completo con células destruidas de una fermentación de los hongos filamentosos. En algunas realizaciones, las células se destruyen mediante la lisis de los hongos filamentosos mediante un tratamiento químico y/o de pH y ajustando el pH de la mezcla de fermentación con células destruidas hasta un pH adecuado. En una realización, el caldo de fermentación completo comprende un primer componente de ácido orgánico que comprende al menos un ácido orgánico de 1 a 5 carbonos y/o una sal del mismo, y un segundo componente de ácido orgánico que comprende un ácido orgánico de al menos 6 o más carbonos y/o una sal del mismo. En una realización, el primer componente de ácido orgánico es ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, una sal del mismo, 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 del mismo, o cualquier combinación de los mismos.

La expresión “caldo de fermentación completo”, como se usa en el presente documento, se refiere a una preparación producida por fermentación celular que experimenta una recuperación y/o purificación mínima o nula. Por ejemplo, los caldos de fermentación completos se producen cuando los cultivos microbianos se hacen crecer hasta la saturación, incubados en condiciones limitantes de carbono para permitir la síntesis de proteínas (por ejemplo, la expresión de enzimas por las células hospedantes) y la secreción en el medio de cultivo celular. Típicamente, el caldo de fermentación completo no está fraccionado, y comprende medio de cultivo celular gastado, enzimas extracelulares y células microbianas, preferiblemente no viables.

Si es necesario, el caldo de fermentación completo se puede fraccionar, y se pueden usar el uno o más de los contenidos fraccionados. Por ejemplo, las células destruidas y/o los desechos celulares pueden eliminarse de un caldo de fermentación completo para proporcionar una composición que esté libre de estos componentes.

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

El caldo de fermentación completo como se describe en el presente documento es típicamente un líquido, pero puede contener componentes insolubles, tales como células destruidas, restos celulares, componentes de medios de cultivo y/o enzima o enzimas insolubles. En algunas realizaciones, los componentes insolubles se pueden eliminar para proporcionar un caldo de fermentación completo clarificado.

En una realización, el caldo de fermentación completo puede complementarse con una o más actividades enzimáticas que no se expresan endógenamente, o expresadas a un 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 enzima o enzimas suplementarias pueden añadirse como un suplemento al caldo de fermentación completo, y las enzimas pueden ser un componente de un caldo de fermentación completo separado, o pueden purificarse, o mínimamente recuperarse y/o purificarse.

En una realización, el caldo de fermentación completo comprende un caldo de fermentación completo de una fermentación de hongos filamentosos recombinantes que sobreexpresan 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 filamentosos no recombinante y un hongo filamentosos recombinante que sobreexpresa una o más enzimas para mejorar la degradación del sustrato celulósico. En una realización, el caldo de fermentación completo comprende un caldo de fermentación completo de una fermentación de hongos filamentosos que sobreexpresan beta-glucosidasa. Alternativamente, el caldo de fermentación completo para uso en los presentes métodos y composiciones reactivas puede comprender una mezcla de un caldo de fermentación completo de una fermentación de un hongo filamentosos no recombinante y un caldo de fermentación completo de una fermentación de un hongo filamentosos recombinante que sobreexpresa 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 iguales o diferentes. Además, como se describió anteriormente, se añaden enzimas adicionales durante la etapa de licuefacción y la etapa de sacarificación de los procedimientos 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 pueden diferir o pueden ser las mismas que las enzimas adicionales añadidas durante la etapa de sacarificación de los procedimientos integrados según la presente invención.

El material lignocelulósico como se usa aquí incluye material lignocelulósico y hemicelulósico. El material lignocelulósico adecuado para uso en los procedimientos de la actual invención incluye biomasa, por ejemplo biomasa virgen y/o biomasa no virgen tal como biomasa agrícola, materia orgánica comercial, restos de construcción y demolición, restos sólidos urbanos, papel residual y restos de jardín. Las formas habituales de biomasa incluyen árboles, arbustos y céspedes, trigo, paja de trigo, caña de azúcar, paja de caña, bagazo de caña de azúcar, pasto varilla, miscanto, caña de energía, maíz, rastrojo de maíz, cascarillas de maíz, mazorcas de maíz, tallos de cáñola, tallos de semilla de soja, sorgo dulce, granos de maíz, incluyendo fibras de los granos, productos y subproductos de molienda de granos tales como maíz, trigo y cebada (incluyendo molienda en húmedo y molienda en seco) a menudo denominados “salvado o fibra”, así como restos sólidos urbanos, papel residual y restos de jardín. La biomasa puede ser también, aunque sin limitación, material herbáceo, restos agrícolas, restos forestales, restos sólidos urbanos, papel residual, y restos de pasta papelera y molienda de papel. La “biomasa agrícola” incluye ramas, arbustos, cañas, maíz y cascarillas de maíz, cultivos energéticos, arbolados, frutas, flores, granos, pastos, cultivos herbáceos, hojas, corteza, agujas, troncos, raíces, árboles jóvenes, cultivos madereros de rotación corta, arbustos, pasto varilla, árboles, hortalizas, mondaduras de frutas, vides, pasta de remolacha azucarera, afrechillo de trigo, cascarillas de avena, y maderas duras y blandas (sin incluir maderas con materiales perjudiciales). Además, la biomasa agrícola incluye materiales residuales orgánicos generados a partir de procedimientos agrícolas incluyendo actividades agrícolas y forestales, incluyendo específicamente restos de madera forestal. La biomasa agrícola puede ser cualquiera de los mencionados anteriormente de forma individual o 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.

