

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 953**

51 Int. Cl.:

C12P 1/00 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2013 PCT/EP2013/073255**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14072395**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2013 E 13789275 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 2917354**

54 Título: **Proceso para hidrólisis enzimática de material lignocelulósico usando GH61, adición de oxígeno y alto contenido de materia seca**

30 Prioridad:

09.11.2012 EP 12191957

02.07.2013 EP 13174656

11.07.2013 EP 13176083

15.07.2013 EP 13176500

17.09.2013 EP 13184702

17.09.2013 EP 13184701

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.07.2020

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

Het Overloon 1

6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

BERKHOUT, MICHAEL PETRUS JOZEF y

NOORDAM, BERTUS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 773 953 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso para hidrólisis enzimática de material lignocelulósico usando GH61, adición de oxígeno y alto contenido de materia seca

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un proceso de la hidrólisis enzimática de material lignocelulósico y fermentación de azúcares. El proceso comprende el uso de GH61 y oxígeno en determinadas condiciones del proceso.

10 Antecedentes de la invención

El material vegetal lignocelulósico, en este documento también llamado materia prima, es una fuente renovable de energía en forma de azúcares que puede convertirse en productos valiosos, por ejemplo, azúcares o biocombustible, tal como bioetanol. Durante este proceso, la (ligno o hemi)celulosa presente en la materia prima, tal como paja de trigo, rastrojo de maíz, cáscaras de arroz, etc., se convierte en azúcares reductores mediante enzimas (hemi)celulolíticas, que después se convierten opcionalmente en productos valiosos tales como etanol por microorganismos como levaduras, bacterias y hongos.

20 Como la (hemi)celulosa es cristalina y está atrapada en una red de lignina, la conversión en azúcares reductores es en general lenta e incompleta. Típicamente, la hidrólisis enzimática de materia prima sin tratar produce azúcares <20 % de la cantidad teórica. Aplicando un pretratamiento químico y termofísico, la (hemi)celulosa es más accesible para las enzimas (hemi)celulolíticas y, por tanto, las conversiones van más rápido y a rendimientos mayores.

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

30 Las enzimas celulolíticas, la mayoría de ellas se producen por especies como *Trichoderma*, *Humicola* y *Aspergillus*, se usan comercialmente para convertir materia prima pretratada en un puré que contiene (hemi)celulosa insoluble, azúcares reductores generados a partir de la misma y lignina. Las enzimas celulolíticas termoestables derivadas de *Rasamsonia*, se han usado para degradar materia prima lignocelulósica y estas enzimas son conocidas por su termoestabilidad, véase el documento WO 2007/091231.

35 El puré producido se usa en una fermentación durante la que los azúcares reductores se convierten en biomasa de levadura (células), dióxido de carbono y etanol. El etanol producido de esta manera se llama bioetanol.

40 La producción común de azúcares a partir de materia prima lignocelulósica pretratada, la hidrólisis también llamada licuación, presacarificación o sacarificación, típicamente tiene lugar durante un proceso que dura de 6 a 168 horas (Kumar, S., Chem. Eng. Technol. 32 (2009) 517-526) a temperaturas elevadas de 45 a 50 °C y condiciones no estériles. Durante esta hidrólisis, la celulosa presente se convierte parcialmente (típicamente de un 30 a un 95 %, dependiendo de la actividad enzimática y las condiciones de hidrólisis) en azúcares reductores. En caso de inhibición de las enzimas por los compuestos presentes en la materia prima pretratada y mediante los azúcares liberados; y para minimizar la inactivación térmica, este periodo de temperatura elevada se minimiza lo más posibles.

45 La fermentación después de la hidrólisis tiene lugar en una etapa del proceso diferente preferiblemente anaeróbica, en el mismo recipiente o en uno diferente, en que la temperatura se ajusta de 30 a 33 °C (proceso mesófilo) para alojar el crecimiento y la producción de etanol por biomasa microbiana, habitualmente levaduras. Durante este proceso de fermentación, el material (hemi)celulósico restante se convierte en azúcares reductores por las enzimas ya presentes de la etapa de hidrólisis, mientras se produce biomasa microbiana y etanol. La fermentación se acaba una vez que el material (hemi)celulósico se convierte en azúcares fermentables y todos los azúcares fermentables se convierten en etanol, dióxido de carbono y células microbianas. Esto puede tardar hasta 6 días. En general, el tiempo del proceso global de hidrólisis y fermentación puede ascender a 13 días.

50 El puré fermentado así obtenido consiste en azúcares no fermentables, material (hemi)celulósico no hidrolizable, lignina, células microbianas (más comúnmente células de levadura), agua, etanol, dióxido de carbono disuelto. Durante las etapas sucesivas, el etanol se destila del puré y se purifica adicionalmente. La suspensión sólida restante se seca y se usa, por ejemplo, como combustible de quemado, fertilizante o pienso para ganado bovino.

55 El documento WO 2010/080407 sugiere el tratamiento de material celulósico con una composición de celulosa en condiciones anaeróbicas. La eliminación o exclusión de especies de oxígeno reactivas puede mejorar el rendimiento de los sistemas enzimáticos hidrolizantes de celulosa. La hidrólisis de material celulósico, por ejemplo, lignocelulosa, mediante una composición enzimática puede reducirse por el daño oxidativo a los componentes de la composición enzimática y/o la oxidación del material celulósico por, por ejemplo, oxígeno molecular.

El documento WO 2009/046538 divulga un método para tratar materiales vegetales de materia prima lignocelulósica para liberar azúcares fermentables usando un proceso de hidrólisis enzimático para tratar los materiales realizados al vacío y producir una corriente del proceso rica en azúcares que comprende cantidades reducidas de azúcar volátil/compuestos inhibidores de la fermentación tal como furfural y ácido acético. Aparte de eliminar los compuestos inhibidores volátiles, otros compuestos y/o moléculas que también se eliminan incluyen nitrógeno, oxígeno, argón y dióxido de carbono.

Con cada lote de materia prima, se añaden enzimas para maximizar el rendimiento y la tasa de azúcares fermentables liberados de la materia prima lignocelulósica pretratada durante el tiempo del proceso dado. En general, los costes para la producción de enzimas, los rendimientos de materia prima en etanol y las inversiones son factores de coste principales en los costes de producción global (Kumar, S. Chem. Eng. Technol. 32 (2009) 517-526). Hasta ahora, el coste de reducción de uso de enzimas se consigue aplicando productos enzimáticos de una sola fuente microbiana o de múltiples fuentes microbianas (documento WO 2008/008793) con actividad hidrolítica más amplia y/o mayor (específica) cuyo uso tiene como objetivo una necesidad enzimática inferior, tasas de conversión más rápidas y/o rendimientos de conversión mayores y, por tanto, costes de producción de bioetanol menores globales. Esto requiere grandes inversiones en investigación y desarrollo de estos productos enzimáticos. En caso de un producto enzimático compuesto de enzimas de múltiples fuentes microbianas, se necesitan grandes inversiones de capital para la producción de dicho compuesto enzimático individual.

Podkaminer *et al.*, *Biotechnology for Biofuels*, 5:43 (2012) 1-9, divulga que GH61 puede ser importante para la hidrólisis de la celulosa. Debe apreciarse que la familia previa GH61 de glucósido hidrolasas se ha reclasificado como la familia AA9, véase Lévassieur *et al.*, *Biotechnology for Biofuels*, 6:41 (2013) 1-14.

Además, Cannella *et al.*, *Biotechnology for Biofuels*, 5:26 (2012) 1-10, se refiere a la producción y efecto del ácido aldónico durante la hidrólisis enzimática de lignocelulosa a alto contenido de materia seca.

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

Sumario de la invención

Un objeto de la invención, por lo tanto, es proporcionar un proceso en que la etapa de hidrólisis se realice en condiciones mejoradas. Otro objeto de la invención es proporcionar un proceso que implique hidrólisis que tenga un tiempo del proceso reducido. Un objeto adicional de la invención es proporcionar un proceso, en el que a dosificación de enzima pueda reducirse y al mismo tiempo se mantenga la producción de producto de hidrólisis útil al mismo nivel o incluso aumentado. Otro objeto es proporcionar un proceso que implique hidrólisis, en el que las condiciones del proceso de la hidrólisis se optimicen. Un objeto adicional más de la invención es proporcionar un proceso que implique hidrólisis, en el que la producción de producto de hidrólisis útil se aumente usando la misma dosificación de enzima. Uno o más de estos objetos se obtienen de acuerdo con la invención.

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

- a) opcionalmente pretratamiento del material lignocelulósico;
- b) opcionalmente lavado del material lignocelulósico opcionalmente pretratado;
- c) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado usando una composición enzimática que comprende al menos dos celulasas y por la que la composición enzimática comprende al menos GH61;
- d) por la que se usa entre 0,1 y 7,5 mg de composición enzimática/gramo de glucano (sobre materia seca y enzima como proteína) o entre 0,05 y 3,0 mg de composición enzimática/gramo de materia prima (sobre materia seca y enzima como proteína); y
- e) opcionalmente recuperación del producto de azúcar;

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

De acuerdo con una realización de la invención, durante parte del tiempo de la hidrólisis enzimática se añade oxígeno al material lignocelulósico y durante parte del tiempo de la hidrólisis enzimática se añade menos oxígeno al material lignocelulósico en comparación con la otra parte del tiempo de la hidrólisis enzimática, preferiblemente no se añade oxígeno al material lignocelulósico.

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

- a) opcionalmente pretratamiento del material lignocelulósico;
- b) opcionalmente lavado del material lignocelulósico opcionalmente pretratado;

- 5 c) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado usando una composición enzimática que comprende al menos dos celulasas y por la que la composición enzimática comprende al menos GH61;
- d) por la que se usa entre 0,1 y 7,5 mg de composición enzimática/gramo de glucano (sobre materia seca y enzima como proteína) o entre 0,05 y 3,0 mg de composición enzimática/gramo de materia prima (sobre materia seca y enzima como proteína); y
- e) fermentación del material lignocelulósico hidrolizado para producir un producto de fermentación, y
- f) opcionalmente recuperación del producto de fermentación,

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

15 De acuerdo con una realización de la invención, durante parte del tiempo de la hidrólisis enzimática, se añade oxígeno al material lignocelulósico y durante parte del tiempo de la hidrólisis enzimática se añade menos oxígeno al material lignocelulósico en comparación con la otra parte del tiempo de la hidrólisis enzimática, preferiblemente no se añade oxígeno al material lignocelulósico.

20 De acuerdo con una realización preferida de la invención, la parte del tiempo en la que se añade menos o preferiblemente nada de oxígeno es de un 10 a un 80 %, preferiblemente de un 20 a un 80 %, más preferiblemente de un 30 a un 80 % y mucho más preferiblemente de un 40 a un 80 % del tiempo de la hidrólisis enzimática total.

25 De acuerdo con otra realización preferida de la invención, la parte del tiempo en la que se añade más oxígeno es de un 2 a un 80 %, preferiblemente de un 4 a un 60 %, más preferiblemente de un 8 a un 50 % y mucho más preferiblemente de un 10 a un 50 % del tiempo de hidrólisis enzimática total, más preferiblemente la parte del tiempo en la que se añade más oxígeno es

- 30 a) de un 12 a un 50 %, y preferiblemente de un 20 a un 40 % cuando el oxígeno se añade en la segunda mitad del tiempo de la hidrólisis enzimática;
- b) de un 2 a un 30 %, preferiblemente de un 4 a un 25 % y más preferiblemente de un 5 a un 20 % del tiempo de hidrólisis enzimática total cuando el oxígeno se añade en la primera mitad del tiempo de la hidrólisis enzimática;
- o
- c) o una combinación de a y b.

35 Ventajosamente, la concentración de oxígeno en la fase líquida de la hidrólisis durante la parte del tiempo en la que se añade oxígeno es al menos 2 veces, preferiblemente al menos 4 veces, más preferiblemente al menos 10 veces la concentración de oxígeno en la fase líquida durante la parte del tiempo en la que se añade menos o nada de oxígeno.

40 De acuerdo con una realización preferida adicional de la invención, en la parte del tiempo cuando se añade el oxígeno, la concentración de oxígeno en la fase líquida, en la que el material lignocelulósico está presente durante la hidrólisis enzimática, es de al menos 0,001 mol/m³, preferiblemente al menos 0,002 mol/m³ y mucho más preferiblemente al menos 0,003 mol/m³ e incluso más preferiblemente más de 0,01 mol/m³, por ejemplo, más de 0,02 mol/m³ o 0,03 mol/m³. En reactores de menos de 1 m³, se obtendrán valores de DO por debajo de 0,01 mol/m³ o 0,02 mol/m³ mediante agitación lenta. La mezcla vigorosa o agitación a dicha escala introduce parte de la fase gaseosa del espacio vacío en el líquido de reacción. Por ejemplo, la mezcla o agitación puede crear un remolino que introduce oxígeno en el líquido. En general, la purga del espacio vacío con aire en combinación con mezcla (vigorosa) o agitación introducirá suficiente oxígeno en el material celulósico en el reactor de hidrólisis para reactores de hasta un tamaño de 100 litros a un 1 m³. A mayor escala, por ejemplo, en un reactor de 50 m³ o más, por ejemplo, 100 m³, se necesita tanta energía para la agitación vigorosa desde un punto de vista económico que no se aplicará en un proceso comercialmente operativo. En general, en reactores grandes, la agitación o mezcla sin introducir aire u oxígeno producirá valores de DO de menos de 0,01 mol/m³.

55 Para otra realización preferida más de la invención durante la adición de oxígeno (en la parte del tiempo cuando se añade el oxígeno), la concentración de oxígeno en la fase líquida, en la que el material lignocelulósico está presente durante la hidrólisis enzimática, es preferiblemente de como mucho un 80 % de la concentración de saturación de oxígeno en las condiciones de reacción de hidrólisis, más preferiblemente como mucho 0,12 mol/m³, aún más preferiblemente como mucho 0,09 mol/m³, incluso más preferiblemente como mucho 0,06 mol/m³, incluso aún más preferiblemente como mucho 0,045 mol/m³ y mucho más preferiblemente como mucho 0,03 mol/m³. La temperatura y presión influirán en la DO. Los valores de mol/m³ preferidos y ejemplares dados anteriormente se refieren a presión atmosférica normal y una temperatura de aproximadamente 62 °C. Los expertos en la materia apreciarán los valores de DO favorables basados en los presente contenidos.

65 De acuerdo con la invención, el reactor para la hidrólisis enzimática tiene un volumen de 1 m³ o más. El tiempo de hidrólisis enzimática del presente proceso es preferiblemente de 5 a 150 horas. De acuerdo con un aspecto preferido adicional de la invención, la composición enzimática se obtiene de un hongo, preferiblemente un microorganismo del género *Rasamsonia* o la composición enzimática comprende una enzima fúngica, preferiblemente una enzima de

Rasamsonia. De acuerdo con la invención, el contenido de materia seca en la etapa de hidrólisis c) es un 10 % en peso o más, preferiblemente un 14 % en peso o más y aún más preferiblemente de un 14 a un 33 % en peso. La hidrólisis enzimática preferiblemente tiene lugar en un reactor de cultivo discontinuo, semicontinuo y/o continuo. Preferiblemente, el oxígeno que se introduce en el presente proceso es un gas que contiene oxígeno tal como aire. Por se añade menos oxígeno a o está presente en el material lignocelulósico durante parte del tiempo de la hidrólisis enzimática, se entiende que se introduce, por ejemplo, en forma de burbujas, o está presente al menos un 50 % menos, preferiblemente al menos un 70 % menos, mucho más preferiblemente al menos un 90 % menos de oxígeno (expresado en moles de oxígeno/m³) de lo que se añade o está presente durante la otra parte del tiempo de la hidrólisis enzimática en la que se añade menos oxígeno.

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

Sorprendentemente, de acuerdo con la invención, mediante la adición de oxígeno es posible obtener muchas ventajas del proceso, incluyendo condiciones de temperatura óptimas, tiempo del proceso reducido, dosificación reducida de enzima, reutilización de enzimas, rendimientos mayores y otras optimizaciones del proceso, que provocan costes reducidos.

En una realización, la composición enzimática estable usada retiene actividad durante 30 horas o más. De acuerdo con una realización adicional, la hidrólisis se realiza preferiblemente a una temperatura de 45 °C o más, preferiblemente a una temperatura de 50 °C o más y más preferiblemente a una temperatura de 55 °C o más. El proceso de la invención se ilustrará en mayor detalle a continuación.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: El efecto de rociar nitrógeno o aire a través de una materia prima de aCS al 10 % antes de la hidrólisis, sobre la cantidad total de glucosa (g/l) liberada por la mezcla TEC-210 (1), la mezcla 4E-GH61 (2) y 4E-EG (3).

Figura 2: La glucosa producida en el ejemplo 2, 1 = experimento 1: sin aireación, 2 = experimento 2: aireación continua, 3 = experimento 3: aireación empezando a las 72 horas hasta el final.

Figura 3: El efecto del tiempo de aireación sobre la glucosa producida durante la hidrólisis enzimática, — = sin aireación, ●●● = el tiempo de aireación entre hidrólisis es 0 y 100 horas, - - - el tiempo de aireación entre hidrólisis es 0 y 7 horas y — — — = el tiempo de aireación entre hidrólisis es 72 y 100 horas.