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 centenares a más de diez mil unidades de D-glucosa enlazadas $\beta(1\rightarrow4)$. Una molécula de glucano es un polisacárido de monómeros de D-glucosa enlazados por enlaces glucosídicos. Aquí, el glucano y la celulosa se usan indistintamente para un polisacárido de monómeros de D-glucosa enlazados por enlaces glucosídicos. Los métodos para el análisis cuantitativo de composiciones de glucano o polisacárido son bien conocidos y se describen en la técnica, y, por ejemplo, se resumen 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.

El material lignocelulósico puede tratarse previamente antes y/o durante la hidrólisis enzimática. Los métodos de pretratamiento son conocidos en la técnica, e incluyen, pero sin limitarse a, calor, modificación mecánica, química, modificación biológica, y cualquier combinación de los mismos. El pretratamiento se realiza típicamente para mejorar 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 sin limitarse a, tratamiento con vapor (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, a 120-200°C, a una presión de 2-15 bares, a pH ácido, durante 2-30 minutos), tratamiento con organosolv (por ejemplo, tratamiento con 1 - 1,5% de H_2SO_4 en presencia de disolvente orgánico y vapor, 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 a 60-160°C, a una presión de 1-10 bares, a pH alcalino, durante 60-4800 minutos), tratamiento 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 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).

El material lignocelulósico puede lavarse. El material lignocelulósico puede lavarse antes y/o después del pretratamiento. La etapa de lavado puede realizarse 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, la fracción sólida obtenida después de la separación sólido/líquido puede lavarse. La etapa de lavado puede usarse para eliminar compuestos solubles en agua que pueden actuar como inhibidores para la etapa de fermentación y/o hidrólisis. La etapa de lavado se puede llevar a cabo de manera conocida por la persona experta. Junto al lavado, existen otros métodos de desintoxicación. El material lignocelulósico pretratado también se puede desintoxicar mediante cualquiera (o cualquier combinación) de estos métodos, que incluyen, pero sin limitarse a, separación sólido/líquido, evaporación a vacío, extracción, adsorción, neutralización, sobrecarga, adición de agentes reductores, adición de enzimas desintoxicantes como lacasas o peroxidases, adición de microorganismos capaces de desintoxicar hidrolizados.

Las enzimas usadas en los procedimientos integrados de la invención pueden hidrolizar de forma extremadamente eficaz el material lignocelulolítico, por ejemplo rastrojo de maíz, paja de trigo, paja de caña, y/o bagazo de caña de azúcar, que después puede convertirse adicionalmente en un producto, tal como etanol, biogás, butanol, un plástico, un ácido orgánico tal como ácido succínico, un disolvente, un complemento para pienso animal, un producto farmacéutico, una vitamina, un aminoácido, una enzima o una materia prima química. Adicionalmente, los productos intermedios a partir de un procedimiento después de la hidrólisis, por ejemplo ácido láctico como intermedio en la producción de biogás, pueden usarse como bloque constructor para otros materiales. La presente invención se ejemplifica con la producción de etanol y ácido succínico, pero esto se hace como ejemplificación solamente en lugar de como limitación, los otros productos mencionados pueden producirse igualmente bien.

La cantidad de enzima añadida (denominada también aquí dosificación de enzima o carga de enzima) es baja. En una realización, la cantidad de enzima es 10 mg de proteína/g de materia seca en peso o menor, la cantidad de enzima es 9 mg de proteína/g de materia seca en peso o menor, la cantidad de enzima es 8 mg de proteína/g de materia seca en peso o menor, la cantidad de enzima es 7 mg de proteína/g de materia seca en peso o menor, la cantidad de enzima es 6 mg de proteína/g de materia seca en peso o menor, 5 mg de proteína/g de materia seca o menor, 4 mg de proteína/g de materia seca o menor, 3 mg de proteína/g de materia seca o menor, 2 mg de proteína/g de materia seca o menor o 1 mg de proteína/g de materia seca o menor (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 menor, la cantidad de enzima es 4 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, la cantidad de enzima es 3 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, la cantidad de enzima es 2 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, la cantidad de enzima es 1 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, la cantidad de enzima es 0,5 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,4 mg de composición de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,3 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,25 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,20 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,18 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,15 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor o 0,10 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor (expresada como el total de enzimas de celulasa en mg de enzima/g de materia seca). Es posible una dosificación de enzima baja 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 solamente una de las etapas, o antes y/o durante ambas etapas.

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

En una realización, la etapa de hidrólisis se realiza hasta que se libera el 70% o más, el 80% o más, el 85% o más, el 90% o más, el 92% o más, el 95% o más del azúcar disponible en el material lignocelulósico.

10 Significativamente, un procedimiento de la invención puede realizarse 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 mayor, 6% en peso o mayor, 7% en peso o mayor, 8% en peso o mayor, 9% en peso o mayor, 10% en peso o mayor, 11% en peso o mayor, 12% en peso o mayor, 13% en peso o mayor, 14% en peso o mayor, 15% en peso o mayor, 16% en peso o mayor, 17% en peso o mayor, 18% en peso o mayor, 19% en peso o mayor, 20% en peso o mayor, 21% en peso o mayor, 22% en peso o mayor, 23% en peso o mayor, 24% en peso o mayor, 25% en peso o mayor, 26% en peso o mayor, 27% en peso o mayor, 28% en peso o mayor, 29% en peso o mayor, 30% en peso o mayor, 31% en peso o mayor, 32% en peso o mayor, 33% en peso o mayor, 34% en peso o mayor, 35% en peso o mayor, 36% en peso o mayor, 37% en peso o mayor, 38% en peso o mayor o 39% en peso o mayor. En una realización, el contenido de materia seca al final de la hidrólisis enzimática está 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.

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

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

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.

5 En una realización, las etapas de fermentación en los procedimientos integrados según la presente invención se realizan en uno o más recipientes. En una realización, la fermentación de la fracción líquida por un microorganismo productor de alcohol para producir alcohol se realiza en uno o más recipientes. En una realización, la fermentación de la fracción líquida por un microorganismo productor de ácido orgánico para producir un ácido orgánico se realiza en uno o más recipientes. La fermentación de la fracción sólida y/o la fracción líquida por un microorganismo productor de alcohol para producir alcohol puede realizarse en el mismo recipiente o recipientes en los que se realiza la hidrólisis enzimática. La fermentación de la fracción sólida y la fracción líquida por un microorganismo productor de alcohol para producir alcohol y la fermentación de la fracción líquida y la fracción sólida por un microorganismo productor de ácido orgánico para producir un ácido orgánico se pueden realizar en uno o más recipientes separados, pero también se pueden realizar en uno o más de los mismos recipientes.

15 En una realización, el microorganismo productor de alcohol puede fermentar al menos un azúcar de C5 y al menos un azúcar de C6. En una realización, el microorganismo productor de ácido orgánico puede fermentar al menos un azúcar de C6. En una realización, el microorganismo productor de alcohol y el microorganismo productor de ácido orgánico son microorganismos diferentes. En otra realización, el microorganismo productor de alcohol y el microorganismo productor de ácido orgánico son el mismo microorganismo, es decir, el microorganismo productor de alcohol también puede producir ácido orgánico tal como ácido succínico. En una realización, el microorganismo productor de alcohol y/o el microorganismo productor de ácido orgánico es una levadura.

20 La invención como se refiere en las reivindicaciones incluye así procedimientos de fermentación en los que se usa un microorganismo para la fermentación de una fuente de carbono que comprende un azúcar o azúcares, por ejemplo glucosa, L-arabinosa y/o xilosa. La fuente de carbono puede incluir cualquier oligo- o polímero de hidrato de carbono que comprenda unidades de L-arabinosa, xilosa o glucosa, tal como, por ejemplo, lignocelulosa, xilanos, celulosa, almidón, arabinano y similares. Para la liberación de las unidades de xilosa o glucosa de tales hidratos de carbono, pueden añadirse carbohidrasas apropiadas (tales como xilanasas, glucanasas, amilasas y similares) al medio de fermentación, o pueden producirse por la célula hospedante modificada. En el último caso, la célula hospedante modificada puede modificarse genéticamente para producir y segregar tales carbohidrasas. Una ventaja adicional de usar fuentes oligo- o poliméricas de glucosa es que posibilita mantener una baja o menor concentración de glucosa libre durante la fermentación, por ejemplo usando cantidades limitantes de velocidad de las carbohidrasas. Esto, a su vez, evitará la represión de los sistemas requeridos para el metabolismo y transporte de azúcares distintos de glucosa tales como xilosa. En un procedimiento preferido, la célula hospedante modificada fermenta tanto L-arabinosa (opcionalmente xilosa) como glucosa, preferiblemente simultáneamente, en cuyo caso se usa preferiblemente una célula hospedante modificada que es insensible a la represión de glucosa para evitar el crecimiento diáxico. Además de una fuente de L-arabinosa, opcionalmente xilosa (y glucosa) como fuente de carbono, el medio de fermentación comprenderá adicionalmente el ingrediente apropiado requerido para el crecimiento de la célula hospedante modificada. Las composiciones de los medios de fermentación para el crecimiento de microorganismos tales como levaduras u hongos filamentosos se conocen bien en la técnica.