Figura 4: El efecto del tiempo de aireación sobre la glucosa producida durante la hidrólisis enzimática en el experimento 1 (■ = el tiempo de aireación entre hidrólisis es 0 y 100 horas) y 2 (□ = el tiempo de aireación entre hidrólisis es 72 y 100 horas).

Figura 5: El efecto del tiempo de aireación sobre la glucosa producida durante la hidrólisis enzimática, —■— el tiempo de aireación entre hidrólisis es 72 y 100 horas y —●— el tiempo de aireación entre hidrólisis es 0 y 7 horas.

Figura 6: El efecto de la concentración de oxígeno disuelto (DO) sobre la hidrólisis de glucano en materia prima lignocelulósica pretratada como función del tiempo de hidrólisis para 2,5 mg/g de enzima y DO = 0,030 mol/m³ (—◆—) y 3,5 mg/g de enzima y DO = 0,005 mol/m³ (—■—).

Descripción detallada de la invención

Durante toda la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las palabras "comprender" e "incluye" y variaciones tales como "comprende", "que comprende", "incluye" y "que incluye" deben interpretarse de forma inclusiva. Es decir, estas palabras pretenden transmitir la posible inclusión de otros elementos o enteros no indicados específicamente, donde el contexto lo permita. Los artículos "un/o" y "una" se usan en este documento para hacer referencia uno o más de uno (es decir, a uno o al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" puede indicar un elemento o más de un elemento.

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

En la técnica anterior se sugiere mejorar la hidrólisis del material celulolítico usando condiciones anaeróbicas (documento WO 2010/080407) o de vacío (documento WO 2009/046538) durante la hidrólisis enzimática. En el proceso de ambos documentos se disminuyó el nivel de oxígeno. Se ha descubierto sorprendentemente que la

hidrólisis de la presente invención muestra resultados en un producto de reacción mejorado que da mayores cantidades de productos de azúcar (reducidos) y/o productos de fermentación deseados en la fermentación después de la hidrólisis en comparación con un proceso en el que no se añade oxígeno. En general, se observa un aumento de la conversión de glucosa de un 5 a un 15 % p/p, o incluso hasta un 25 % p/p.

El oxígeno puede añadirse de varias maneras. Por ejemplo, puede añadirse oxígeno como gas de oxígeno, gas enriquecido con oxígeno tal como aire enriquecido con oxígeno o aire (ejemplo de gas que contiene oxígeno). El oxígeno puede añadirse de forma continua o de forma discontinua. Por "se añade" oxígeno se entiende que el oxígeno se añade a la fase líquida (que comprende el material lignocelulósico) en el reactor de hidrólisis y no que haya oxígeno presente en el espacio vacío en el reactor por encima de la fase líquida (en combinación con agitación lenta o nula) por el que el oxígeno tiene que difundir desde el espacio vacío a la fase líquida. De modo que, preferiblemente, el oxígeno se añade como burbujas, muy preferiblemente como burbujas pequeñas.

En caso de que la enzima pueda dañarse por la presencia o adición de oxígeno, puede usarse un aporte de oxígeno más suave. En ese caso, puede encontrarse un equilibrio entre la producción de glucosa mejorada y el rendimiento de la enzima. La adición del oxígeno al material celulolítico puede hacerse durante la hidrólisis enzimática. En caso de añadir oxígeno en forma gaseosa, puede introducirse gas que contiene oxígeno, por ejemplo, soplado en los contenidos del reactor de hidrólisis líquidos de material celulolítico. En otra realización de la invención, el gas que contiene oxígeno se introduce en la corriente de material celulolítico líquido que entrará en el reactor de hidrólisis. En otra realización más de la invención, el gas que contiene oxígeno se introduce junto con el material celulolítico que entra en el reactor de hidrólisis o con parte de los contenidos del reactor líquidos que pasan un bucle externo del reactor. En la mayoría de casos, la adición de oxígeno antes de entrar en el reactor de hidrólisis no es suficiente en absoluto y la adición de oxígeno puede hacerse durante la hidrólisis también. En otra realización de la invención, la fase gaseosa presente en la parte superior del reactor (espacio vacío) se renueva de forma continua o discontinua con el gas que contiene oxígeno. En el último caso, se necesita mezcla (vigorosa) o agitación para obtener el oxígeno como burbujas y/o por difusión en los contenidos del reactor líquidos preferiblemente en combinación con sobrepresión en el reactor. En general, la purga del espacio vacío con aire en combinación con mezcla (vigorosa) o agitación puede introducir suficiente oxígeno en el material celulolítico en el reactor de hidrólisis para reactores de hasta un tamaño de 100 litros a 1 m³. En el proceso de la invención, el reactor tiene un volumen de 1 m³ o más. A mayor escala, por ejemplo, en un reactor de 50 m³ o más, por ejemplo 100 m³, se necesita tanta energía para la agitación vigorosa que desde el punto de vista económico no se aplicará en un proceso comercialmente operativo.

De acuerdo con la presente invención, el oxígeno puede añadirse antes de la etapa de hidrólisis, durante parte de la etapa de hidrólisis, durante la etapa de hidrólisis completa o una combinación de antes o durante la etapa de hidrólisis. Ventajosamente, el oxígeno se añade durante parte de la etapa de hidrólisis. La adición de oxígeno durante solamente parte de la hidrólisis puede hacerse, por ejemplo, en caso de que se produzca daño por oxidación de la una o más enzimas. En caso de que el oxígeno presente en los contenidos del reactor de hidrólisis o el producto de azúcar o el hidrolizado formado en la etapa de hidrólisis pudiera influir o alterar la etapa de fermentación posterior, la adición de oxígeno puede hacerse excepto en la última parte de la hidrólisis y, por tanto, (la mayoría de) el oxígeno se consume antes de que la biomasa hidrolizada entre en el reactor de fermentación. Ventajosamente, el oxígeno, preferiblemente en forma de burbujas (gaseosas), se añade en la última parte de la etapa de hidrólisis.

Los autores de la invención plantean la hipótesis de que en la primera parte de la (etapa de) hidrólisis (enzimática) se hidrolizan polisacáridos amorfos en azúcares tales como glucosa y que en la segunda parte de la etapa de hidrólisis los polisacáridos cristalinos restantes se convierten en azúcares. Los polisacáridos amorfos, por ejemplo, se convierten en oligosacáridos mediante endogluconasas, tras lo que los oligosacáridos pueden convertirse por celobiohidrolasa y beta glucosidasa (BG) en azúcares. De acuerdo con la presente hipótesis, los polisacáridos amorfos están ubicados en el exterior de los polisacáridos o complejos de polisacáridos mientras que los polisacáridos cristalinos están ubicados relativamente más en el interior de los polisacáridos o complejos de polisacáridos presentes en el material lignocelulósico. De modo que la conversión de los polisacáridos cristalinos puede continuar incluso cuando la mayor parte de los polipéptidos amorfos se han hidrolizado. Especialmente, la adición de oxígeno es beneficiosa durante la hidrólisis de los polisacáridos cristalinos, por ejemplo, en la degradación de los polisacáridos en oligosacáridos. De acuerdo con esta hipótesis, la adición de oxígeno es especialmente útil en la segunda parte de la etapa de hidrólisis. En general, se necesita un tiempo más corto de adición de oxígeno (o segunda parte más corta de hidrólisis) en caso de cantidades relativamente bajas de polisacáridos cristalinos en el material lignocelulósico en comparación con la hidrólisis de material lignocelulósico en que hay cantidades relativamente mayores de polisacáridos cristalinos presentes. Los autores de la invención también plantean que la adición de oxígeno es beneficiosa para la hidrólisis de polisacáridos cristalinos. Por lo tanto, la adición de oxígeno es muy útil especialmente en la fase en la que las enzimas atacan los polisacáridos cristalinos. Fuera de esta fase, no añadir oxígeno podría ser más eficaz. Por lo tanto, el aporte de oxígeno puede empezar únicamente en la segunda parte o segunda mitad de la hidrólisis. Al final de la hidrólisis, cuando la mayor parte de los polisacáridos se han degradado, la adición de oxígeno se detiene preferiblemente. La última parte de la segunda parte o segunda mitad de la hidrólisis, la mayor parte de los polisacáridos se convierten en oligosacáridos que durante la descomposición adicional en azúcares más pequeños ya no necesitan oxígeno. Por lo tanto, se añade preferiblemente menos oxígeno, en comparación con la adición de oxígeno durante la parte aireada del tiempo, al material lignocelulósico al final del proceso de hidrólisis o más preferiblemente no se añade oxígeno al material lignocelulósico al final del proceso de hidrólisis. Esta hipótesis se da

únicamente como posible explicación del efecto apreciado por los autores de la invención y la presente invención no se desmonta ni se mantiene con la corrección de esta teoría.

5 Los autores de la invención también han apreciado que la aireación durante el proceso de hidrólisis enzimática en el inicio del proceso de hidrólisis provoca una producción de glucosa aumentada durante la hidrólisis.

10 En la figura 3 se muestra el efecto de aireación. En comparación con la hidrólisis no aireada (mostrada como curva "no aireada"), una aireación al inicio del proceso de hidrólisis (mostrada como curva "de aireación de 0-7 horas") provocará un aumento inmediato en la producción de glucosa y/ por ejemplo, ya después de 24 horas de hidrólisis se encontrará una producción de glucosa que corresponde a una producción de glucosa sin aireación de 60 horas de hidrólisis en condiciones idénticas (excepto por la aireación). En comparación con la hidrólisis no aireada, una aireación al menos en la última parte del proceso de hidrólisis (mostrada como curva "de aireación de 72-100 horas") provocará un aumento inmediato en la producción de glucosa después de la aireación y, por ejemplo, ya después de 24 horas tras el inicio de la aireación (a las 72 horas) en el proceso de hidrólisis se encontrará un aumento de producción de glucosa de un 30 % en comparación con la producción de glucosa sin aireación en condiciones idénticas (excepto por la aireación). Los autores de la invención creen que, usando una aireación al inicio, así como en la última parte del proceso de hidrólisis (con un periodo sin aireación entre los intervalos de aireación) podría aumentar la producción de glucosa, por lo que esto provoca un aumento de la producción de glucosa que es mayor que uno de los dos aumentos por separado. La presente explicación se da para guiar e instruir a los expertos en la materia para seleccionar las condiciones apropiadas para el presente proceso de hidrólisis.

20 Se dan varios ejemplos de aireación (parcial) durante el proceso de hidrólisis enzimático en los ejemplos para mostrar el efecto beneficioso de la presente invención. Este efecto beneficioso se encuentra para varios sustratos o materia primas y, por lo tanto, se cree que está presente para la hidrólisis de todo tipo de sustratos o materias primas.

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

30 De acuerdo con una realización preferida de la invención, la parte del tiempo en la que se añade menos o preferiblemente nada de oxígeno es de un 10 a un 80 %, preferiblemente de un 20 a un 80 %, más preferiblemente de un 30 a un 80 % y mucho más preferiblemente de un 40 a un 80 % del tiempo de hidrólisis enzimática total. De acuerdo con una realización preferida adicional de la invención, la parte del tiempo en la que se añade más oxígeno es de un 2 a un 80 %, preferiblemente de un 4 a un 60 %, más preferiblemente de un 8 a un 50 % y mucho más preferiblemente de un 10 a un 50 % del tiempo de hidrólisis enzimática total. En general la concentración de oxígeno en la fase líquida durante la parte del tiempo en la que se añade oxígeno es al menos 2 veces, preferiblemente al menos 4 veces, más preferiblemente al menos 10 veces la concentración de oxígeno en la fase líquida durante la parte del tiempo en la que se añade menos o nada de oxígeno.

40 Para una realización preferida adicional de la invención, durante la parte del tiempo en la que tiene lugar la adición de oxígeno en la fase líquida (mediante aireación o adición de oxígeno), la concentración de oxígeno (DO) en la fase líquida en la que está presente el material lignocelulósico durante la hidrólisis enzimática es de al menos 0,001 mol/m³, preferiblemente al menos 0,002 mol/m³, más preferiblemente al menos 0,003 mol/m³ e incluso más preferiblemente más de 0,01 mol/m³, por ejemplo, más de 0,02 mol/m³ o 0,03 mol/m³. En reactores de menos de 1 m³, que está fuera del alcance de las reivindicaciones, los valores de DO por debajo de 0,01 mol/m³ o 0,02 mol/m³ se obtendrán por agitación lenta. La mezcla vigorosa o agitación a dicha escala introduce parte de la fase gaseosa del espacio vacío en el líquido de reacción. Por ejemplo, la mezcla o agitación puede crear un remolino que introduce oxígeno en el líquido. En general, la purga del espacio de cabeza con oxígeno (por ejemplo, en forma de aire) en combinación con mezcla (vigorosa) o agitación introducirá suficiente oxígeno en el material celulósico en el reactor de hidrólisis para reactores de hasta un tamaño de 100 litros a 1 m³. A mayor escala, por ejemplo, en un reactor de 50 m³ o más, por ejemplo 100 m³, se necesita tanta energía para la agitación vigorosa que desde el punto de vista económico no se aplicará en un proceso comercialmente operativo. En general, en reactores grandes, la agitación o mezcla sin introducir aire u oxígeno provocará valores de DO de menos de 0,01 mol/m³.

55 Para otra realización preferida más de la invención, durante la generación o producción de oxígeno, la concentración de oxígeno en la fase líquida (aireación o adición de oxígeno), la concentración de oxígeno en la fase líquida en la que está presente el material lignocelulósico durante la hidrólisis enzimática, es durante la parte del tiempo en la que se añade oxígeno preferiblemente como mucho un 80 % de la concentración de saturación de oxígeno en las condiciones de reacción de hidrólisis, más preferiblemente como mucho 0,12 mol/m³, aún más preferiblemente como mucho 0,09 mol/m³, incluso más preferiblemente como mucho 0,06 mol/m³, incluso aún más preferiblemente como mucho 0,045 mol/m³ y mucho más preferiblemente como mucho 0,03 mol/m³. La temperatura y la presión influirán en la DO. Los valores de mol/m³ preferidos y ejemplares dados anteriormente se refieren a presión atmosférica normal y una temperatura de aproximadamente 62 °C. Los expertos en la materia apreciarán los valores de DO favorables basándose en los presentes contenidos.

65

Para una realización preferida adicional de la invención, la concentración de oxígeno en la fase líquida, en la que está presente el material lignocelulósico durante la hidrólisis enzimática, es durante la parte del tiempo en la que se añade menos o nada de oxígeno menos de 0,02 mol/m³, preferiblemente menos de 0,01 mol/m³, más preferiblemente menos de 0,005 mol/m³, y mucho más preferiblemente menos de 0,001 mol/m³.

La adición de oxígeno en forma de aire u otro gas que contiene oxígeno de acuerdo con la invención también puede usarse para agitar o mezclar al menos parcialmente los contenidos del reactor de hidrólisis. El presente proceso de la invención muestra esencialmente una planta piloto y las ventajas a escala industrial. De acuerdo con la invención, el reactor de hidrólisis tiene un volumen de 1 m³ o más, preferiblemente de más de 10 m³ y mucho más preferiblemente de 50 m³ o más. En general, el reactor de hidrólisis será más pequeño de 3000 m³ o 5000 m³. Los autores de la invención plantean la teoría de que específicamente a gran escala, está disponible insuficiente oxígeno para la hidrólisis, lo que podría deberse a limitaciones de transferencia de oxígeno en el reactor, por ejemplo, en la biomasa celulolítica. En experimentos a escala de laboratorio, esta insuficiencia de oxígeno puede desempeñar una función menos importante. La relación del área superficial (o área de contacto de oxígeno del contenido del reactor) al volumen del reactor es más favorable para experimentos a pequeña escala que en experimentos a gran escala. Además, la mezcla en experimentos a pequeña escala es relativamente más fácil que a gran escala. Durante estos experimentos a pequeña escala también el transporte de oxígeno desde el espacio vacío del reactor de hidrólisis es más rápido en comparación con la situación en experimentos a gran escala. Esta teoría se da únicamente como posible explicación del efecto apreciado por los autores de la invención, y la presente invención no se desmonta ni se mantiene con la corrección de esta teoría. De acuerdo con una realización adicional de la invención, la adición de oxígeno puede usarse para controlar al menos parcialmente el proceso de hidrólisis.

A gran escala (por ejemplo, en un reactor que tiene un volumen de más de 1 m³) se apreció que la adición de oxígeno provocaba hidrólisis mejorada y/o una hidrólisis más rápida. Además, los autores de la invención fueron capaces de mejorar adicionalmente el proceso de hidrólisis usando cantidades más pequeñas de enzimas (sobre proteína) y obteniendo aún altos niveles de hidrólisis. Uno de los costes principales de la hidrólisis es el coste de la enzima o composición enzimática. Por lo tanto, reducir la cantidad de enzimas necesaria es una ventaja económica enorme.