30 El tiempo de fermentación puede ser más corto que en la fermentación convencional en las mismas condiciones, en la que parte de la hidrólisis enzimática aún tiene que tener lugar durante la fermentación. En una realización, el tiempo de fermentación es 100 horas o menos, 90 horas o menos, 80 horas o menos, 70 horas o menos o 60 horas o menos, para una composición de azúcar de 50 g/l de glucosa y otros azúcares correspondientes de la materia prima lignocelulósica (por ejemplo 50 g/l de xilosa, 35 g/l de L-arabinosa y 10 g/l de galactosa). Para composiciones de azúcar más diluidas, el tiempo de fermentación puede reducirse correspondientemente. En una realización, el tiempo de fermentación de la etapa de producción de etanol está entre 10 y 50 horas para etanol obtenido a partir de azúcares de C6, y entre 20 y 100 horas para etanol obtenido de azúcares de C5. En una realización, el tiempo de fermentación de la etapa de producción de ácido succínico está entre 20 y 70 horas.

40 El procedimiento de fermentación puede ser un procedimiento de fermentación aerobio o anaerobio. Un procedimiento de fermentación anaerobio se define aquí como un procedimiento de fermentación realizado en ausencia de oxígeno o en el que no se consume sustancialmente oxígeno, preferiblemente se consume menos de 5, 2,5 o 1 mmol/l/h, más preferiblemente se consume 0 mmol/l/h (es decir, el consumo de oxígeno no es detectable), y en el que las moléculas orgánicas sirven tanto como dadores de electrones y como aceptores de electrones. En ausencia de oxígeno, el NADH producido en la glucólisis y formación de biomasa, no puede oxidarse por fosforilación oxidativa. Para resolver este problema, muchos microorganismos usan piruvato o uno de sus derivados como un aceptor de electrones e hidrógeno, regenerando de esta manera el NAD⁺. De esta manera, en un procedimiento de fermentación anaerobio preferido, se usa piruvato como un aceptor de electrones (y de hidrógeno), y se reduce a productos de fermentación tales como etanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico, un aminoácido, 1,3-propano-diol, etileno, glicerol, butanol, antibióticos de β-lactama y una cefalosporina. En una realización preferida, el procedimiento de fermentación es anaerobio. Un procedimiento anaerobio es ventajoso puesto que es más barato que los procedimientos aerobios: se necesita un equipo menos especial. Adicionalmente, se espera que los procedimientos anaerobios den un mayor rendimiento de producto que los procedimientos aerobios. En condiciones aerobias, normalmente el rendimiento de biomasa es mayor que en

condiciones anaerobias. En consecuencia, normalmente en condiciones aerobias, el rendimiento de producto esperado es menor que en condiciones anaerobias.

El procedimiento de fermentación puede ser también en condiciones limitadas de oxígeno. Más preferiblemente, el procedimiento de fermentación es aerobio y en condiciones limitadas de oxígeno. Un procedimiento de fermentación limitado en oxígeno es un procedimiento en el que el consumo de oxígeno está limitado por la transferencia de oxígeno del gas al líquido. El grado de limitación de oxígeno está determinado por la cantidad y composición del flujo de gas entrante así como por las propiedades reales de mezcla/transferencia de masa del equipo de fermentación usado. Preferiblemente, en un procedimiento en condiciones limitadas de oxígeno, la velocidad de consumo de oxígeno es al menos 5,5, más preferiblemente al menos 6, y aún más preferiblemente al menos 7 mmol/l/h.

El procedimiento de fermentación del alcohol puede ser anaerobio, mientras que el procedimiento de fermentación del ácido orgánico es aerobio, pero realizado en condiciones limitadas de oxígeno. El procedimiento de fermentación preferiblemente se realiza a una temperatura que es óptima para la célula modificada. De esta manera, para la mayoría de levaduras o células fúngicas, el procedimiento de fermentación se realiza a una temperatura que es menor que 42°C, preferiblemente 38°C o menor. Para levaduras o células hospedantes fúngicas filamentosas, el procedimiento de fermentación preferiblemente se realiza a una temperatura que es menor que 35, 33, 30 o 28°C, y a una temperatura que es mayor que 20, 22, o 25°C. En una realización, la etapa de fermentación del alcohol y la etapa de fermentación del ácido orgánico se llevan a cabo entre 25°C y 35°C.