El proceso de la presente invención hace posible usar cantidades de enzima (o composición enzimática) entre 0,1 y 7,5 mg de enzima/gramo de glucano, preferiblemente menos de 6,0 mg de enzima/gramo de glucano, más preferiblemente menos de 5,0 mg de glucano/gramo de materia prima, aún más preferiblemente menos de 4,0 mg de enzima/gramo de glucano y mucho más preferiblemente menos de 2,5 mg de enzima/gramo de glucano (sobre materia seca y enzima como proteína).

El contenido de glucano de la materia prima tratada con ácido es de aproximadamente un 25 a un 50 % en peso (materia seca). Para rastrojo de maíz, el contenido de glucano es de aproximadamente un 30 a un 45 % en peso (materia seca).

Por lo tanto, se usarán cantidades de enzima (o composición enzimática) entre 0,1 y 7,5 mg de enzima/gramo de glucano, preferiblemente entre 0,2 y 7,5 mg de enzima/gramo de glucano, más preferiblemente entre 0,2 y 6,0 mg de enzima/gramo de glucano, incluso más preferiblemente entre 0,2 y 5,0 mg de enzima/gramo de glucano, aún más preferiblemente entre 0,2 y 4,0 mg de enzima/gramo de glucano y mucho más preferiblemente entre 0,2 y 2,5 mg de enzima/gramo de glucano (sobre materia seca y enzima como proteína) en el proceso de la invención.

El proceso de la presente invención hace posible usar cantidades de enzima (o composición enzimática) entre 0,05 y 3,0 mg de enzima/gramo de materia prima, preferiblemente menos de 2,5 mg de enzima/gramo de materia prima, más preferiblemente menos de 2,0 mg de enzima/gramo de materia prima, aún más preferiblemente menos de 1,5 mg de enzima/gramo de materia prima y mucho más preferiblemente menos de 1,0 mg de enzima/gramo de materia prima (sobre materia seca y enzima como proteína).

Se usarán cantidad de enzima (o composición enzimática) entre 0,05 y 3,0 mg de enzima/gramo de materia prima, preferiblemente entre 0,1 y 3,0 mg de enzima/gramo de materia prima, más preferiblemente entre 0,1 y 2,5 mg de enzima/gramo de materia prima, incluso más preferiblemente entre 0,1 y 2,0 mg de enzima/gramo de materia prima, aún más preferiblemente entre 0,1 y 1,5 mg de enzima/gramo de materia prima y mucho más preferiblemente entre 0,1 y 1,0 mg de enzima/gramo de materia prima (sobre materia seca y enzima como proteína) en el proceso de la invención.

Usando estas cantidades de enzima (o composición enzimática), puede obtenerse un nivel de conversión de glucano de más de un 70 %, preferiblemente más de un 72 %. En general, pueden obtenerse niveles de conversión de glucano entre un 70 % y un 90 %, preferiblemente niveles entre un 72 % y un 90 % e incluso más preferiblemente niveles entre un 74 % y un 90 %. La determinación del nivel de conversión de glucano se describe en los ejemplos.

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

Una enzima "termoestable" significa que la enzima tiene una temperatura óptima de 60 °C o mayor, por ejemplo, 70 °C o mayor, tal como 75 °C o mayor, por ejemplo, 80 °C o mayor tal como 85 °C o mayor. Pueden aislarse, por ejemplo,

de microorganismos termófilos, o pueden diseñarse por los expertos en la materia y sintetizarse artificialmente. En una realización, los polinucleótidos pueden aislarse u obtenerse de hongos filamentosos termófilos o termotolerantes o aislarse de hongos no termófilos o no termotolerantes pero que se encuentra que son termoestables.

- 5 Por "hongo termófilo" se entiende un hongo que crece a una temperatura de 50 °C o por encima. Por hongo "termotolerante" se entiende un hongo que crece a una temperatura de 45 °C o por encima, que tiene un máximo cerca de 50 °C.

10 Ejemplos de cepas fúngicas termófilas son *Rasamsonia emersonii* (antiguamente conocida como *Talaromyces emersonii*; *Talaromyces emersonii*, *Penicillium geosmithia emersonii* y *Rasamsonia emersonii* se usan indistintamente en este documento).

15 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 emersonii*. 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*
20 *Thermoascus aurantiacus* y *Thielavia terrestris*.

25 Los hongos termófilos no están restringidos a un orden taxonómico específico y existen en todo el árbol fúngico de la vida. Ejemplos son, *Rhizomucor* en Mucorales, *Myceliophthora* en Sordariales y *Talaromyces*, *Thermomyces* y *Thermoascus* en Eurotiales (Mouchacca 1997). La mayoría de las especies de *Talaromyces* son mesófilos, pero hay excepciones de especies dentro de las secciones *Emersonii* y *Thermophila*. La sección *Emersonii* incluye *Talaromyces emersonii*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Talaromyces bacillisporus* y *Talaromyces leycettanus*, que crecen todos bien a 40 °C. *Talaromyces bacillisporus* es termotolerante, *T. leycettanus* es de termotolerante a termófilo y *T. emersonii* y *T. byssochlamydoides* son realmente termófilos (Stolk y Samson 1972). El único miembro de la sección termófila de *Talaromyces*, *T. thermophilus*, crece rápidamente a 50 °C (Evans y Stolk 1971; Evans 1971; Stolk y Samson 1972). La clasificación actual de estas especies de *Talaromyces* termófilas se basa principalmente en caracteres fenotípicos y fisiológicos, tales como su capacidad de crecer por encima de 40 °C, el color de las ascosporas, la estructura de la cobertura ascomatal y la formación de un determinado tipo de anamorfo. Stolk y Samson (1972) indicaron que los miembros de la sección *Emersonii* tienen anamorfos de la serie *Paecilomyces* (*T. byssochlamydoides* y *T. leycettanus*) o *Penicillium cylindrosporum* (*T. emersonii* y *T. bacillisporus*). Después, Pitt (1979) transfirió la especie que pertenece 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 en collura (cuellos), un carácter de *Penicillium* y *Paecilomyces*. Dentro del género *Geosmithia*, únicamente *G. argillacea* es termotolerante, y Stolk *et al.* (1969) y Evans (1971) propusieron una conexión con los miembros de *Talaromyces* sect. *Emersonii*. La relación filogenética de las especies de *Talaromyces* termófilas dentro de *Talaromyces* y las *Trichocomaceae* es desconocida. Véase J. Houbraken, Antonie van Leeuwenhoek febrero de 2012; 101(2): 403-21.
30

35 *Rasamsonia* es un nuevo género que comprende especies de *Talaromyces* y *Geosmithia* termotolerantes y termófilas (J. Houbraken *et al. vida supra*). Basándose en los datos fenotípicos, fisiológicos y moleculares, Houbraken *et al.* propusieron transferir las especies *T. emersonii*, *T. byssochlamydoides*, *T. eburneus*, *G. argillacea* y *G. cylindrospora* a *Rasamsonia* gen. nov. *Talaromyces emersonii*, *Penicillium geosmithia emersonii* y *Rasamsonia emersonii* se usan indistintamente en este documento.
40

45 Hongos termófilos preferidos son *Rasamsonia byssochlamydoides*, *Rasamsonia emersonii*, *Thermomyces lenuginosus*, *Talaromyces thermophilus*, *Thermoascus crustaceus*, *Thermoascus thermophilus* y *Thermoascus aurantiacus*.
50

55 Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (como se define por Hawksworth *et al.*, en Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8.^a edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, RU). Los hongos filamentosos se caracterizan por una pared micelial compuesta de quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es mediante elongación de las hifas y el catabolismo de carbono es obligadamente aeróbico. Las cepas fúngicas filamentosas incluyen, aunque sin limitación, cepas de *Acremonium*, *Agaricus*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Cryptococcus*, *Filbasidium*, *Fusarium*, *Geosmithia*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Panerochaete*, *Pleurotus*, *Rasamsonia*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thermomyces*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, y *Trichoderma*.
60

65 Varias cepas de hongos filamentosos están fácilmente accesibles al público en varias colecciones de cultivo, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL). Ejemplos de dichas cepas incluyen *Aspergillus niger* CBS 513.88, *Aspergillus oryzae* ATCC 20423, IFO 4177, ATCC 1011, ATCC 9576, ATCC14488-14491, ATCC 11601, ATCC12892,

P. chrysogenum CBS 455.95, *Penicillium citrinum* ATCC 38065, *Penicillium chrysogenum* P2, *Talaromyces emersonii* CBS 393.64, *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225 o ATCC 48272, *Trichoderma reesei* ATCC 26921 o ATCC 56765 o ATCC 26921, *Aspergillus sojae* ATCC11906, *Chrysosporium lucknowense* C1, Garg 27K, VKM F-3500-D, ATCC44006 y derivados de las mismas.

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

10 De acuerdo con la invención, mediante la adición de oxígeno es posible obtener muchas ventajas del proceso, incluyendo condiciones de temperatura óptimas, tiempo del proceso reducido, dosificación reducida de enzima, reutilización de enzimas y otras optimizaciones del proceso, que provocan costes reducidos. Ventajosamente, la invención proporciona un proceso en que la etapa de hidrólisis se realiza en condiciones mejoradas. La invención también proporciona un proceso que implica hidrólisis que tiene un tiempo de proceso reducido. Además, la invención
15 proporciona un proceso, en el que la dosificación de enzima puede reducirse y al mismo tiempo se mantiene la producción de producto de hidrólisis útil al mismo nivel. Otra ventaja de la invención es que el presente proceso que implica hidrólisis puede provocar condiciones del proceso que están optimizadas. Una ventaja adicional más de la invención es que la producción de productos de hidrólisis útil del proceso que implica hidrólisis se aumenta durante la misma dosificación de enzima.

20 *Composición enzimática estable*

Composición enzimática estable en este documento significa que la composición enzimática retiene actividad después de 30 horas de tiempo de reacción de hidrólisis, preferiblemente al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un
25 50 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 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 La composición enzimática puede prepararse por fermentación de un sustrato adecuado con un microorganismo adecuado, por ejemplo, *Rasamsonia emersonii* o *Aspergillus niger*, en el que la composición enzimática se produce por el microorganismo. El microorganismo puede alterarse para mejorar o para preparar la composición de celulasa. Por ejemplo, el microorganismo puede mutarse mediante procedimientos clásicos de mejora de cepas o mediante técnicas de ADN recombinante. Por lo tanto, los microorganismos mencionados en este documento pueden usarse tal
35 cual para producir la composición de celulasa o pueden alterarse para aumentar la producción o para producir una composición de celulasa alterada que podría incluir celulasas heterólogas, por tanto, enzimas que no se producen originalmente por ese microorganismo. Preferiblemente se usa un hongo, más preferiblemente un hongo filamentoso para producir la composición de celulasa. Ventajosamente, se usa un microorganismo termófilo o termotolerante. Opcionalmente, se usa un sustrato que induce la expresión de las enzimas en la composición enzimática durante la
40 producción de la composición enzimática.

La composición enzimática se usa para liberar azúcares de la lignocelulosa, que comprende polisacáridos. Los polisacáridos principales son, celulosa (glucanos), hemicelulosas (xilanos, heteroxilanos y xiloglucanos). Además, algo de hemicelulosa puede estar presente como glucomananos, por ejemplo, en materias primas derivadas de madera.
45 La hidrólisis enzimática de estos polisacáridos en azúcares solubles, incluyendo tanto monómeros como multímeros, por ejemplo, glucosa, celobiosa, xilosa, arabinosa, galactosa, fructosa, manosa, ramnosa, ribosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico y otras hexosas y pentosas se produce bajo la acción de diferentes enzimas que actúan en concierto. Por producto de azúcar se entiende el producto de hidrólisis enzimática de la materia prima o material lignocelulósico. El producto de azúcar comprenderá azúcares solubles, incluyendo tanto monómero como multímeros, preferiblemente comprenderá glucosa. Ejemplos de otros azúcares son celobiosa, xilosa, arabinosa, galactosa, fructosa, manosa, ramnosa, ribosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico y otras hexosas y pentosas. El producto de azúcar puede usarse tal cual o puede procesarse adicionalmente, por ejemplo, purificarse.

Además, las pectinas y otras sustancias pécticas tales como arabinanos pueden componer una proporción considerable de la masa seca de paredes típicamente celulares de tejidos vegetales no leñosos (aproximadamente de una cuarta parte a la mitad de la masa seca puede ser pectinas).
55

La celulosa es un polisacárido lineal compuesto de residuos de glucosa unidos mediante enlaces β -1,4. La naturaleza lineal de las fibras de celulosa, así como la estequiometría de la glucosa β unida (con respecto a α) genera estructuras más propensas a enlaces de hidrógeno entre hebras que las estructuras α unidas altamente ramificadas del almidón. Por tanto, los polímeros de celulosa son en general menos solubles y forman fibras más fuertemente unidas que las fibras encontradas en el almidón.
60

Enzimas que pueden incluirse en la composición enzimática estable usada en la invención se describen ahora en mayor detalle:
65

GH61 (siempre incluida), endoglucanasas, (EG) y exocelobiohidrolasas (CBH) catalizan la hidrólisis de la celulosa insoluble en productos tales como celooligoacáridos (celobiosa como producto principal), mientras que las β -glucosidasas (BG) convierten los oligosacáridos, principalmente celobiosa y celotriosa en glucosa.

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

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

Las sustancias pécticas incluyen pectinas, arabinanos, galactanos y arabinogalactanos. Las pectinas son los polisacáridos más complejos en la pared celular vegetal. Se acumulan alrededor de una cadena central de unidades de ácido D-galacturónico α (1,4) unidas intercaladas en algún grado con L-ramnosa. En una pared celular cualquiera hay varias unidades estructurales que se ajustan a esta descripción y en general se ha considerado que en una sola molécula péctica, las cadenas centrales de diferentes unidades estructurales son continuas entre sí.

20 Los tipos principales de unidad estructural son: galacturonano (homogalacturonano), que puede sustituirse con metanol en el grupo carboxilo y acetato en O-2 y O-3; ramnogalacturonano I (RGI), en que las unidades de ácido galacturónico alternan con unidades de ramnosa que portan cadenas laterales de galactano (1,4) unido y arabinano (1,5) unido. Las cadenas laterales de arabinano pueden adherirse directamente a ramnosa o indirectamente a través de las cadenas de galactano; xilogalacturonano, con unidades de xilosilo individuales en O-3 de ácido galacturónico (muy asociado con RGI); y ramnogalacturonano II (RGII), una unidad minoritaria particularmente compleja que contiene azúcares inusuales, por ejemplo, apiosas. Una unidad de RGII puede contener dos residuos apiosilo que, en
25 condiciones iónicas adecuadas, puede formar de manera reversible ésteres con borato.

Una composición para su uso en un proceso de la invención comprende referiblemente al menos dos actividades, aunque típicamente una composición comprenderá más de dos actividades, por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más. Típicamente, una composición para su uso en un proceso de la invención comprende al menos dos celulasas y al menos una hemicelulasa. Una composición para su uso en un proceso de la invención puede comprender celulasas, pero no xilanasas. Además, una composición para su uso en un proceso de la invención puede comprender actividad enzimática auxiliar, es decir, actividad adicional que, directa o indirectamente, da lugar a la degradación de lignocelulosa. Ejemplos de dichas actividades auxiliares se mencionan en este documento.

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

Una composición para su uso en la invención puede obtenerse de *Rasamsonia emersonii*. En la invención, se prevé que un conjunto central de actividades enzimáticas (que degradan la lignocelulosa) puede obtenerse de *Rasamsonia emersonii*. *Rasamsonia emersonii* puede proporcionar un conjunto altamente eficaz de actividades como se muestra en este documento para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica. Esa actividad entonces puede complementarse con actividades enzimáticas adicionales de otras fuentes. Dichas actividades adicionales pueden obtenerse de fuentes clásicas y/o producirse por un organismo modificado genéticamente.

40 Las actividades en una composición para su uso en la invención pueden ser termoestables. En este documento, esto significa que la actividad tiene una temperatura óptima de aproximadamente 60 °C o mayor, por ejemplo, aproximadamente 70 °C o mayor, tal como aproximadamente 75 °C o mayor, por ejemplo, aproximadamente 80 °C o mayor tal como 85 °C o mayor. Las actividades en una composición para su uso en la invención típicamente no tendrán la misma temperatura óptima, pero preferiblemente serán, no obstante, termoestables.

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

Las actividades en una composición para su uso en la invención pueden definirse por una combinación de cualquiera de las temperaturas óptimas y valores de pH anteriores.

5 La composición usada en un proceso de la invención puede comprender, además de las actividades derivadas de *Rasamsonia*, una celulasa (por ejemplo, una derivada de una fuente distinta de *Rasamsonia*) y/o una hemicelulasa (por ejemplo, una derivada de una fuente distinta de *Rasamsonia*) y/o una pectinasa.

10 Una composición para su uso en la invención puede comprender una, dos, tres, cuatro clases o más de celulasa, por ejemplo, una, dos, tres o cuatro o todas de una GH61, una endoglucanasa (EG), una o dos exocelobiohidrolasas (CBH) y una β -glucosidasa (BG). Una composición para su uso en la invención puede comprender dos o más de cualquiera de estas clases de celulasa.