Las fermentaciones se realizan con un microorganismo fermentador. En una realización de la invención, las fermentaciones de azúcares de C5 con alcohol (por ejemplo etanol) se llevan a cabo con un microorganismo fermentador de C5. Las fermentaciones de azúcares de C6 con alcohol (por ejemplo etanol) pueden realizarse con un microorganismo fermentador de C5 o un microorganismo fermentador de C6 comercial. Las levaduras disponibles comercialmente adecuadas para la producción de etanol incluyen, pero sin limitarse a, BIOFERM™ AFT y XR (NABC-North American Bioproducts Corporation, GA, USA), levadura ETHANOL RED™ (Fermentis/Lesaffre, USA), FALI™ (Fleischmann's Yeast, USA), FERMIOL™ (DSM Specialties), GERT STRAND™ (Gert Strand AB, Sweden), y levadura reciente SUPERSTART™ y THERMOSACC™ (Ethanol Technology, WI, USA). Las fermentaciones pueden realizarse en uno o más recipientes. Las fermentaciones pueden realizarse en el uno o más recipientes de fermentación. La propagación del microorganismo productor de alcohol y/o el microorganismo productor de ácido orgánico por fermentación de la fracción líquida y/o la fracción sólida puede realizarse en uno o más recipientes de propagación. Después de la propagación, el microorganismo productor de alcohol y/o el microorganismo productor de ácido orgánico se pueden añadir a uno o más recipientes de fermentación. Alternativamente, la propagación del microorganismo productor de alcohol y/o el microorganismo productor de ácido orgánico se combina con la fermentación de la fracción líquida y/o la fracción sólida por el microorganismo productor de alcohol y/o el microorganismo productor de ácido orgánico para producir alcohol y/o ácido orgánico, respectivamente.

En una realización, el microorganismo productor de alcohol es un microorganismo que puede fermentar al menos un azúcar de C5. Preferiblemente, también es capaz de fermentar al menos un azúcar de C6. En una realización, la invención se refiere a un procedimiento integrado que comprende la producción de etanol, en el que el procedimiento comprende la etapa de fermentar un medio que contiene azúcar o azúcares con un microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar de C5.

En una realización, el microorganismo productor de ácido orgánico es un microorganismo que puede fermentar al menos un azúcar de C6. En una realización, la invención se refiere a un procedimiento integrado para la producción de ácido succínico, en el que el procedimiento comprende la etapa de fermentar un medio que contiene azúcar o azúcares con un microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar de C6.

Los microorganismos productores de alcohol pueden ser un organismo procarionta o eucariota. El microorganismo utilizado en el procedimiento puede ser un microorganismo genéticamente modificado. Ejemplos de organismos productores de alcohol adecuados son las 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 puede fermentar al menos un azúcar de C5 es una levadura. En una realización, la levadura pertenece al género *Saccharomyces*, preferiblemente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada en los procedimientos según la presente invención es capaz de convertir azúcares de hexosa (C6) y azúcares de pentosa (C5). La levadura, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada en los procedimientos según la presente invención puede fermentar anaeróticamente al menos un azúcar de C6 y al menos un azúcar de 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. Se pueden producir organismos, por ejemplo cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, capaces de producir etanol a partir de L-arabinosa modificando una levadura hospedante que introduce los genes *araA* (L-arabinosa isomerasa), *araB* (L-ribuloglioxalato) y *araD* (L-ribulosa-5-P4-epimerasa) de una fuente adecuada. Dichos genes pueden

introducirse en una célula hospedante para que sea capaz de usar arabinosa. Tal enfoque se describe en el documento WO2003/095627. Pueden usarse los genes *araA*, *araB* y *araD* de *Lactobacillus plantarum*, y se describen en el documento WO2008/041840. Pueden usarse el gen *araA* de *Bacillus subtilis* y los genes *araB* y *araD* de *Escherichia coli*, y se describen en el documento 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 aureescens* y/o *Gramella forsetii*, como se describe en el documento WO 2009011591. La levadura también puede comprender una o más copias del gen de 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. Ejemplos de modificaciones genéticas son la introducción de uno o más genes *xylA*, genes *XYL1* y genes *XYL2* y/o genes *XKS1*; supresión del gen de la aldosa reductasa (*GRE3*); sobreexpresión de los genes de PPP *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* y *RK11* para permitir el aumento del flujo a través de la ruta de fosfato de pentosa en la célula. Ejemplos de levadura genéticamente modificada se describen en los documentos 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.

El procedimiento de fermentación para la producción de etanol puede ser anaeróbico. Anaeróbico ya se ha definido anteriormente en este documento. En otra realización preferida, el procedimiento de fermentación para la producción de etanol es aeróbico. El procedimiento de fermentación para la producción de etanol puede realizarse bajo condiciones limitadas de oxígeno, más preferiblemente aeróbico y bajo condiciones limitadas de oxígeno. Las condiciones limitadas de oxígeno ya se han definido anteriormente en este documento.

La productividad volumétrica de etanol es preferiblemente al menos 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 5,0 o 10,0 g de etanol por litro por hora. El rendimiento de etanol en L-arabinosa y opcionalmente xilosa y/o glucosa en el procedimiento preferiblemente es al menos 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 98%. El rendimiento de etanol se define aquí como un porcentaje del rendimiento máximo teórico que, para glucosa y L-arabinosa y opcionalmente xilosa, es 0,51 g de etanol por g de glucosa o xilosa.