15 Una composición para su uso en la invención puede comprender una actividad que tenga un tipo diferente de actividad celulasa y/o actividad hemicelulasa y/o actividad pectinasa de la proporcionada por la composición para su uso en un proceso de la invención. Por ejemplo, una composición para su uso en la invención puede comprender un tipo de actividad celulasa y/o hemicelulasa y/o actividad pectinasa proporcionada por una composición como se describe en este documento y un segundo tipo de actividad celulasa y/o hemicelulasa y/o actividad pectinasa proporcionada por una celulasa/hemicelulasa/pectinasa adicional.

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

25 Las proteínas GH61 (familia 61 de glucósido hidrolasa o a veces de nominada EGIV) son monooxigenasas de polisacárido dependientes de oxígeno (PMO) de acuerdo con la bibliografía más reciente. A menudo, en la bibliografía se menciona que estas proteínas potencian la acción de las celulasas sobre sustratos de lignocelulosa. GH61 se clasificó originalmente como endoglucanasa basándose en la medición de actividad endo-1,4- β -d-glucanasa muy débil en un miembro de la familia. El término "GH61", como se usa en este documento, debe entenderse como una familia de enzimas, que comparten partes de secuencia conservadas comunes y plegamientos para clasificarse en la familia 61 del sistema de clasificación CAZY GH bien establecido (<http://www.cazy.org/GH61.html>). la familia 61 de glucósido hidrolasa es un miembro de la familia de glucósido hidrolasas EC 3.2.1. GH61 se usa en este documento como parte de las celulasas.

30 En este documento, una hemicelulasa es cualquier polipéptido que pueda degradar o modificar la hemicelulosa. Es decir, una hemicelulasa puede tener la capacidad de degradar o modificar uno o más de xilano, glucuronoxilano, arabinoxilano, glucomanano y xiloglucano. Un polipéptido que pueda degradar una hemicelulosa es uno que puede catalizar el proceso de descomposición de la hemicelulosa en polisacáridos más pequeños, parcialmente, por ejemplo, en oligosacáridos, o completamente en monómeros de azúcar, por ejemplo, monómeros de azúcar hexosa o pentosa. Una hemicelulasa para su uso en la invención puede dar lugar a una población mixta de oligosacáridos y monómeros de azúcar cuando se pone en contacto con la hemicelulasa. Dicha degradación típicamente tendrá lugar mediante una reacción de hidrólisis.

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

40 Por consiguiente, una composición para su uso en la invención puede comprender cualquier celulasa, por ejemplo, una GH61 (siempre presente), una celobiohidrolasa, una endo- β -1,4-glucanasa, una β -glucosidasa o una β -(1,3)(1,4)-glucanasa.

45 En este documento, una celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91) es cualquier polipéptido que pueda catalizar la hidrólisis de enlaces 1,4- β -D-glucosídicos en celulosa o celotetraosa, liberando celobiosa de los extremos de las cadenas. Esta enzima también puede denominarse 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.

50 En este documento, una endo- β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4) es cualquier polipéptido que pueda catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,4- β -D-glucosídicos en celulosa, liquenina o β -D-glucanos de los cereales. Dicho polipéptido también puede hidrolizar enlaces 1,4 en β -D-glucanos que también contienen enlaces 1,3. Esta enzima también puede denominarse 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.

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

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

Una composición para su uso en la invención puede comprender cualquier hemicelulasa, por ejemplo, una endoxilanasas, una β -xilosidasa, una α -L-arabinofuranosidasa, una α -D-glucuronidasa, una acetilxilano esterasa, una feruloilesterasa, una cumaroilesterasa, una α -galactosidasa, una β -galactosidasa, una β -mananasa o una β -manosidasa.

En este documento, una endoxilanasas (EC 3.2.1.8) es cualquier polipéptido que pueda catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,4- β -D-xilosídicos en xilanos. Esta enzima también puede denominarse endo-1,4- β -xilanasas o 1,4- β -D-xilano xilanohidrolasa. Una alternativa es EC 3.2.1-136, una glucuronoarabinoxilano endoxilanasas, una enzima que puede hidrolizar enlaces 1,4 xilosídicos en glucuronoarabinoxilanos.

En este documento, una β -xilosidasa (EC 3.2.1.37) es cualquier polipéptido que pueda catalizar la hidrólisis de 1,4- β -D-xilanos, para eliminar residuos de D-xilosa sucesivos de los extremos no reductores. Dichas enzimas también pueden hidrolizar xilobiosas. Esta enzima también puede denominarse xilano 1,4- β -xilosidasa, 1,4- β -D-xilano xilohidrolasa, exo-1,4- β -xilosidasa o xilobiasa.

En este documento, una α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) es cualquier polipéptido que pueda actuar sobre α -L-arabinofuranósidos, α -L-arabinanos que contienen enlaces (1,2) y/o (1,3) y/o (1,5), arabinoxilanos y arabinogalactanos. Esta enzima también puede denominarse α -N-arabinofuranosidasa, arabinofuranosidasa o arabinosidasa.

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

En este documento, una acetilxilano esterasa (EC 3.1.1.72) es cualquier polipéptido que pueda catalizar la desacetilación de xilanos y xilooligosacáridos. Dicho polipéptido puede catalizar la hidrólisis de grupos acetilo de xilano polimérico, xilosa acetilada, glucosa acetilada, acetato de alfa naftilo o acetato de p-nitrofenilo, pero típicamente, no de triacetilglicerol. Dicho polipéptido típicamente no actúa sobre manano acetilado o pectina.

En este documento, una feruloilesterasa (EC 3.1.1.73) es cualquier polipéptido que pueda catalizar una reacción de la forma: feruloil-sacárido + H(2)O = 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) de un azúcar esterificado, que habitualmente es arabinosa en sustratos "naturales". El acetato de p-nitrofenol y el ferulato de metilo típicamente son sustratos más pobres. Esta enzima también puede denominarse éster cinamoílico hidrolasa, ácido ferúlico esterasa o hidroxicinamoilo esterasa. También puede denominarse enzima accesoria de hemicelulosa, ya que puede ayudar a las xilanasas y pectinasas a descomponer la hemicelulosa y la pectina de la pared celular vegetal.

En este documento, una cumaroilesterasa (EC 3.1.1.73) es cualquier polipéptido que pueda catalizar una reacción de la forma: cumaroil-sacárido + H(2)O = cumarato + sacárido. El sacárido puede ser, por ejemplo, un oligosacárido o un polisacárido. Esta enzima también puede denominarse trans-4-cumaroilesterasa, trans-p-cumaroilesterasa, p-cumaroilesterasa o ácido p-cumárico esterasa. Esta enzima también está dentro de EC 3.1.1.73 de modo que también puede denominarse feruloilesterasa.

En este documento, una α -galactosidasa (EC 3.2.1.22) es cualquier polipéptido que pueda catalizar la hidrólisis de residuos de α -D-galactosa no reductores terminales en α -D-galactósidos incluyendo oligosacáridos de galactosa, galactomananos, galactanos y arabinogalactanos. Dicho polipéptido también puede tener la capacidad de hidrolizar α -D-fucósidos. Esta enzima también puede denominarse melibiasa.

En este documento, una β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) es cualquier polipéptido que pueda catalizar la hidrólisis de residuos de β -D-galactosa no reductores terminales en β -D-galactósidos. Dicho polipéptido también puede tener la capacidad de hidrolizar α -L-arabinósidos. Esta enzima también puede denominarse exo-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactanasa o lactasa.

En este documento, una β -mananasa (EC 3.2.1.78) es cualquier polipéptido que pueda catalizar la hidrólisis aleatoria de enlaces 1,4- β -D-manosídicos en mananos, galactomananos y glucomananos. Esta enzima también puede denominarse manano endo-1,4- β -manosidasa o endo-1,4-mananasa.

En este documento, una β -manosidasa (EC 3.2.1.25) es cualquier polipéptido que pueda catalizar la hidrólisis de residuos de β -D-manosa no reductores terminales en β -D-manósidos. Esta enzima también puede denominarse mananasa o manasa.

Una composición para su uso en la invención puede comprender cualquier pectina, por ejemplo, una endopoligalacturonasa, una pectina metilesterasa, una endogalactanasa, una beta galactosidasa, una pectina acetilesterasa, una endopectina liasa, pectato liasa, alfa ramnosidasa, una exogalacturonasa, una expoligalacturonato liasa, una ramnogalacturonano hidrolasa, una ramnogalacturonano liasa, una ramnogalacturonano acetilesterasa, una ramnogalacturonano galacturonohidrolasa, una xilogalacturonasa.

En este documento, una endopoligalacturonasa (EC 3.2.1.15) es cualquier polipéptido que pueda catalizar la hidrólisis aleatoria de enlaces 1,4- α -D-galactosidurónicos en pectato y otros galacturonanos. Esta enzima también puede denominarse 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.

En este documento, una pectina metilesterasa (EC 3.1.1.11) es cualquier enzima que pueda catalizar la reacción: pectina + n H₂O = n metanol + pectato. La enzima también puede conocerse como pectinesterasa, pectina desmetoxilasa, pectina metoxilasa, pectina metilesterasa, pectasa, pectinoesterasa o pectina pectilhidrolasa.

En este documento, una endogalactanasa (EC 3.2.1.89) es cualquier enzima que pueda catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,4- β -D-galactosídicos en arabinogalactanos. La enzima también puede conocerse como arabinogalactano endo-1,4- β -galactosidasa, endo-1,4- β -galactanasa, galactanasa, arabinogalactanasa o arabinogalactano 4- β -D-galactanohidrolasa.

En este documento, una pectina acetilesterasa se define en este documento como cualquier enzima que tenga una actividad acetilesterasa que cataliza la desacetilación de los grupos acetilo en los grupos hidroxilo de residuos GalUA de pectina.

En este documento, una endopectina liasa (EC 4.2.2.10) es cualquier enzima que pueda catalizar la escisión eliminadora de éster metílico de (1 \rightarrow 4)- α -D-galacturonano para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi-6-O-metil- α -D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. La enzima también puede conocerse como pectina liasa, pectina *trans*-eliminasa; endopectina liasa, polimetilgalacturónico transeliminasa, pectina metiltranseliminasa, pectoliasa, PL, PNL o PMGL o (1 \rightarrow 4)-6-O-metil- α -D-galacturonano liasa.

En este documento, una pectato liasa (EC 4.2.2.2) es una enzima que puede catalizar la escisión eliminadora de (1 \rightarrow 4)- α -D-galacturonano para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi- α -D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. La enzima también puede conocerse como poligalacturónico transeliminasa, ácido péctico transeliminasa, poligalacturonato liasa, endopectina metiltranseliminasa, pectato transeliminasa, endogalacturonato transeliminasa, ácido péctico liasa, péctico liasa, ácido α -1,4-D-endopoligalacturónico liasa, PGA liasa, PPasa-N, ácido endo- α -1,4-poligalacturónico liasa, ácido poligalacturónico liasa, pectina *trans*-eliminasa, ácido poligalacturónico *trans*-eliminasa o (1 \rightarrow 4)- α -D-galacturonano liasa.

En este documento, una alfa ramnosidasa (EC 3.2.1.40) es cualquier polipéptido que pueda catalizar la hidrólisis de residuos de α -L-ramnosa no reductores terminales en α -L-ramnósidos o, como alternativa en ramnogalacturonano. Esta enzima también se conoce como α -L-ramnosidasa T, α -L-ramnosidasa N o α -L-ramnósido ramnoidrolasa.

En este documento, la exogalacturonasa (EC 3.2.1.82) es cualquier polipéptido con capacidad de hidrólisis de ácido péctico desde el extremo no reductor, liberando digalacturonato. La enzima también puede conocerse como exo-poli- α -galacturonosidasa, expoligalacturonosidasa o expoligalacturanosidasa.

En este documento, la exogalacturonasa (EC 3.2.1.67) es cualquier polipéptido con capacidad de catalizar: (1,4- α -galacturónido)_n + H₂O = (1,4- α -galacturónido)_{n-1} + D-galacturonato. La enzima también puede conocerse como galacturonano 1,4- α -galacturonidasa, expoligalacturonasa, poli(galacturonato) hidrolasa, exo-D-galacturonasa, exo-D-galacturonanasa, expoli-D-galacturonasa o poli(1,4- α -D-galacturónido) galacturonohidrolasa.

En este documento, la exopoligalacturonato liasa (EC 4.2.2.9) es cualquier polipéptido con capacidad de catalizar la escisión eliminadora de 4-(4-desoxi- α -D-galact-4-enuronosil)-D-galacturonato del extremo reductor de pectato, es decir, pectina desesterificada. Esta enzima también puede conocerse como pectato disacárido liasa, pectato exoliasa, ácido exopéctico transeeliminasa, exopectato liasa, ácido exopoligalacturónico *trans*-eliminasa, PATE, exo-PATE, exo-PGL o liasa de disacárido (1 \rightarrow 4)- α -D-galacturonano de extremo reductor.

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

En este documento, la ramnogalacturonano liasa es cualquier polipéptido que sea cualquier polipéptido que pueda escindir enlaces α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalpA de un modo endo en ramnogalacturonano mediante beta eliminación.

En este documento, la ramnogalacturonano acetilsterasa es cualquier polipéptido que catalice la desacetilación de la estructura de residuos alternos de ramnosa y ácido galacturónico en ramnogalacturonano.

En este documento, la ramnogalacturonano galacturonohidrolasa es cualquier polipéptido que pueda hidrolizar el ácido galacturónico del extremo no reductor de estructuras de ramnogalacturonano estrictamente alternantes de un modo *exo*.

En este documento, la xilogalacturonasa es cualquier polipéptido que actúe sobre xilogalacturonano escindiendo la estructura de ácido galacturónico sustituido con β -xilosa de una manera *endo*. Esta enzima también puede conocerse como xilogalacturonano hidrolasa.

En este documento, una α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) es cualquier polipéptido que pueda actuar sobre α -L-arabinofuranósidos, α -L-arabinanos que contienen enlaces (1,2) y/o (1,3) y/o (1,5), arabinoxilanos y arabinogalactanos. Esta enzima puede denominarse α -N-arabinofuranosidasa, arabinofuranosidasa o arabinosidasa.

En este documento, la endoarabinanasa (EC 3.2.1.99) es cualquier polipéptido que pueda catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,5- α -arabinofuranosídicos en 1,5-arabinanos. La enzima también puede conocerse como endoarabinasa, arabinano endo-1,5- α -L-arabinosidasa, endo-1,5- α -L-arabinanasa, endo- α -1,5-arabanasa; endoarabanasa o 1,5- α -L-arabinano 1,5- α -L-arabinanohidrolasa.

Una composición para su uso en la invención típicamente comprenderá al menos dos celulasas y al menos una pectinasa.

Una composición para su uso en la invención puede comprender una GH61 (siempre presente), una celobiohidrolasa, una endoglucanasa y/o una β -glucosidasa. dicha composición también puede comprender una o más hemicelulasas y una o más pectinasas.

Además, puede haber una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o todas) de una amilasa, una proteasa, una lipasa, una ligninasa, una hexosiltransferasa, una glucuronidasa o una expansina o una proteína inducida por celulosa o una proteína integradora de celulosa o proteína similar presente en una composición para su uso en la invención (estas se denominan actividades auxiliares anteriormente).

La "proteasa" incluye enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos (peptidasa), 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 su uso en la invención. Algunos tipos específicos de proteasas incluyen cisteína proteasas incluyendo pepsina, papaína y serina proteasas incluyendo quimotripsinas, carboxipeptidasas y metaloendopeptidasas.

La "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.

La "ligninasa" incluye enzimas que pueden hidrolizar o descomponer la estructura de polímeros de lignina. Las enzimas que pueden descomponer la lignina incluyen lignina peroxidadas, manganeso peroxidadas, lacasas y feruloilsterasas, y otras enzimas descritas en la técnica conocidas por despolimerizar o romper de otro modo los polímeros de lignina. También se incluyen enzimas que pueden hidrolizar enlaces formados entre azúcares hemicelulósicos (notablemente arabinosa) y lignina. Las ligninasas incluyen, aunque sin limitación, el siguiente grupo de enzimas: lignina peroxidadas (EC 1.11.1.14), manganeso peroxidadas (EC 1.11.1.13), lacasas (EC 1.10.3.2) y feruloilsterasas (EC 3.1.1.73).

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

puede tener la capacidad de catalizar la degradación de (1,3)(1,4)glucano y/o celulosa y/o un producto de degradación de celulosa.

La "glucuronidasa" incluye enzimas que catalizan la hidrólisis de un glucuronósido, por ejemplo, β -glucuronósido para producir un alcohol. Muchas glucuronidasas se han caracterizado y pueden ser adecuadas para su uso en la invención, por ejemplo, β -glucuronidasa (EC 3.2.1.31), hialuronoglucuronidasa (EC 3.2.1.36), glucuronosildisulfoglucosamina glucuronidasa, (3.2.1.56) glicirricinato β -glucuronidasa (3.2.1.128) o α -D-glucuronidasa (EC 3.2.1.139).

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

Las expansinas están implicadas en el debilitamiento de la estructura de pared celular durante el crecimiento de la célula vegetal. Las expansinas se han propuesto para alterar los enlaces de hidrógeno entre la celulosa y otros polisacáridos de la pared celular sin tener actividad hidrolítica. De esta manera, se cree que permiten el deslizamiento de fibras de celulosa y el agrandamiento de la pared celular. La swollenina, una proteína de tipo expansina contiene un dominio de la familia 1 de módulo de unión a carbohidrato N terminal (CBD) y un dominio de tipo expansina C terminal. Una proteína de tipo expansina o una proteína de tipo swollenina puede comprender uno o ambos de dichos dominios y/o puede alterar la estructura de las paredes celulares (tal como alterando la estructura de la celulosa), opcionalmente sin producir cantidades detectables de azúcares reductores.

Una composición para su uso en la invención puede ser 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 de tipo escafoldina. Las escafoldinas y proteínas integrantes de celulosa son subunidades integrantes multifuncionales que pueden organizar las subunidades celulolíticas en un complejo multienzimático. Esto se consigue mediante la interacción de dos clases complementarias de dominios, es decir, un dominio de cohesión en escafoldina y un dominio doquerina en cada unidad enzimática. La subunidad escafoldina también alberga un módulo de unión a celulosa (CBM) que media la adhesión del celulosoma a su sustrato. La escafoldina o proteína integrante de celulosa para su uso en la invención puede comprender uno o ambos de dichos dominios.

Una composición para su uso en un proceso de la invención puede estar compuesta de un miembro de cada una de las clases de enzimas mencionadas anteriormente, varios miembros de una clase de enzimas o cualquier combinación de estas clases de enzimas o proteínas auxiliares (es decir, aquellas proteínas mencionadas en este documento que no tienen actividad enzimática *per se*, pero no obstante ayudan en la degradación lignocelulósica).

Una composición para su uso en un proceso de la invención puede estar compuesta de enzimas de (1) proveedores comerciales; (2) genes clonados que expresan enzimas; (3) caldo complejo (tal como el resultante del crecimiento de una cepa microbiana en medio, en el que las cepas secretan proteínas y enzimas en el medio; (4) lisados celulares de cepas cultivadas como en (3); y/o (5) material vegetal que expresa enzimas. Diferentes enzimas en una composición para su uso en la invención pueden obtenerse de diferentes fuentes.

Las enzimas pueden producirse de manera exógena en microorganismos, levaduras, hongos, bacterias o plantas, después aislarse y añadirse, por ejemplo, a materia prima lignocelulósica. Como alternativa, las enzimas se producen, pero no se aíslan, y puede añadirse caldo de fermentación de masa celular en bruto, o material vegetal (tal como rastrojo de maíz o paja de trigo) y similares, por ejemplo, a la materia prima. Como alternativa, la masa celular en bruto o medio de producción de enzimas o material vegetal puede tratarse para evitar el crecimiento microbiano adicional (por ejemplo, por calentamiento o adición de agentes antimicrobianos), después añadirse a, por ejemplo, una materia prima. Estas mezclas enzimáticas en bruto pueden incluir el organismo que produce la enzima. Como alternativa, la enzima puede producirse en una fermentación que usa materia prima (pretratada) (tal como rastrojo de maíz o paja de trigo) para proporcionar nutrición para un organismo que produce una o más enzimas. De esta manera, las plantas que producen las enzimas en sí mismas pueden servir como materia prima lignocelulósica y añadirse a la materia prima lignocelulósica.

En los usos y procesos descritos en este documento, los componentes de las composiciones descritas anteriormente pueden proporcionarse simultáneamente (es decir, como una sola composición *per se*) o por separado o secuencialmente.

Materia lignocelulósica

El material lignocelulósico en este documento incluye cualquier material lignocelulósico y/o hemicelulósico. El material lignocelulósico adecuado para su uso como materia prima en el proceso de la invención incluye biomasa, por ejemplo, biomasa virgen y/o biomasa no virgen tal como biomasa agrícola, productos orgánicos comerciales, desechos de construcción y demolición, residuos sólidos municipales, papel residual y desechos de jardín. Las formas comunes de biomasa incluyen árboles, arbustos y pastos, trigo, paja de trigo, bagaza de caña de azúcar, pasto varilla, miscanto, maíz, rastrojo de maíz, cáscaras de maíz, mazorcas de maíz, tallos de colza, tallos de soja, sorgo dulce, granos de maíz incluyendo fibra de los granos, productos y subproductos de la molienda de cereales tales como maíz, trigo y

cebada (incluyendo molienda en húmedo y molienda en seco) también llamado "salvado o fibra", así como residuos sólidos municipales, papel residual y desechos de jardín. La biomasa también puede ser, aunque sin limitación, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos forestales, residuos sólidos municipales papel residual y residuos de fábricas de pulpa y papel. La "biomasa agrícola" incluye ramas, matorrales, cañas, maíz y cáscaras de maíz, cultivos energéticos, bosques, frutos, flores, granos, pastos, cultivos herbáceos, hojas, corteza, agujas, troncos, raíces, plantones, cultivos leñosos de corta rotación, arbustos, pastos varilla, árboles, hortalizas, pieles de frutos, viñas, pulpa de remolacha azucarera, molienda de trigo, cáscaras de avena y maderas duras y blandas (sin incluir las maderas con materiales perjudiciales). Además, la biomasa agrícola incluye materiales residuales orgánicos generados de los procesos agrícolas incluyendo actividades agropecuarias y forestales, específicamente incluyendo residuos de madera forestal. La biomasa agrícola puede ser cualquiera de los mencionados anteriormente de forma individual o en cualquier combinación o mezcla de los mismos.

Pretratamiento

La materia prima puede pretratarse opcionalmente con calor, modificación mecánica y/o química o cualquier combinación de dichos métodos para potenciar la accesibilidad del sustrato a la hidrólisis enzimática y/o hidrolizar la hemicelulosa y/o solubilizar la hemicelulosa y/o la celulosa y/o la lignina, de cualquier manera, conocida en la técnica. En una realización, el pretratamiento se realiza tratando la lignocelulosa con explosión de vapor, tratamiento con agua caliente o tratamiento con ácido diluido o base diluida.

Etapas de lavado

Opcionalmente, el proceso de acuerdo con la invención comprende una etapa de lavado. La etapa de lavado opcional puede usarse para eliminar los compuestos solubles en agua que pueden actuar como inhibidores para la etapa de fermentación. La etapa de lavado puede realizarse de una manera conocida.

Hidrólisis enzimática

La composición enzimática usada en el proceso de la invención puede hidrolizar de manera extremadamente eficaz el material lignocelulolítico, por ejemplo, rastrojo de maíz o paja de trigo, que después puede convertirse adicionalmente en un producto útil, tal como etanol, biogás, butanol, ácido láctico, un plástico, un ácido orgánico, un disolvente, un complemento de pienso para animales, un producto farmacéutico, una vitamina, un aminoácido, una enzima o una materia prima química. Adicionalmente, pueden usarse productos intermedios de un proceso después de la hidrólisis, por ejemplo, ácido láctico como intermedio en la producción de biogás, como elemento principal para otros materiales. El proceso de la invención se ejemplifica con la producción de etanol, pero esto se hace como ejemplificación únicamente en lugar de como limitación, los otros productos de fermentación útiles pueden producirse igual de bien.

El proceso de acuerdo con la invención comprende una etapa de hidrólisis enzimática como se define en las reivindicaciones.

La hidrólisis enzimática incluye, aunque sin limitación hidrólisis con fines de licuación de la materia prima e hidrólisis con el fin de liberar el azúcar de la materia prima o ambos. En esta etapa, el material lignocelulósico opcionalmente pretratado y opcionalmente lavado se pone en contacto con la composición enzimática como se define en las reivindicaciones.

Dependiendo del material lignocelulósico y el pretratamiento, las diferentes condiciones de reacción, por ejemplo, temperatura, dosificación de enzima, tiempo de reacción de hidrólisis y concentración de materia seca, que es de un 10 % en peso o más, pueden adaptarse por el experto en la materia para conseguir una conversión deseada de lignocelulosa en azúcar. A continuación, se dan algunas indicaciones.

En un aspecto de la invención, la hidrólisis se realiza a una temperatura de 45 °C o más, de 50 °C o más, 55 °C o más, 60 °C o más, 65 °C o más o 70 °C o más. La elevada temperatura durante la hidrólisis tiene muchas ventajas, que incluyen trabajar a la temperatura óptima de la composición enzimática, la reducción del riesgo de contaminación (bacteriana), viscosidad reducida, cantidad más pequeña de agua de refrigeración requerida, uso de agua de refrigeración con una mayor temperatura, reutilización de las enzimas y más.

En un aspecto adicional de la invención, la cantidad de composición enzimática añadida (en este documento también denominada dosificación de enzima o carga de enzima) es baja, y como se define en las reivindicaciones. En las realizaciones de la invención, la cantidad de enzima es de 3 mg de proteína/gramo de materia seca o menor, 2 mg de proteína/gramo de materia seca o menor o 1 mg de proteína/gramo de materia seca o menor (expresada como proteína en mg de proteína/gramo de materia seca). En una realización, la cantidad de enzima es 0,5 mg de enzima/gramo de peso de materia seca o menor, 0,4 mg de composición enzimática/gramo de peso de materia seca o menor, 0,3 mg de enzima/gramo de peso de materia seca o menor, 0,25 mg de enzima/gramo de peso de materia seca o menor, 0,20 mg de enzima/gramo de peso de materia seca o menor, 0,18 mg de enzima/gramo de peso de materia seca o menor, 0,15 mg de enzima/gramo de peso de materia seca o menor o 0,10 mg de enzima/gramo de

peso de materia seca o menor (expresada como el total de enzimas celulasa en mg de enzima/gramo de materia seca). Es posible una baja dosificación de enzima, ya que, debido a la actividad y estabilidad de las enzimas, es posible aumentar el tiempo de reacción de hidrólisis.

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

El pH durante la hidrólisis puede elegirse por experto en la materia. En un aspecto adicional de la invención, el pH durante la hidrólisis puede ser de 3,0 a 6,4. Las enzimas estables de la invención pueden tener un amplio intervalo de pH de hasta 2 unidades de pH, hasta 3 unidades de pH, hasta 5 unidades de pH. El pH óptimo puede estar dentro de los límites de pH 2,0 a 8,0, 3,0 a 8,0, 3,5 a 7,0, 3,5 a 6,0, 3,5 a 5,0, 3,5 a 4,5, 4,0 a 4,5 o es aproximadamente 4,2.
15

En un aspecto adicional de la invención, la etapa de hidrólisis se realiza hasta que se libera un 70 % o más, un 80 % o más, un 85 % o más, un 90 % o más, un 92 % o más, un 95 % o más del azúcar disponible en el material lignocelulósico.
20

Significativamente, un proceso de la invención puede realizarse usando altos niveles de materia seca (del material lignocelulósico) en la reacción de hidrólisis. Por tanto, el proceso de la invención se realiza por un contenido de materia seca de un 10 % en peso o mayor, aproximadamente un 11 % en peso o mayor, aproximadamente un 12 % en peso o mayor, aproximadamente un 13 % en peso o mayor, aproximadamente un 14 % en peso o mayor, aproximadamente un 15 % en peso o mayor, aproximadamente un 20 % en peso o mayor, aproximadamente un 25 % en peso o mayor, aproximadamente un 30 % en peso o mayor, aproximadamente un 35 % en peso o mayor o aproximadamente un 40 % en peso o mayor. En una realización adicional, el contenido de materia seca en la etapa de hidrólisis es de un 14 % en peso, 15 % en peso, 16 % en peso, 17 % en peso, 18 % en peso, 19 % en peso, 20 % en peso, 21 % en peso, 22 % en peso, 23 % en peso, 24 % en peso, 25 % en peso, 26 % en peso, 27 % en peso, 28 % en peso, 29 % en peso, 30 % en peso, 31 % en peso, 32 % en peso, 33 % en peso o más o de un 14 a 33 % en peso.
25
30

Fermentación

El proceso de acuerdo con la invención puede comprender una etapa de fermentación. En un aspecto adicional, la invención, por tanto, incluye en la etapa de fermentación procesos en que se usan microorganismos para la fermentación de una fuente de carbono que comprende uno o más azúcares, por ejemplo, glucosa, L-arabinosa y/o xilosa. La fuente de carbono puede incluir cualquier carbohidrato oligomérico o polimérico que comprende unidades de L-arabinosa, xilosa o glucosa, tal como, por ejemplo, lignocelulosa, xilanos, celulosa, almidón, arabinano y similares. Para la liberación de unidades de xilosa o glucosa de dichos carbohidratos, pueden añadirse carbohidrasas apropiadas (tales como xilanasas, glucanasas, amilasas y similares) al medio de fermentación o pueden producirse por la célula hospedadora modificada. En el último caso, la célula hospedadora modificada puede genomanipularse para producir y excretar dichas carbohidrasas. Una ventaja adicional de usar fuentes oligoméricas o poliméricas de glucosa es que posibilita mantener una concentración baja (o más baja) de glucosa libre durante la fermentación, por ejemplo, usando cantidades limitantes de la velocidad de las carbohidrasas. Esto evitará, a su vez, la represión de sistemas necesarios para el metabolismo y transporte de azúcares que no son glucosa tales como xilosa. En un proceso preferido, la célula hospedadora modificada fermenta tanto la L-arabinosa (opcionalmente xilosa) como la glucosa, preferiblemente de manera simultánea, en cuyo caso se usa preferiblemente una célula hospedadora modificada que es insensible a la represión de glucosa para evitar el crecimiento diaúxico. Además de una fuente de L-arabinosa, opcionalmente xilosa (y glucosa) como fuente de carbono, el medio de fermentación comprenderá además el ingrediente apropiado requerido para el crecimiento de la célula hospedadora modificada. Las composiciones de medios de fermentación para el crecimiento de microorganismos tales como levaduras u hongos filamentosos son bien conocidas en la técnica.
35
40
45
50

El tiempo de fermentación puede ser más corto que en fermentación convencional a las mismas condiciones, en la que parte de la hidrólisis enzimática aún tiene que tomar parte durante la fermentación. En una realización, el tiempo de fermentación es 100 horas o menos, 90 horas o menos, 80 horas o menos, 70 horas o menos o 60 horas o menos, para una composición de azúcar de 50 g/l de glucosa y otros azúcares correspondientes 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.
55
60

El proceso de fermentación puede ser un proceso de fermentación aeróbica o anaeróbica. Un proceso de fermentación anaeróbica en este documento se define como un proceso de fermentación ejecutado en ausencia de oxígeno o en que no se consume sustancialmente nada de oxígeno, preferiblemente se consume menos de 5, 2,5 o 1 mmol/l/h, más preferiblemente 0 mmol/l/h (es decir, el consumo de oxígeno no es detectable) y en el que las moléculas orgánicas sirven como donadoras de electrones y también como aceptadoras de electrones. En ausencia de oxígeno, el NADH producido en la glucólisis y la formación de biomasa no puede oxidarse por fosforilación oxidativa. Para resolver este
65

problema muchos microorganismos usan piruvato o uno de sus derivados como aceptador de electrones e hidrógeno regenerando de ese modo el NAD⁺. Por tanto, en un proceso de fermentación anaeróbico preferido se usa piruvato como aceptador de electrones (y aceptador de hidrógeno) y se reduce en 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-propanodiol, etileno, glicerol, butanol. Un antibiótico de β-lactama y una cefalosporina. En una realización preferida, el proceso de fermentación es anaeróbico. Un proceso anaeróbico es ventajoso ya que es más barato que los procesos aeróbicos: se necesita equipo menos especial. Además, se espera que los procesos anaeróbicos den un rendimiento de producto mayor que los procesos aeróbicos. En condiciones aeróbicas, habitualmente el rendimiento de biomasa es mayor que en condiciones anaeróbicas. Como secuencias, habitualmente en condiciones aeróbicas, el rendimiento de producto esperado es menor que en condiciones anaeróbicas.

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

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

En una realización de la invención, en la etapa la fermentación se realiza con un microorganismo que puede fermentar al menos un azúcar C5. En una realización, el proceso es un proceso para la producción etanol, por el que el proceso comprende la etapa que comprende fermentar un medio que contiene uno o más azúcares con un microorganismo que puede fermentar al menos un azúcar C5, por el que la célula hospedadora puede fermentar glucosa, L-arabinosa y xilosa en etanol. En una realización de la misma, el microorganismo que puede fermentar al menos un azúcar C5 es una levadura. En una realización, la levadura pertenece al género *Saccharomyces*, preferiblemente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, en que se han hecho modificaciones genéticas. Un ejemplo de dicho microorganismo y su preparación se describe en mayor detalle en el documento WO 2008/041840. En una realización, el proceso de fermentación para la producción de etanol es anaeróbico. Anaeróbico ya se ha definido anteriormente en este documento. En otra realización preferida, el proceso de fermentación para la producción de etanol es aeróbico. En otra realización preferida, el proceso de fermentación para la producción de etanol es en condiciones limitadas de oxígeno, más preferiblemente aeróbica y en condiciones limitadas de oxígeno. Las condiciones limitadas de oxígeno ya se han definido anteriormente en este documento.