En un aspecto, el procedimiento de fermentación que conduce a la producción de etanol tiene varias ventajas en comparación con los procedimientos de fermentación de etanol conocidos: son posibles procedimientos anaeróbicos; son posibles condiciones limitadas de oxígeno; se pueden obtener mayores rendimientos de etanol y tasas de producción de etanol; la cepa utilizada puede usar L-arabinosa y opcionalmente xilosa.

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

Los microorganismos productores de ácido orgánico pueden ser un organismo procariota o eucariota. El microorganismo utilizado en el procedimiento puede ser un microorganismo genéticamente modificado. Ejemplos de organismos productores de ácido orgánico adecuados son las levaduras, por ejemplo *Saccharomyces*, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*; hongos, por ejemplo cepas de *Aspergillus*, tales como *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus*, *Byssochlamys nivea*, *Lentinus degener*, *Paecilomyces varioti* y *Penicillium viniferum*; y bacterias, por ejemplo *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Mannhei succiniciproducens* MBEL 55E, *Escherichia coli*, *Propionibacterium* species, *Pectinatus* sp., *Bacteroides* sp., tales como *Bacteroides amylophilus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Prevotella ruminicola*, *Succinimonas amylolytica*, *Succinivibrio dextrinisolvans*, *Wolinella succinogenes*, y *Cytophaga succinicans*. En una realización, el microorganismo productor de ácido orgánico que es capaz de fermentar al menos un azúcar de C6 es una levadura. La levadura puede pertenecer al género *Saccharomyces*, preferiblemente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada en la producción de ácido orgánico según la presente invención es capaz de convertir azúcares de hexosa (C6). La levadura, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada en los procedimientos según la presente invención puede fermentar anaeróticamente al menos un azúcar de C6.

Los procedimientos de fermentación pueden llevarse a cabo sin ningún requisito para ajustar el pH durante los procedimientos. Es decir, los procedimientos son los que pueden llevarse a cabo sin la adición de ningún ácido o ácidos o base o bases. Sin embargo, esto excluye una etapa de pretratamiento, en la que se puede añadir ácido. El punto es que las enzimas utilizadas en los procedimientos de la invención son capaces de actuar a pH bajo y, por lo tanto, no hay necesidad de ajustar el pH del ácido de una materia prima pretratada con ácido para que pueda tener lugar la hidrólisis. Por consiguiente, los procedimientos de la invención pueden ser procedimientos de cero desperdicios que usan solo productos orgánicos sin requisito de aporte químico inorgánico.

El tiempo de reacción global (o el tiempo de reacción de la etapa de hidrólisis y la etapa de fermentación juntas) puede reducirse. En una realización, el tiempo de reacción global es 300 horas o menos, 200 horas o menos, 150 horas o menos, 140 horas o menos, 130 o menos, 120 horas o menos, 110 horas o menos, 100 horas o menos, 90 horas o menos, 80 horas o menos, 75 horas o menos, o aproximadamente 72 horas con un rendimiento de glucosa del 90%.

5 En consecuencia, se pueden alcanzar tiempos de reacción globales más bajos con un rendimiento de glucosa más bajo.

Otros productos de fermentación, además de alcoholes y ácidos orgánicos, que pueden producirse mediante los procedimientos integrados de la invención pueden ser cualquier sustancia derivada de la fermentación. Incluyen, pero sin limitarse a, alcohol (tales como arabinol, butanol, etanol, glicerol, metanol, 1,3-propanodiol, sorbitol y xilitol); ácido orgánico (tales 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 (tal 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 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 alimenticio para animales, una sustancia química 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 oxidoreductasa, una transferasa o una xilanas. En una realización preferida, el ácido orgánico es ácido succínico, y/o el alcohol es etanol.

En una realización, se recuperan el alcohol, el ácido orgánico, las enzimas, el hongo productor de enzimas, el microorganismo productor de alcohol y/o el microorganismo productor de ácido orgánico. Los procedimientos integrados según la invención comprenden la recuperación de todo tipo de productos obtenidos durante los procedimientos integrados, incluyendo productos de fermentación tales como etanol y ácido succínico. Un producto de fermentación puede separarse del caldo de fermentación de manera conocida por la persona experta. 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, la persona experta podrá seleccionar una técnica de separación adecuada. Por ejemplo, el etanol puede separarse de un caldo de fermentación de levadura mediante destilación, por ejemplo destilación al vapor/destilación a vacío de manera convencional.

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

La fracción sólida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente, los desechos obtenidos después de la purificación/recuperación del ácido orgánico y/o los sólidos obtenidos después de la destilación/recuperación del etanol pueden usarse en la producción de electricidad. La electricidad se puede obtener por incineración de cualquiera de los materiales mencionados anteriormente. La electricidad se puede usar en cualquiera de las etapas de los procedimientos integrados según la presente invención.