En dicho proceso, la productividad volumétrica de etanol es de 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 sobre L-arabinosa y opcionalmente xilosa y/o glucosa en el proceso preferiblemente es de al menos un 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 98 %. El rendimiento de etanol en este documento se define como un porcentaje del rendimiento máximo teórico que, para glucosa y L-arabinosa y opcionalmente xilosa es 0,51 g de etanol por gramo de glucosa o xilosa.

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

- son posibles procesos anaeróbicos;
- también son posibles condiciones limitadas de oxígeno;
- pueden obtenerse rendimientos de etanol y tasas de producción de etanol mayores;
- la cepa usada puede usar L-arabinosa y opcionalmente xilosa.

Como alternativa a los procesos de fermentación descritos anteriormente, pueden usarse al menos dos células distintas, esto significa que este proceso es un proceso de cofermentación. Todas las realizaciones preferidas de los procesos de fermentación como se describen anteriormente también son realizaciones preferidas de este proceso de cofermentación: la identidad del producto de fermentación, la identidad de la fuente de L-arabinosa y la fuente de xilosa, las condiciones de fermentación (condiciones aeróbicas o anaeróbicas, condiciones limitadas de oxígeno, temperatura a la que se está realizando el proceso, productividad de etanol, rendimiento de etanol).

El proceso de fermentación puede realizarse sin ninguna necesidad de ajustar el pH durante el proceso. Es decir, el proceso es uno que puede realizarse sin la adición de cualquier ácido o ácidos, o base o bases. Sin embargo, esto excluye una etapa de pretratamiento, donde puede añadirse ácido. El punto es que la composición de la invención puede actuar a bajo pH y, por lo tanto, no hay necesidad de ajustar el pH ácido de una materia prima pretratada con ácido para que pueda tener lugar la sacarificación o hidrólisis. Por consiguiente, un método de la invención, como se

define en las reivindicaciones, puede ser un método de residuos cero que usa únicamente productos orgánicos sin necesidad de introducción de compuestos químicos inorgánicos.

Tiempo de reacción global

5 De acuerdo con la invención, el tiempo de reacción global (o el tiempo de reacción de la etapa de hidrólisis y la etapa de fermentación conjuntamente) 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 horas 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 10 72 horas a un 90 % de rendimiento de glucosa. Por consiguiente, pueden alcanzarse tiempos globales inferiores a un rendimiento de glucosa inferior.

Productos de fermentación

15 Los productos de fermentación que pueden producirse de acuerdo con el proceso de la invención incluyen aminoácidos, vitaminas, productos farmacéuticos, complementos de pienso para animales, productos químicos especiales, materias primas químicas, plásticos, disolventes, combustibles u otros polímeros orgánicos, ácidos láctico y etanol, incluyendo etanol combustible (entendiéndose el término "etanol" incluyendo alcohol etílico o mezclas de alcohol etílico y agua).

20 Productos de valor añadido específicos que pueden producirse por el proceso de la invención incluyen, aunque sin limitación, biocombustibles (incluyendo biogás, etanol y butanol); ácido láctico; ácido 3-hidroxi-propiónico; ácido acrílico; ácido acético; 1,3-propanodiol; etileno; glicerol; un plástico; un producto químico especial; un ácido orgánico, incluyendo ácido cítrico, ácido succínico y ácido maleico; un disolvente, un complemento de pienso para animales; un producto farmacéutico tal como un antibiótico de β -lactama o una cefalosporina; una vitamina; un aminoácido, tal como 25 lisina, metionina, triptófano, treonina y ácido aspártico; una enzima, tal como una proteasa, una celulasa, una amilasa, una glucanasa, una lactasa, una lipasa, una liasa, una oxidorreductasa, una transferasa o una xilanasas; una materia prima química; o un complemento de pienso para animales.

Separación de producto de fermentación

30 El proceso de acuerdo con la invención opcionalmente comprende la recuperación de producto de fermentación. Un producto de fermentación puede separarse del caldo de fermentación de cualquier manera conocida. Para cada producto de fermentación, por tanto, el experto en la materia será capaz de seleccionar una técnica de separación apropiada. Por ejemplo, el etanol puede separarse de un caldo de fermentación de levadura por destilación, por 35 ejemplo, destilación por vapor/destilación al vacío de manera convencional.

Uso de enzimas termoestables en condiciones de temperatura óptima

40 En una realización, la invención se refiere al uso de enzimas termoestables tales como enzimas celulolíticas de *Rasamsonia* para la producción de azúcares reductores a partir de materia prima lignocelulósica pretratada en, aunque sin imitación, la producción de etanol. Las enzimas celulolíticas de *Rasamsonia* aplicadas en materia prima lignocelulósica pretratada mostraron tasas de conversión máxima a temperatura dentro del intervalo de 50 a 70 °C. La 45 enzima permanece activa en estas circunstancias durante 14 días y más sin cese completo de la actividad.

Usando condiciones de temperatura óptima, puede liberarse la cantidad máxima de azúcares reductores de la materia prima (hidrólisis total) dentro del tiempo de hidrólisis más corto posible. De esta manera, se consigue un 100 % de conversión de celulosa en glucosa en menos de 5 días.

50 El rendimiento máximo teórico (Yps máx. en g de producto por gramo de glucosa) de un producto de fermentación puede obtenerse de un libro de texto de bioquímica. Para el etanol, 1 mol de glucosa (180 g) produce, de acuerdo con la ruta de fermentación de glucólisis normal en levadura 2 moles de etanol ($=2 \times 46 = 92$ g de etanol). El rendimiento teórico máximo de etanol sobre glucosa es, por lo tanto, $92/180 = 0,511$ g de etanol/gramo de glucosa.

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

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

Para otros productos de fermentación puede hacerse un cálculo similar.

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

*Compensación de la dosificación enzimática menor con un tiempo de hidrólisis prolongado usando enzimas de *Rasamsonia**

Debido a la alta estabilidad de las enzimas estables, las actividades no cesan en el tiempo, aunque se liberan menos azúcares reductores en el transcurso de la hidrólisis. Es posible reducir la dosificación de enzima y prolongar el uso de la enzima prolongando los tiempos de hidrólisis para obtener niveles similares de azúcares reductores liberados. Por ejemplo, 0,175 ml de enzima por gramo de materia seca de materia prima provocó liberación de aproximadamente un 90 % del máximo teórico de azúcares reductores a partir de materia prima pretratada en 72 h. Cuando se usan 0,075 ml de enzima/gramo de materia seca de materia prima, se consigue aproximadamente un 90 % de conversión del máximo teórico en 120 h. Los resultados muestran que, a causa de la estabilidad de la actividad enzimática, la reducción de la dosificación de enzima puede compensarse prolongando el tiempo de hidrólisis para obtener la misma cantidad de azúcares reductores. Lo mismo se mantiene para la hidrólisis de materia prima pretratada a contenidos de materia seca mayores de un 10 %, que muestra ese efecto compensador del tiempo de hidrólisis prolongado a un 15 % de materia seca de materia prima.

La reducción de costes conseguida usando enzimas celulolíticas estables, tales como de *Rasamsonia*, es el resultado de requerir menos dosificación de enzima, provocando rendimientos de conversión de hidrólisis similares.

Reducción del riesgo de contaminación con enzimas estables

En un proceso común para convertir material lignocelulósico en etanol, las etapas del proceso se hacen preferiblemente en condiciones sépticas para reducir los gastos operativos. La contaminación y crecimiento de microorganismos contaminantes, por lo tanto, puede producirse y provocar efectos secundarios indeseables, tales como producción de ácido láctico, ácido fórmico y ácido acético, pérdidas de rendimiento de etanol sobre el sustrato, producción de toxinas y polisacáridos extracelulares, que pueden afectar a los costes de producción significativamente. Una alta temperatura del proceso y/o un tiempo corto del proceso limitarán el riesgo de contaminación durante la hidrólisis y la fermentación. Enzimas termoestables, como las de *Rasamsonia*, pueden hidrolizar materia prima lignocelulósica a temperaturas de más de 60 °C. A estas temperaturas, el riesgo de que un microorganismo contaminante cause efectos secundarios indeseados será de pequeño a casi cero.

Durante la etapa de fermentación, en que se produce etanol, las temperaturas típicamente están entre 30 y 37 °C, y preferiblemente no se elevarán a causa de las pérdidas de producción. Aplicando tiempos del proceso de fermentación lo más cortos posibles, se reducirán los riesgos y efectos de contaminación y/o el crecimiento de contaminantes lo más posible. Con enzimas estables, como las de *Rasamsonia*, pueden aplicarse tiempos de fermentación lo más cortos posibles (véase, la descripción anterior) y, por tanto, se reducirán los riesgos de contaminación y/o crecimiento de contaminantes lo más posible. La reducción de costes conseguida con la aplicación de enzimas celulolíticas termoestables de *Rasamsonia* de esta manera será el resultado de un menor riesgo de fallos en el proceso debido a la contaminación.

Las enzimas estables reducen los costes de refrigeración y aumenta la productividad de las plantas de etanol

La primera etapa después del pretratamiento térmico será refrigerar la materia prima pretratada hasta temperaturas donde las enzimas sean activas óptimas. A gran escala, esto se hace típicamente añadiendo agua (refrigerada) que reducirá, además de disminuir la temperatura, el contenido de materia seca. Usando enzimas termoestables, como las de *Rasamsonia*, puede conseguirse una reducción de costes por el hecho de que (i) se requiere menos refrigeración de la materia prima pretratada ya que se permiten temperaturas mayores durante la hidrólisis y (ii) se añadirá menos agua, que aumentará el contenido de materia seca durante la hidrólisis y la fermentación y, por tanto, aumentará la capacidad de producción de etanol (cantidad producida por unidad de tiempo por volumen) de una planta de etanol. Además, usando enzimas termoestables de acuerdo con la invención, como las de *Rasamsonia*, también puede conseguirse una reducción de costes usando agua de refrigeración que tenga mayor temperatura que el agua que se usa en un proceso con enzima no termoestable.

Reciclado de enzimas después de hidrólisis con enzimas estables

Al final de la hidrólisis, las actividades enzimáticas parecen ser bajas ya que se liberan pocos azúcares reductores una vez se ha convertido casi toda la celulosa. La cantidad de actividad enzimática presente, sin embargo, ha disminuido solamente un poco, supuestamente debido principalmente a la absorción de las enzimas en el sustrato. Aplicando separación de sólidos-líquidos después de la hidrólisis, tal como centrifugación, filtración, sedimentación-decantación, etc., puede recuperarse un 60 % o más, por ejemplo, un 70 % de la actividad enzimática en solución y reutilizarse para la hidrólisis de una nueva materia prima lignocelulósica pretratada durante la siguiente hidrólisis.

Además, después de la separación de sólidos-líquidos, la enzima en solución puede separarse de la solución que contiene azúcares reductores y otros productos de hidrólisis de las acciones enzimáticas. Esta separación puede hacerse, aunque sin limitación, por (ultra y micro)filtración, centrifugación, sedimentación-decantación, sedimentación, con o sin una primera adsorción de la enzima a un vehículo de cualquier tipo.

Por ejemplo, después de la hidrólisis de la materia prima pretratada con 0,175 ml/g de carga enzimática de materia seca de materia prima durante 20 h, se libera un 50 % de la cantidad máxima teórica de azúcares reductores y después de la misma hidrólisis durante 72 h, se libera un 90 % de la cantidad máxima teórica de azúcares reductores. Por centrifugación y ultrafiltración, se recuperó un 60-70 % de la actividad enzimática en el retenido, mientras que el filtrado contenía más de un 80 % de los azúcares reductores liberados. Reutilizando el retenido, tal cual o después de purificación y/o concentración adicional, la dosificación de enzima durante la siguiente etapa de hidrólisis puede reducirse con un 60 a un 70 %. La reducción de costes conseguida usando enzimas celulolíticas estables, tales como de *Rasamsonia*, de esta manera es el resultado de requerir menos dosificación de enzima.

5
10 *Reciclado de enzimas después de hidrólisis en combinación con producción de enzimas y reciclado de células de levadura con enzimas estables*

El proceso que incluye reciclado de enzimas después de la hidrólisis, como se describe anteriormente, puede combinarse con reciclado del microorganismo que produce etanol después de la fermentación y con el uso del filtrado que contiene azúcares reductores como sustrato (purificado y/o concentrado o diluido) en fermentación de producción de enzimas y como sustrato para el cultivo del microorganismo productor de etanol.

15

Reciclado de enzimas después de destilación al vacío con enzimas estables

20 La termoestabilidad de las enzimas, como las de *Rasamsonia*, causa actividad celulolítica restante después de la hidrólisis, fermentación y destilación al vacío en el residuo de destilación fino. La actividad total de la enzima se reduce durante tres etapas sucesivas del proceso. El residuo de destilación fino obtenido después de destilación al vacío, por tanto, puede reutilizarse como fuente de enzima para un ciclo del proceso de hidrólisis-fermentación-destilación recién iniciado de conversión de paja de trigo pretratada en etanol. El residuo de destilación fino puede usarse en forma concentrada o (no) diluida y/o purificada y con o sin complementación de enzimas adicionales.

25

Reciclado de enzimas en combinación con complementación de enzimas después de destilación al vacío con enzimas termoestables

30 En un proceso óptimo, se complementa una cantidad de enzima en el residuo de destilación fino, antes de su reutilización en un nuevo ciclo del proceso, igual a la cantidad actividad perdida durante las tres etapas sucesivas del proceso del ciclo previo del proceso. De esta manera, se evita la sobredosificación de enzima y, por tanto, se obtiene un uso más eficaz de las enzimas.

35 Además, proporcionando una alta dosificación de enzima en el primer ciclo del proceso, y complementando la enzima igual a la cantidad de la actividad perdida durante las tres etapas sucesivas del proceso en los siguientes ciclos del proceso, pueden obtenerse tasas de hidrólisis lo más altas posibles en cada ciclo del proceso produciendo tiempos de hidrólisis cortos de menos de 48 h en combinación con el uso más eficaz de enzimas.

40 *Uso de enzimas estables en sistemas mezclados*

Aplicando mezcla durante la hidrólisis, las enzimas pueden entrar en contacto más a menudo con los sustratos, lo que provoca un uso más eficaz de la actividad catalítica. Esto provocará dosificaciones menores de enzima y, por tanto, menores costes, salvo que la mezcla tenga un efecto negativo sobre las enzimas. Las enzimas estables, como las enzimas termoestables de *Rasamsonia*, son robustas y pueden resistir circunstancias de cizalla y temperaturas altas (localmente), que es el caso durante la mezcla intensiva de las suspensiones. El uso de ello en sistemas mezclados, por lo tanto, es beneficioso y dará lugar a reducción de la dosificación y, por tanto, de los costes.

45

Ejemplos

50 Información experimental

Cepas

55 La cepa de *Rasamsonia (Talaromyces) emersonii* se depositó en CENTRAAL BUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES, Uppsalalaan 8, P.O. Box 85167, NL-3508 AD Utrecht, Países Bajos en diciembre de 1964 que tiene el número de acceso CBS 393.64. Otras cepas adecuadas pueden usarse igualmente en los presente ejemplos para mostrar el efecto y las ventajas de la invención. Por ejemplo, TEC-101, TEC-147, TEC-192, TEC-201 o TEC-210 son cepas de *Rasamsonia* adecuadas que se describen en el documento WO 2011/000949.

60 Preparación de sustrato de rastrojo de maíz pretratado con ácido

Se obtuvo rastrojo de maíz pretratado con ácido diluido (aCS) como se describe en Schell, D.J., Applied Biochemistry and Biotechnology (2003), vol. 105-108, pág. 69-85. Se usó un reactor de pretratamiento a escala piloto que funciona en condiciones en equilibrio de 190 °C, 1 min de tiempo de residencia y una concentración eficaz de ácido H₂SO₄ de un 1,45 % (p/p) en la fase líquida.

65

Ensayos de medición de proteína

1. Proteína total

5

Biuret de TCA

10 El método fue una combinación de precipitación de proteína usando ácido tricloro acético (TCA) para eliminar las sustancias alteradoras y permitir la determinación de la concentración de proteína con la reacción de Biuret colorimétrica. La reacción de Biuret, se reduce un ion de cobre (II) en cobre (I), que forma un complejo con los nitrógenos y carbonos de los enlaces peptídicos en una solución alcalina. Un color violeta indica la presencia de proteínas. La intensidad del color y, por tanto, la absorción a 546 nm, es directamente proporcional a la concentración de proteína, de acuerdo con la ley de Beer y Lambert. La normalización se realizó usando BSA (seroalbúmina bovina) y el contenido de proteína se expresó en gramo de proteína como equivalente de BSA/l o mg de proteína como equivalente de BSA/ml. El contenido de proteína se calculó usando protocolos de cálculo convencionales conocidos en la técnica, representando la DO_{546} frente a la concentración de muestras con concentración conocida, seguido del cálculo de la concentración de las muestras desconocidas usando la ecuación generada a partir de la línea de calibración.

20 2. Proteínas individuales usando PAGE

SDS-PAGE con pretratamiento de muestra

25 Basándose en la concentración de proteína estimada de las muestras, se realizó la siguiente preparación de muestras. A 10 μ l de muestra se le añadieron 40 μ l de agua MilliQ y 50 μ l de TCA (20 %) para diluir la muestra cinco veces (~1 mg/ml) y precipitar las proteínas. Después de 1 hora en hielo, la muestra se centrifugó (10 minutos, 14 000 r.p.m.). el sedimento se lavó con 500 μ l de acetona y se centrifugó (10 minutos, 14 000 r.p.m.). el sedimento se trató como se describe a continuación.

30 SDS-PAGE

35 El sedimento se disolvió en 65 μ l del agua MilliQ, 25 μ l de tampón de muestra LDS NuPAGE™ (4x) de Invitrogen y 10 μ l de agente reductor de muestra NuPAGE™ (10x) de Invitrogen. Antes de la etapa de desnaturalización, la muestra se diluyó 5 veces usando una mezcla de MilliQ; tampón de muestra LDS NuPAGE™ y 10 μ l de reductor de muestra NuPAGE™ en la relación de 65:25:10. Después de la mezcla, las muestras se incubaron en una termomezcladora durante 10 minutos a 70 °C. Las soluciones de muestras se aplicaron en un gel de Bis-Tris al 4-12 % (NuPAGE™ BisTris, Invitrogen). También se aplicó una muestra (10 μ l) de marcador M12 (Invitrogen) en el gel. El gel se procesó a 200 V durante 50 minutos, usando el XCELL Surelock, con 600 ml de tampón SDS diluido 20x en la cámara de tampón exterior y 200 ml de tampón SDS diluido 20x, que contenía 0,5 ml de antioxidante (NuPAGE™ Invitrogen) en la cámara de tampón interior. Después de procesarlo, el gel se aclaró dos veces con agua desmineralizada, los geles se fijaron con solución de metanol al 50 %/ácido acético al 7 % durante una hora y se tiñeron con Sypro Ruby (50 ml por gel) durante una noche. Se tomó una imagen usando el Typhoon 9200 (610 BP 30, Verde (532 nm), PMT 600V, 100 μ m) después de lavar el gel con agua MilliQ.

45 Análisis cuantitativo de la proteína

50 Usando el lector Typhoon se determinó la relación entre las bandas de proteína dentro de un carril usando métodos convencionales conocidos en la técnica. La muestra se aplicó por triplicado y se determinaron los valores de gray usando el programa Image quant. Los valores se expresan como el % relativo de proteína respecto a la proteína total, calculado usando el valor de gray de la banda de proteína seleccionada con respecto al valor de gray total de todas las bandas de proteína.

Cálculo de conversión de glucano:

55 $\% \text{ de conversión de glucano (\%)} = (\text{glucosa (g/l)} \times 100 \%) / (\text{glucano (fracción en DM)} \times \text{dm (g/kg)} \times 1,1)$
 En la que:
 glucosa (g/l) = concentración de glucosa en el sobrenadante después de la hidrólisis.
 glucano (fracción en dm) = contenido de glucano del sustrato antes del pretratamiento.
 dm (g/kg) = materia seca de hidrólisis (f.i. 20 % dm = 200 g/kg).
 1,1 = aumento de peso debido a la incorporación de agua durante la hidrólisis.

Cálculo de ejemplo:

glucosa = 60 g/l
 fracción de glucano = 0,40 (es un 40 % sobre materia seca)
 dm = 200 g/kg
 ejemplo de conversión de glucano = $(60 \times 100) / (0,4 \times 200 \times 1,1) = 68 \%$ de conversión

Ejemplo 1

5 Evaluación del efecto de la ausencia de oxígeno durante la hidrólisis sobre la actividad celulolítica de cócteles de enzimas celulasa

10 El efecto de la ausencia de oxígeno durante la hidrólisis sobre la actividad celulolítica de tres cócteles de enzimas diferentes se evaluó de acuerdo con los procedimientos descritos a continuación. Las reacciones de hidrólisis se realizaron con materia prima de rastrojo de maíz pretratado con ácido (aCS) a una concentración final de un 10 % p/p de DM. Esta solución de materia prima se preparó mediante la dilución de una solución de materia prima concentrada con agua. Posteriormente el pH se ajustó hasta pH 4,5 con una solución de NaOH 4 M. La eliminación de oxígeno de la materia prima se consiguió en dos etapas. En primer lugar, la solución de materia prima se desgasificó mediante sonicación al vacío en un baño de sonicación (Bransonic 5510E-DTH, configuración; Degas) durante 15 minutos. En la segunda etapa, se retiró adicionalmente el oxígeno mediante rociado continuo de un flujo de nitrógeno a través de una solución de 500 ml de la materia prima a un 10 % de DM durante un periodo de 3 horas. Antes de rociarse a través de la solución de materia prima, el flujo de nitrógeno se roció a través de agua para saturarlo con vapor de agua y evitar la evaporación del agua de la solución de materia prima. En paralelo, se rociaron 500 ml del mismo lote de aCS al 10 % p/p de DM con aire como muestra de control que contiene oxígeno en una configuración similar y de acuerdo con el mismo protocolo.

20 La hidrólisis de las soluciones de materia prima al 10 % p/p de aCS con oxígeno reducido (rociada con nitrógeno) y saturada con oxígeno (rociada con aire) se realizó en frascos de centrifuga de 30 ml estancos al aire (Nalgene Oakridge) en un volumen de reacción total de 10 ml. Los frascos, que ya contenían la solución de celulasa, usados para el experimento de oxígeno reducido se rociaron con nitrógeno antes y durante el llenado de los mismos con materia prima. Cada hidrólisis se realizó por duplicado con 7,5 mg/g de cóctel de enzimas celulasa DM añadida en un volumen total no mayor de 375 µl. Los tres cócteles de enzimas celulasa ensayados incluyeron: mezcla TEC-210 (mezcla de celulosas), una mezcla 4E-GH61 (que consiste en un 9 % p/p de proteína total BG, un 30 % p/p de proteína total CBHI, un 25 % p/p de proteína total CBHII y un 36 % p/p de proteína total GH61) y una mezcla 4E-EG (que consiste en un 9 % p/p de proteína total BG, un 30 % p/p de proteína total CBHI, un 25 % p/p de proteína total CBHII y un 36 % p/p de proteína total EG). TEC-210 se fermentó de acuerdo con los procedimientos de inoculación y fermentación descritos en el documento WO 2011/000949. Se usó la mezcla 4E (como se describe en el documento WO 2011/098577).

35 Los frascos de centrifuga que contenían la materia prima y la solución de enzima se colocaron en una incubadora de horno (horno de hibridación Techne HB_1D) y se incubaron durante 72 horas a 65 °C mientras se rotaban en el punto establecido 3 (12 r.p.m. por minuto). Después de la hidrólisis, las muestras se refrigeraron en hielo y se diluyó inmediatamente 50 µl de cada sobrenadante en 1450 µl de agua de calidad I. El sobrenadante diluido se filtró posteriormente (filtro de 0,45 µm, Pall PN 454) y los filtrados se analizaron para el contenido de azúcar como se describe a continuación.

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

45 Los datos presentados en la tabla 1/figura 1 muestran que la glucosa liberada de las materias primas rociadas con nitrógeno es menor que la glucosa liberada de las materias primas rociadas con aire para las incubaciones tanto de la mezcla TEC-210 como de la mezcla 4E-GH61. No hay diferencia en la liberación de glucosa detectable entre las materias primas rociadas con nitrógeno y aire para muestras hidrolizadas por la mezcla 4E-EG.

50 Basándose en estos resultados, se concluyó que la presencia de oxígeno mejora el rendimiento celulolítico de las mezclas de celulasa que contienen enzimas GH61.

Cóctel de celulasa	Rociada con aire Promedio de glucosa (g/l)	Desviación típica	Rociado con N ₂ Promedio de glucosa (g/l)	Desviación típica
TEC-210	34,5	0,8	31,9	1,1
Mezcla 4E-GH61	31,7	1,4	27,4	0,1
Mezcla 4E-EG	22,7	0,1	23,3	1,7

55 Tabla 1: El efecto de rociar nitrógeno o aire a través de una materia prima al 10 % de aCS antes de la hidrólisis, sobre la cantidad total de glucosa liberada por tres mezclas de celulasa diferentes.

Ejemplo 2

El efecto del oxígeno sobre la actividad celulolítica de cócteles de enzimas celulasa durante la hidrólisis de materia prima lignocelulósica

El efecto del oxígeno sobre la actividad celulolítica del cóctel de enzimas durante la hidrólisis de materia prima lignocelulósica se muestra en este ejemplo. Las reacciones de hidrólisis se realizan con materia prima de rastrojo de maíz (aCS) pretratado con ácido a una concentración final de un 20 % p/p de DM. Esta solución de materia prima se prepara mediante la dilución de una solución de materia prima concentrada con agua. Posteriormente, el pH se ajusta hasta pH 4,5 con una solución de NH₄OH al 10 % (p/p).

La hidrólisis se hace en un reactor agitado de pH controlado y temperatura controlada con un volumen de trabajo de 1 l. Cada hidrólisis se realiza por duplicado con cóctel de enzimas celulasa TEC-210 de 2,5 mg/g de DM. TEC-210 se produjo de acuerdo con los procedimientos de inoculación y fermentación descritos en el documento WO 2011/000949.

Se hacen los siguientes experimentos:

1. 1 l de aCS al 20 %, pH 4,5, temperatura 62 °C, velocidad del agitador 60 r.p.m. (esto corresponde con un nivel de DO de <0,002 moles de oxígeno por m³), 2,5 mg/g de dm de cóctel de celulasa TEC-210, tiempo de incubación 120 horas (experimento de referencia).
2. Como el experimento 1, pero al inicio de la hidrólisis, rociado de aire en la solución empezando a un nivel de oxígeno disuelto de un 20 % (esto corresponde a 0,03 moles de oxígeno por m³, medido usando un electrodo de DO (oxígeno disuelto)). Este nivel de oxígeno disuelto se mantiene durante todo el resto del proceso de hidrólisis.
3. Como el experimento 1, pero a las 72 horas rociado de aire en la solución empezando a un nivel de oxígeno disuelto de un 20 % (esto corresponde a 0,03 moles de oxígeno por m³, medido usando un electrodo de DO (oxígeno disuelto)). Este nivel de oxígeno disuelto se mantiene durante todo el resto del proceso de hidrólisis.

Después de la hidrólisis, las muestras se refrigeran en hielo e inmediatamente se diluyen 50 µl de cada sobrenadante en 1450 µl de agua de calidad I. El sobrenadante diluido posteriormente se filtra (filtro de 0,45 µm, Pall PN 454) y los filtrados se analizan para el contenido de azúcar como se describe a continuación.

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

Los resultados, visibles en la figura 2, muestran claramente una producción de glucosa aumentada en caso de que se añada aire. Además, el aire añadido a la reacción de hidrólisis en la segunda parte del tiempo demuestra producción superior de glucosa en comparación con ausencia de adición de aire o una adición de aire durante la etapa de hidrólisis completa.

Ejemplo 3

El efecto de aireación parcial (en el tiempo) sobre la hidrólisis enzimática de materia prima lignocelulósica a escala piloto

El efecto de la concentración de oxígeno disuelto sobre la actividad celulolítica del cóctel o composición de enzimas durante la hidrólisis de materia prima lignocelulósica a escala piloto se muestra en este ejemplo. Las reacciones de hidrólisis se realizan con materia prima de rastrojo de maíz pretratada con ácido (aCS) a una concentración final de un 20 % p/p de DM. La solución de materia prima se prepara mediante la dilución de suspensión de materia prima concentrada con agua. El pH se ajusta a pH 4,5 con una solución de NH₄OH al 25 % p/p.

La hidrólisis enzimática se hace en un reactor piloto de 270 litros que tiene el pH y la temperatura controlados con un volumen de trabajo de 150 litros. El oxígeno disuelto durante el proceso se controla ajustando la velocidad del impulsor a un flujo de aire dado y sobre presión. La hidrólisis enzimática se realiza a una dosificación de 2,5 mg (proteína TCA)/g de cóctel de enzimas celulasa dm TEC-210. TEC-210 se produjo de acuerdo con los procedimientos de inoculación y fermentación descritos en el documento WO 2011/000949.

Se hacen los siguientes experimentos:

Experimento 1

Aireación de 0 a 120 horas: 150 l de pCS al 20 %, pH 4,5, temperatura 62 °C, sobrepresión de 1 bar, flujo entrante de 10 kg/h en el espacio vacío, 3,75 mg de TCA/g de cóctel de celulasa dm TEC-210, tiempo de incubación 120 horas en un reactor piloto de 270 litros. La concentración de oxígeno disuelto (DO) de la mezcla de reacción se

midió constantemente usando un electrodo de DO. La DO se controló a un nivel de 0,15-0,22 mol/m³ ajustando la velocidad del impulsor.

Experimento 2

5 Aireación entre 72 y 120 horas: 150 l de pCS al 20 %, pH 4,5, temperatura 62 °C, una dosificación de enzima de 2,50 mg de TCA/g de cóctel de celulasa dm TEC-210 y un tiempo de incubación total 120 horas en un reactor piloto de 270 litros. La concentración de oxígeno disuelto (DO) de la mezcla de reacción se midió constantemente usando un electrodo de DO. Durante las primeras 72 horas del proceso se aplicaron los siguientes ajustes: sin sobrepresión, sin flujo de aire en el espacio vacío y la DO se controló a un nivel de [0,02-0,05] mol/m³ ajustando la velocidad del impulsor. Durante las últimas 48 horas del proceso, se aplicaron los siguientes ajustes: sobrepresión de 1 bar, 10 kg/h de flujo de aire en el espacio vacío y la DO se controló a un nivel de 0,15-0,22 mol/m³ ajustando la velocidad del impulsor.

15 Durante la hidrólisis enzimática, se toman muestras diariamente para el análisis de carbohidratos (glucosas, celobiosa) por RMN y medición de la viscosidad y el pH.

El análisis de la composición del rastrojo de maíz pretratado se hizo por hidrólisis química de la muestra y determinación de los monosacáridos por RMN.

20 Las muestras tomadas durante la hidrólisis enzimática se analizaron para (oligo)azúcares, ácidos orgánicos e inhibidores por RMN de flujo.

25 Los resultados se presentan en la figura 4 y muestran que durante la hidrólisis enzimática en el experimento 2 con la aireación parcial (□ = el tiempo de aireación entre hidrólisis es 72 y 100 horas) se produce más glucosa que durante la hidrólisis enzimática en el experimento 1 (■ = el tiempo de aireación entre hidrólisis es 0 y 100 horas).

Ejemplo 4

30 El efecto del momento de suministro de oxígeno disuelto sobre la hidrólisis enzimática de materia prima lignocelulósica

El efecto del momento de suministro de oxígeno disuelto sobre la hidrólisis enzimática de materia prima lignocelulósica se muestra en este ejemplo. Las reacciones de hidrólisis se realizan con materia prima de rastrojo de maíz pretratado con ácido (aCS) a una concentración final de un 20 % p/p de DM. La solución de materia prima se prepara mediante la dilución de suspensión de materia prima concentrada con agua. El pH se ajusta a pH 4,5 con una solución de NH₄OH al 25 % (p/p).

35 La hidrólisis enzimática se hace en un reactor de 2 litros que tiene el pH y la temperatura controlados con un volumen de trabajo de 1 litro. El oxígeno disuelto durante el proceso se controla ajustando la velocidad del impulsor y renovación continua del espacio vacío con aire fresco en caso de una concentración de oxígeno disuelto aumentada. La hidrólisis enzimática se realiza a una dosificación de 1,5 mg (proteína TCA)/g de cóctel de enzimas celulasa dm TEC-210. TEC-210 se produjo de acuerdo con los procedimientos de inoculación y fermentación descritos en el documento WO 2011/000949.

45 Se hacen los siguientes experimentos:

Experimento 1. Aireación de 0 a 7 horas: 1 l de pCS al 20 %, pH 4,5, temperatura 62 °C, 1,5 mg de TCA/g de cóctel de celulasa dm TEC-210, tiempo de incubación 120 horas. La concentración de oxígeno disuelto (DO) de la mezcla de reacción se midió constantemente usando un electrodo de DO. La DO se controló a un nivel de >0,05 mol/m³ durante las primeras 7 horas del proceso de hidrólisis. Entre 7 y 120 horas de tiempo de hidrólisis se mantuvo la DO a un nivel de <0,02 mol/m³.

50 Experimento 2. Aireación entre 72 y 120 horas: 1 l de pCS al 20 %, pH 4,5, temperatura 62 °C, 1,5 mg de TCA/g de cóctel de celulasa dm TEC-210, tiempo de incubación 120 horas. La concentración de oxígeno disuelto (DO) de la mezcla de reacción se midió constantemente usando un electrodo de DO. La DO se controló a un nivel de <0,01 mol/m³ durante las primeras 72 horas del proceso de hidrólisis. Entre 72 y 120 horas de tiempo de hidrólisis se mantuvo la DO a un nivel de >0,05 mol/m³.

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

El análisis de la composición del rastrojo de maíz pretratado se hizo por hidrólisis química de la muestra y determinación de los monosacáridos por RMN.