Los efectos beneficiosos de la presente invención se encuentran para varios materiales lignocelulósicos y, por lo tanto, se cree que están presentes para la hidrólisis de todo tipo de materiales lignocelulósicos. Estos efectos beneficiosos de la presente invención se encuentran para varias enzimas y, por lo tanto, se cree que están presentes para todo tipo de composiciones de enzimas hidrolizantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Procedimiento integrado para la producción de alcohol y ácido orgánico a partir de material lignocelulósico

45 Un único lote de material lignocelulósico pretratado se separó por centrifugación en una fracción sólida y una fracción líquida. La fracción sólida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico pretratado se lavó para obtener una pasta rica en celulosa.

Parte de la pasta fue sometida a hidrólisis enzimática. En este caso, se hidrolizaron 64 kg de pasta de materia seca en una vasija agitada de 400 litros mediante la adición a 254 litros de una composición acuosa que contenía enzimas celulolíticas de *Rasamsonia* (que estaba a una temperatura de 62°C). La primera dosis de pasta dio como resultado 10% p/p de materia seca de pH 4,2, que fue licuada por las enzimas en 3 horas. A partir de ese momento, se añadieron porciones de 5 kg de pasta de materia seca cada hora hasta obtener 350 kg de puré, mientras que el pH se ajustó a 4,2 con una disolución de amoníaco al 10%. La hidrólisis continuó mientras se agitaba a 62°C durante otros 4 días, y dio como resultado un hidrolizado rico en glucosa.

55 El hidrolizado se centrifugó 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 contenía glucosa a una concentración de aproximadamente 450 g/kg.

5 Parte de la fracción líquida concentrada se usó para la propagación de levadura sobreproductora de ácido succínico genéticamente modificada del género *Saccharomyces cerevisae*. El medio para la propagación de la levadura se basó en el medio de glucosa Verduyn y contenía 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 el medio Verduyn, véase Yeast 8, (1992), páginas 201-517). La propagación se realizó durante 68 horas en una vasija agitada a 30°C con agitación continua.

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

15 Otra parte de la fracción líquida concentrada se usó para la propagación de un microorganismo productor de enzimas y la producción de enzimas por el microorganismo productor de enzimas. Un fermentador que contenía medio mineral con 20 g/kg de concentrado y 40 g/kg de pasta de materia seca sólida se inoculó con el hongo *Rasamsonia emersonii*. Durante la primera fase del procedimiento de fermentación, también llamada fase de crecimiento o fase de propagación, la biomasa fúngica aumenta sin la producción de proteínas. En la segunda fase del procedimiento de fermentación, también llamada fase de producción de enzimas, se producen enzimas. La fermentación se realizó en condiciones aeróbicas 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 de 65 g/kg de sobrenadante. El sobrenadante obtenido mostró actividad celulolítica.

20 Una parte de la fracción líquida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico pretratado se mezcló con una parte de la fracción líquida concentrada para obtener una mezcla fermentable. Esta mezcla se fermentó con la cepa RN1016 de *Saccharomyces cerevisae* fermentadora de pentosa, y produjo 5,1% p/p de etanol después de la fermentación durante 48 horas a pH 5,5.

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

Ejemplo 2

30 Procedimiento integrado para la producción de alcohol a partir de material lignocelulósico

Un único lote de material lignocelulósico pretratado se separó por centrifugación en una fracción sólida y una fracción líquida. La fracción líquida se almacenó a 4°C hasta su uso en la producción de etanol (véase más abajo). La fracción sólida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico pretratado se lavó para obtener una pasta rica en celulosa.

35 Parte de la pasta fue sometida a hidrólisis enzimática. En este caso, se hidrolizaron 64 kg de pasta de materia seca en una vasija agitada de 400 litros mediante la adición a 254 litros de una composición acuosa que contenía enzimas celulolíticas de *Rasamsonia* (que estaba a una temperatura de 62°C). La primera dosis de pasta dio como resultado 10% p/p de materia seca de pH 4,2, que fue licuada por las enzimas en 3 horas. A partir de ese momento, se añadieron porciones de 5 kg de pasta de materia seca cada hora hasta obtener 350 kg de puré, mientras que el pH se ajustó a 4,2 con una disolución de amoníaco al 10%. La hidrólisis continuó mientras se agitaba a 62°C durante otros 4 días, y dio como resultado un hidrolizado rico en glucosa.

40 El hidrolizado rico en glucosa se centrifugó 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 contenía glucosa a una concentración de aproximadamente 450 g/kg.

45 La fracción líquida obtenida después del pretratamiento del material lignocelulósico se dividió en cuatro porciones iguales. La primera porción se mantuvo como está (porción no diluida) y se fermentó como tal. La segunda porción se diluyó al 70% p/p de su concentración original con agua, y se fermentó. La tercera porción se diluyó al 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 al 70% p/p con 20% p/p de fracción líquida concentrada y al 10% p/p de agua, y se fermentó.

50 Las porciones se fermentaron con la cepa RN1016 de *Saccharomyces cerevisae* fermentadora de pentosa durante 48 horas a pH 5,5 para producir etanol, y la concentración de etanol se midió usando HPLC. La concentración de etanol medida se expresa como % p/p de material fermentado al final de la fermentación. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

5 La Tabla 1 muestra que la dilución de 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 mayores 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 solo con agua.

Ejemplo 3

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

10 El ejemplo se realiza esencialmente como se describe en el Ejemplo 2, con la condición de que la dilución no se realice 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 están atrapados en la fracción de azúcar insoluble restante y la lignina presente en la fracción sólida.

15 La fracción líquida se diluye al 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

Procedimiento integrado para la producción de enzimas por un microorganismo productor de enzimas

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

Parte de los sólidos se utilizó como sustrato (llamado 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 (llamada sustrato B) se lavó con agua y se usó para inducir la producción de enzimas.

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

30 La fracción líquida concentrada se usó como fuente de carbono en dos procedimientos de producción de enzimas en el hongo *Rasamsonia*. En un procedimiento, el sustrato A se usó como inductor de producción de enzimas, mientras que en el otro procedimiento, el sustrato B se usó como inductor de producción de enzimas. Los procedimientos de producción consistieron en una fase de crecimiento y una fase de producción de enzimas. Al final de la fase de producción de enzimas, la cantidad de enzima presente en la fracción líquida del caldo de fermentación se determinó utilizando un ensayo estándar de determinación de proteínas y mostró un nivel comparable (50 +/- 5 g/l), lo que demuestra que tanto la fracción sólida obtenida después de la separación sólido/líquido del material lignocelulósico pretratado como tal y la fracción sólida obtenida después de la separación sólido/líquido de un hidrolizado enzimático pueden usarse como inductores en la producción de enzimas.

Tabla 1: Producción de etanol después de una fermentación de 48 horas de porciones diluidas y sin diluir.

	Concentración de etanol (en % p/p)
Porción 1 (sin diluir)	1,2
Porción 2 (diluido al 70% con agua)	2,0
Porción 3 (diluido al 70% con 13% de fracción líquida concentrada y 17% de agua)	4,5
Porción 4 (diluido al 70% con 20% de fracción líquida concentrada y 10% de agua)	5,3

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento integrado para la producción de alcohol y la producción de ácido orgánico a partir de material lignocelulósico, en el que el procedimiento comprende:
- 5 - hidrólisis enzimática del material lignocelulósico para obtener material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente,
 - separación sólido/líquido del material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente para obtener una fracción sólida y una fracción líquida, en el que la fracción líquida:
 - 10 o se fermenta mediante un microorganismo productor de alcohol para la propagación del microorganismo productor de alcohol,
 - o se fermenta mediante un microorganismo productor de ácido orgánico para la propagación del microorganismo productor de ácido orgánico,
 - o se fermenta mediante el microorganismo productor de alcohol para producir alcohol,
 - o se fermenta mediante el microorganismo productor de ácido orgánico para producir un ácido orgánico, y
 - 15 - propagación de un hongo y producción de enzimas por el hongo, en el que las enzimas producidas por el hongo se usan en la hidrólisis enzimática.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que una parte del material lignocelulósico hidrolizado enzimáticamente y una parte del material lignocelulósico se usa en la propagación del hongo y/o la producción de enzimas por el hongo.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la fracción sólida comprende entre 3 y 97% en peso de azúcares de C5.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la fracción líquida comprende entre 1 y 97% en peso de azúcares de C6.
- 25 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la hidrólisis enzimática comprende al menos:
 - una etapa de licuefacción en la que el material lignocelulósico se hidroliza en al menos un primer recipiente, y
 - una etapa de sacarificación en la que el material lignocelulósico licuado se hidroliza en el al menos primer recipiente y/o en al menos un segundo recipiente.
- 30 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se recuperan el alcohol, el ácido orgánico, las enzimas, el hongo, el microorganismo productor de alcohol y/o el microorganismo productor de ácido orgánico.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el material lignocelulósico se somete a al menos una separación sólido/líquido antes de la hidrólisis enzimática.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que se añade oxígeno durante la hidrólisis enzimática.
- 35 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el hongo es *Rasamsonia*.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que las enzimas están en forma de un caldo de fermentación completo.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el microorganismo productor de alcohol puede fermentar al menos un azúcar de C5 y al menos un azúcar de C6.
- 40 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el microorganismo productor de ácido orgánico puede fermentar al menos un azúcar de C6.
13. Procedimiento según la reivindicación 11 o 12, en el que el microorganismo productor de alcohol y/o el microorganismo productor de ácido orgánico es una levadura.
- 45 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el contenido de materia seca al final de la hidrólisis enzimática es 5% en peso o mayor.
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el ácido orgánico es ácido succínico, y/o el alcohol es etanol.