65 Los resultados se presentan en la figura 5 y demuestran claramente un aumento en la tasa de formación de glucosa cuando se airea la mezcla de reacción. El experimento 1, que se aireó entre 0 y 7 horas, muestra claramente una tasa de formación de glucosa aumentada durante las primeras 7 horas del proceso en comparación con la situación no

aireada durante esa fase del proceso del experimento 2. Además, el experimento 2 demuestra una tasa de formación de glucosa aumentada entre 72 y 120 horas en comparación con la situación no aireada durante ese periodo en el experimento 1.

5 **Ejemplo 5**

El efecto del oxígeno sobre la actividad celolítica de composiciones de enzimas celulasa durante la hidrólisis de materia prima lignocelulósica usando una baja dosificación de enzima

10 El efecto del oxígeno sobre la actividad celolítica de la composición enzimática usando una baja dosificación de enzima durante la hidrólisis de materia prima lignocelulósica se muestra en este ejemplo. Las reacciones de hidrólisis se realizan con materia prima de rastrojo de maíz pretratado con ácido (aCS) a una concentración final de un 20 % p/p de DM. Esta solución de materia prima se prepara mediante la dilución de una solución de materia prima concentrada con agua. Posteriormente, el pH se ajusta a pH 4,5 con una solución de NH₄OH al 10 % (p/p). El contenido de glucano del rastrojo de maíz aplicado fue de 37 % sobre materia seca.

15 La hidrólisis se hace en un reactor agitado de pH controlado y temperatura controlada con un volumen de trabajo de 1 l. Cada hidrólisis se realiza por duplicado con 2,5 mg/g de DM de composición (o cóctel) de enzimas celulasa TEC-210. TEC-210 se produjo de acuerdo con los procedimientos de inoculación y fermentación descritos en el documento WO 2011/000949.

Se hacen los siguientes experimentos:

- 25 1. 1 l de aCS al 20 %, pH 4,5, temperatura 62 °C, velocidad del agitador 60 r.p.m. 3,5 mg de composición de celulasa TEC-210 por gramo de materia prima (sobre materia seca), tiempo de incubación 120 horas (experimento de referencia) en un reactor cerrado. El nivel de oxígeno disuelto de la mezcla de reacción se midió constantemente usando un electrodo de DO. Esta agitación lenta produjo un nivel de oxígeno disuelto de 0,005 mol/m³.
- 30 2. Como el experimento 1, pero usando una dosificación de enzima de 2,5 mg de TEC-210 por gramo de materia prima (sobre materia seca) y una velocidad del agitador de 250 r.p.m., un espacio vacío sobre la mezcla de reacción que se renueva constantemente con aire fresco. La mayor velocidad de agitación en combinación con la renovación del espacio vacío con aire fresco provocó un nivel de oxígeno disuelto de 0,030 mol/m³ en la mezcla de reacción.

35 Durante la hidrólisis, se tomaron muestras para el análisis. Las muestras se refrigeraron en hielo e inmediatamente se diluyen 50 µl de cada sobrenadante en 1450 µl de agua de calidad I. El sobrenadante diluido se filtra posteriormente (filtro de 0,45 µm, Pall PN 454) y los filtrados se analizan para el contenido de azúcar como se describe a continuación.

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

45 Los resultados se presentan en la figura 6.

Las conversiones de glucano se enumeran en la tabla 2

Tabla 2: niveles de conversión de glucano.

Experimento	Dosificación de enzima (mg/g de dm)	Nivel de DO mol/m ³	Conversión de glucano (%)
1	2,5	0,030	75
2	3,5	0,005	70

50

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la preparación de un producto de azúcar a partir de material lignocelulósico, que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) opcionalmente, pretratamiento del material lignocelulósico,
- b) opcionalmente, lavado del material lignocelulósico opcionalmente pretratado,
- c) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado usando una composición enzimática que comprende al menos dos celulasas y por la que la composición enzimática comprende al menos GH61,
- 10 d) por el que se usa entre 0,1 y 7,5 mg de composición enzimática/gramo de glucano (sobre materia seca y enzima como proteína) o entre 0,05 y 3,0 mg de composición enzimática/gramo de materia prima (sobre materia seca y enzima como proteína), y
- e) opcionalmente recuperación del producto de azúcar;

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

2. Proceso para la preparación de un producto de fermentación a partir de material lignocelulósico, que comprende las siguientes etapas:

- 20 a) opcionalmente, pretratamiento del material lignocelulósico,
- b) opcionalmente, lavado del material lignocelulósico opcionalmente pretratado,
- c) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado usando una composición enzimática que comprende al menos dos celulasas y por la que la composición enzimática comprende al menos GH61,
- 25 d) por el que se usa entre 0,1 y 7,5 mg de composición enzimática/gramo de glucano (sobre materia seca y enzima como proteína) o entre 0,05 y 3,0 mg de composición enzimática/gramo de materia prima (sobre materia seca y enzima como proteína), y
- e) fermentación del material lignocelulósico hidrolizado para producir un producto de fermentación, y
- f) opcionalmente, recuperación del producto de fermentación,

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

3. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el oxígeno se añade en forma de burbujas.

35 4. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que, durante parte del tiempo de la hidrólisis enzimática, se añade oxígeno al material lignocelulósico y durante parte del tiempo de la hidrólisis enzimática, se añade menos oxígeno al material lignocelulósico en comparación con la otra parte del tiempo de la hidrólisis enzimática.

5. Proceso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el tiempo de hidrólisis enzimática es de 5 a 150 horas.

40 6. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la composición enzimática usada retiene actividad durante 30 horas o más.

7. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la hidrólisis se realiza a una temperatura de 45 °C o más.

8. Proceso de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la composición enzimática se obtiene de un hongo o la composición enzimática comprende una enzima fúngica.

45 9. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el contenido de materia seca en la etapa de hidrólisis (c) es de un 14 % en peso o más.

10. Proceso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el contenido de materia seca en la etapa de hidrólisis (c) es de 14 a un 33 % en peso.

50 11. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en que la hidrólisis enzimática tiene lugar en un reactor de cultivo discontinuo, semicontinuo y/o continuo.

12. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en que se introduce oxígeno como un gas que contiene oxígeno.

13. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en el que la fermentación se realiza con un microorganismo que puede fermentar al menos un azúcar C5.

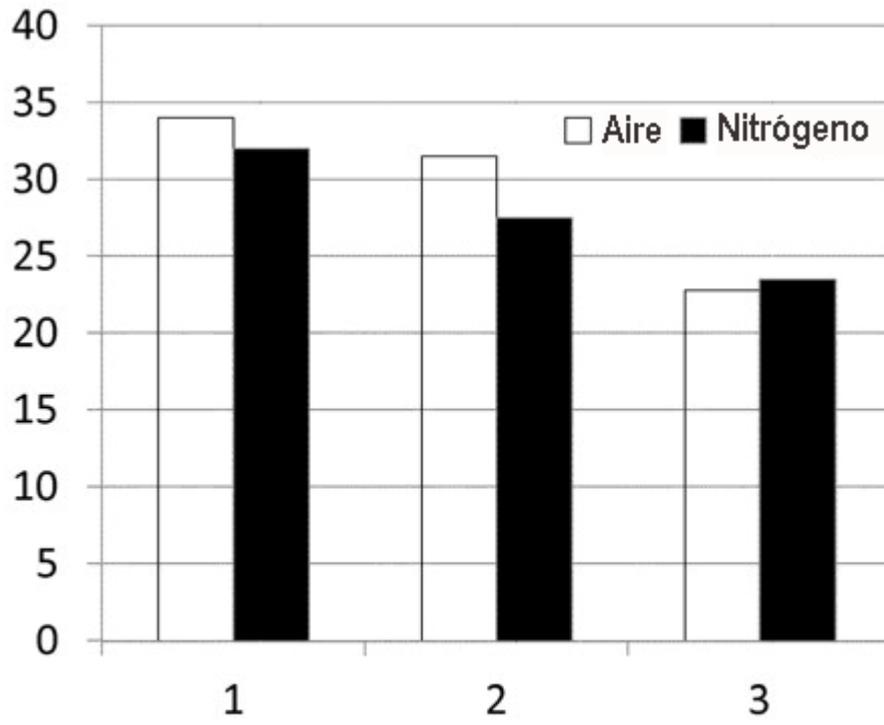


Fig.1

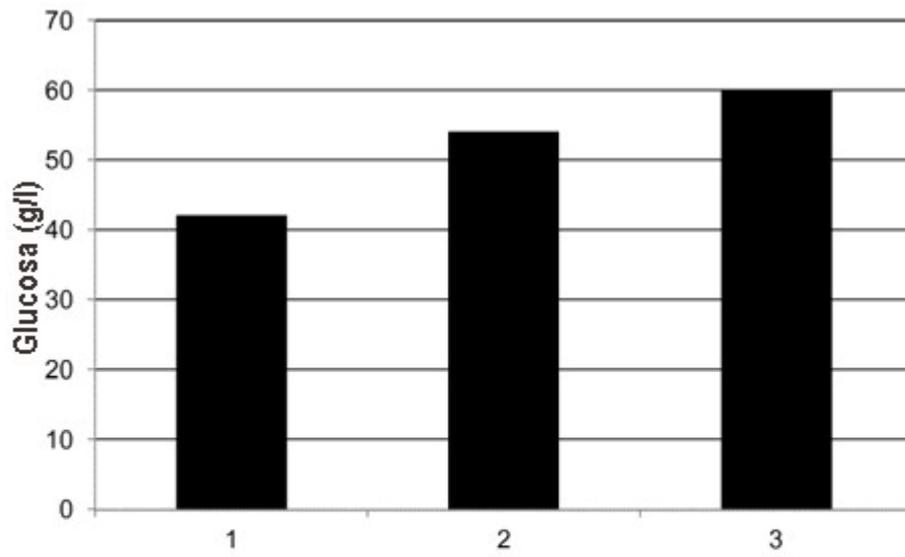


Fig.2

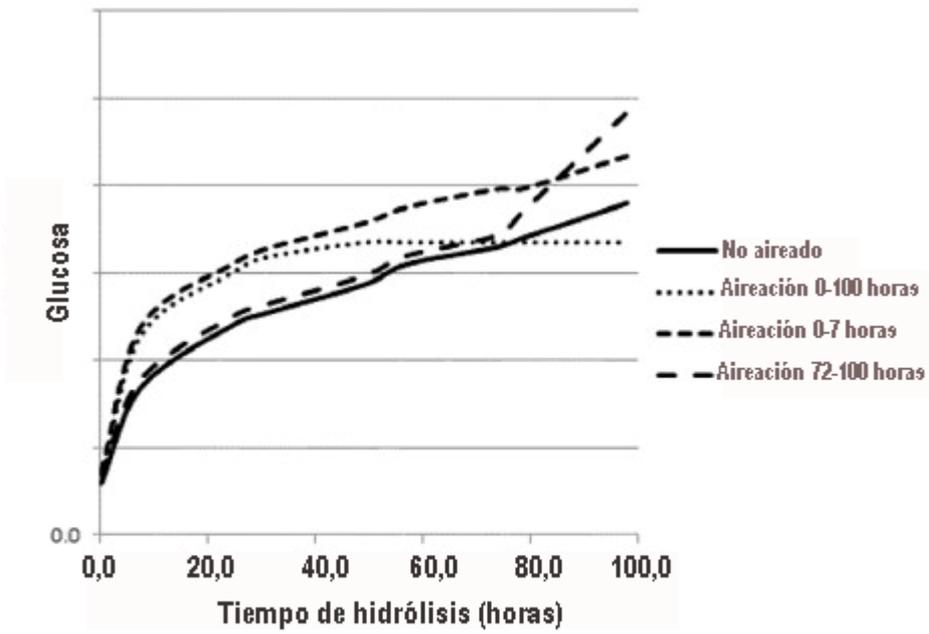


Fig. 3

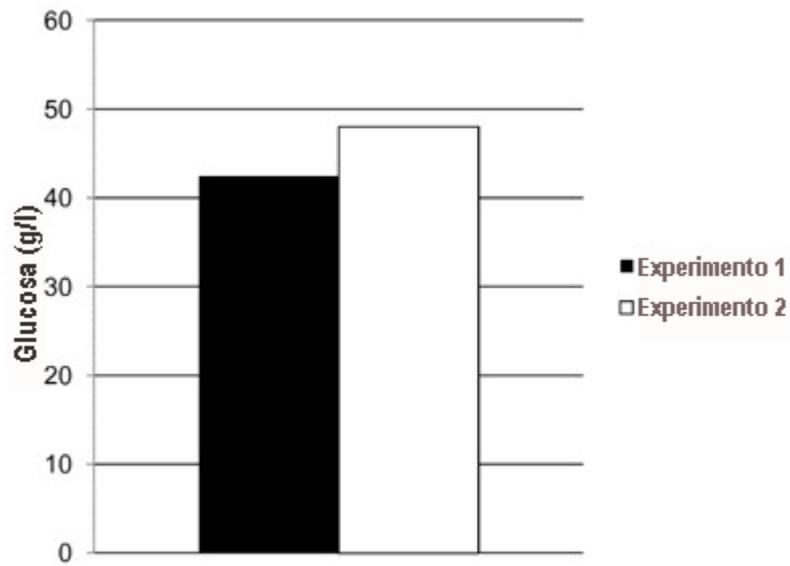


Fig. 4

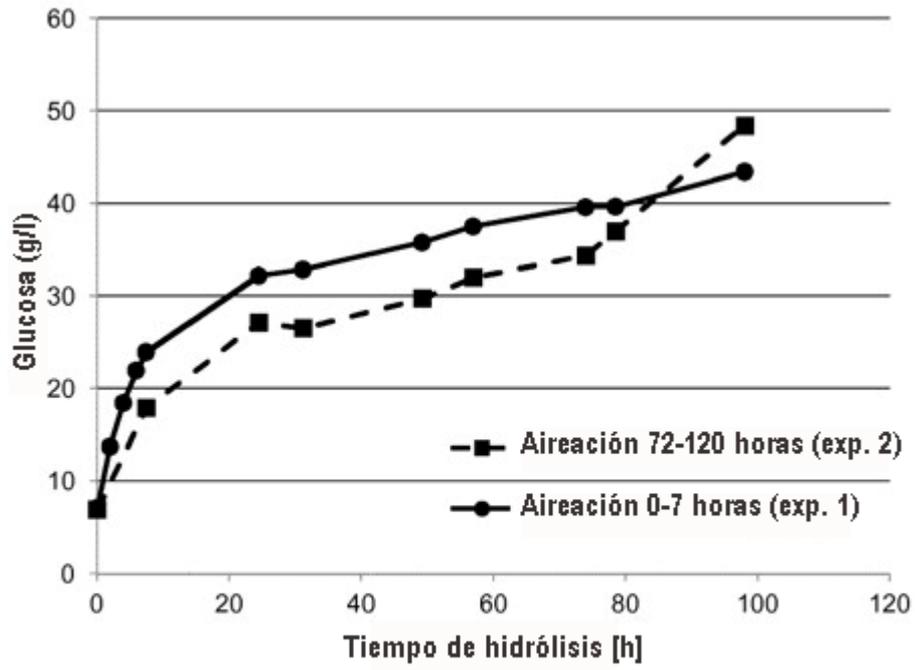


Fig. 5

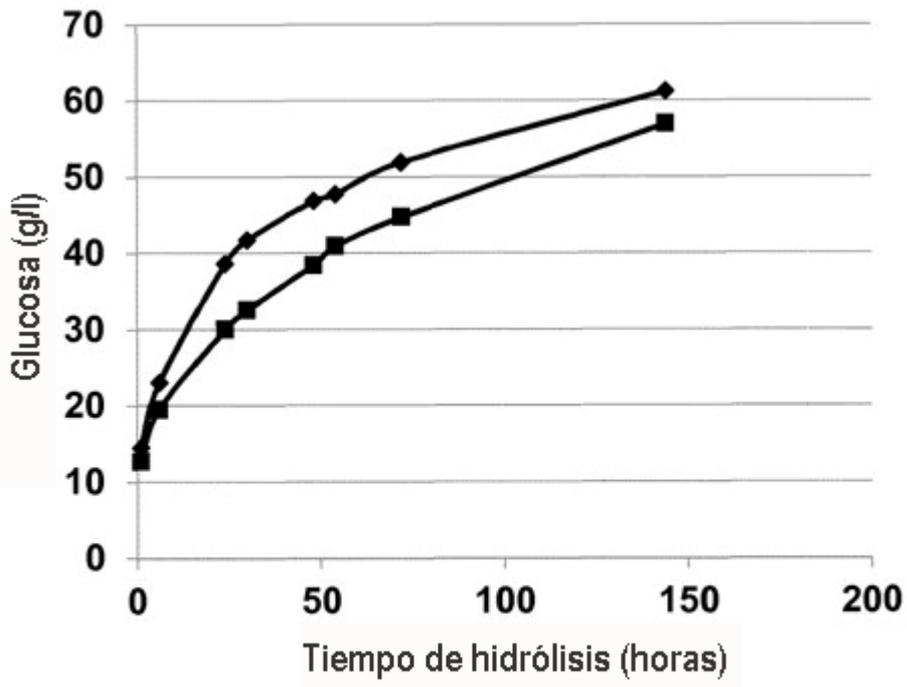


Fig. 6