

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 802 527**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

C12P 19/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.08.2016 PCT/EP2016/069740**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.03.2017 WO17042019**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2016 E 16754282 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3347481**

54 Título: **Procedimiento para la purificación de hidrolizado de biomasa**

30 Prioridad:

11.09.2015 EP 15184893

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

20.01.2021

73 Titular/es:

**CLARIANT INTERNATIONAL LTD (100.0%)
Rothausstrasse 61
4132 Muttenz, CH**

72 Inventor/es:

**ZAVREL, MICHAEL;
DENNEWALD, DANIELLE y
HOFFMANN, PHILIP**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 802 527 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la purificación de hidrolizado de biomasa

Descripción

La presente invención se refiere a un procedimiento nuevo y ventajoso para la purificación de hidrolizado de biomasa.

5 La biomasa lignocelulósica procedente de residuos agrícolas tales como el bagazo de la caña de azúcar, la paja de trigo, la paja de cebada y otros materiales que contienen sacárido o polisacárido y proteínas son fuentes valiosas no solo para los sacáridos refinados como los azúcares monoméricos o diméricos, sino también para otros componentes tales como como aminoácidos, proteínas y minerales.

10 Existen varios procedimientos dentro del estado de la técnica para separar componentes tales como particularmente azúcares de la remolacha azucarera y la caña de azúcar. Las disoluciones resultantes del tratamiento de estos sustratos denominados de "primera generación" son usualmente disoluciones de azúcar relativamente puras y se pueden usar tal como están en procedimientos estándar sin un impacto importante en la eficiencia del procedimiento. Por el contrario, las disoluciones resultantes de la hidrólisis de sustratos de "segunda generación" basados en residuos agrícolas tales como el bagazo de caña de azúcar, la paja de trigo o la paja de cebada son mezclas complejas de proteínas, minerales y azúcares. También incluyen ácidos orgánicos, partículas coloreadas, productos de degradación de la lignina y otras impurezas. Esto hace que estos hidrolizados de segunda generación no sean apropiados para su posterior procesado, tal como la preparación de poli(ácido láctico) a partir de ácido láctico. Los procedimientos existentes que incluyen este tipo de hidrolizados también están afectados negativamente por severo ensuciamiento en tubos, conducciones, o membranas y en otras unidades del procedimiento aplicado, reduciendo la eficiencia del procedimiento, haciendo necesaria una más frecuente limpieza y reemplazo de unidades del procedimiento lo que conduce a costes significativamente más elevados.

15 El documento JP 2005229821 describe un método para producir monosacáridos a partir de biomasa con mayor producción usando un hidrolizado de biomasa preparado por hidrólisis ácida (ácido sulfúrico concentrado).

20 Los documentos US 20100159521, US 20130295629 y Vishnu et al. (Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept; Progress in Energy and Combustion Science 38(4):522-550; agosto 2012) todos discuten los diferentes usos de hidrolizados de biomasa para procedimientos de fermentación posteriores.

25 De este modo, existe una necesidad de un procedimiento que permita la preparación de un hidrolizado de biomasa altamente purificado que contenga una cantidad máxima de compuestos valiosos tales como azúcares monoméricos y diméricos, pero solo una cantidad mínima de impurezas. Tal procedimiento incrementa las posibilidades de procesado posterior y posibles aplicaciones del hidrolizado.

30 Es el objetivo subyacente a la presente invención proporcionar un procedimiento para la purificación de hidrolizado de biomasa para preparar un hidrolizado que no muestre las desventajas de los procedimientos conocidos en el estado de la técnica.

35 En un primer aspecto, la invención proporciona de este modo un procedimiento para la purificación de hidrolizado de biomasa que comprende las etapas

- a) Proporcionar un hidrolizado de biomasa, en el que el hidrolizado se prepara añadiendo enzimas hidrolasa a la biomasa;
- b) Ajustar la temperatura del hidrolizado de biomasa a una temperatura seleccionada del intervalo de 50 a 95°C;
- 40 c) Adición de por lo menos un ácido al hidrolizado de biomasa;
- d) Separación sólido-líquido de la mezcla de ácido-hidrolizado de biomasa para obtener una fase sólida y una fase líquida;
- e) Desionización de la fase líquida de la mezcla de ácido-hidrolizado después de la separación según la etapa d).

45 A continuación, se describen realizaciones particularmente preferidas del procedimiento de la invención que no se debe entender que limitan la invención de ningún modo.

Realización 1 preferentemente preferida

Es particularmente preferido un procedimiento para la purificación de hidrolizado de biomasa que comprende las etapas

- a) Proporcionar un hidrolizado de biomasa, en el que el hidrolizado se prepara añadiendo enzimas hidrolasa a la biomasa;
- 50 b) Ajustar la temperatura del hidrolizado de biomasa a una temperatura seleccionada del intervalo de 50 a 95°C,

ES 2 802 527 T3

preferentemente de 50 a 90°C, particularmente preferido de 50 a 75°C y lo más preferido a 70°C

c) Adición de por lo menos un ácido al hidrolizado de biomasa;

d) Separación sólido-líquido de la mezcla de ácido-hidrolizado de biomasa para obtener una fase sólida y una fase líquida;

- 5 e) Desionización de la fase líquida de la mezcla de ácido-hidrolizado después de la separación según la etapa d);
en el que la biomasa es un sustrato lignocelulósico, preferentemente paja de cereal o bagazo, particularmente preferido paja de cereal o bagazo tratados.

Realización 2 particularmente preferida

- 10 Procedimiento como se define para la realización 1 particularmente preferida, en la que la etapa b se lleva a cabo durante 1 a 90 minutos, preferentemente durante 2 a 75 minutos.

Realización 3 particularmente preferida

Procedimiento como se define para la realización 1 o 2 particularmente preferida, en el que el ácido es un ácido orgánico, preferentemente ácido sulfúrico y el pH del hidrolizado se ajusta a de 2.0 a 3.0.

Realización 4 particularmente preferida

- 15 Procedimiento como se define para cualquiera de las realizaciones 1 a 3 particularmente preferidas, en el que la etapa c) se lleva a cabo después de la etapa b).

Realización 5 particularmente preferida

- 20 Procedimiento como se define para cualquiera de las realizaciones 1 a 4 particularmente preferidas, en el que la separación sólido-líquido se lleva a cabo mediante una prensa de filtro, preferentemente mediante una prensa de filtro de membrana.

Realización 6 particularmente preferida

Procedimiento como se define para cualquiera de las realizaciones 1 a 5 particularmente preferidas, en el que la desionización se lleva a cabo por electrodiálisis.

Realización 7 particularmente preferida

- 25 Procedimiento como se define para cualquiera de las realizaciones 1 a 6 particularmente preferidas, en el que la desionización se lleva a cabo mediante electrodiálisis seguido de una etapa de cromatografía de intercambio iónico o mediante desionización capacitiva de membrana.

Realización 8 particularmente preferida

- 30 Procedimiento como se define para cualquiera de las realizaciones 1 a 7 particularmente preferidas, en el que la desionización se lleva a cabo usando por lo menos una membrana bipolar.

Realización 9 particularmente preferida

Procedimiento como se define para cualquier realización 1 a 6 u 8 particularmente preferida, en el que la desionización se lleva a cabo por electrodiálisis que usa por lo menos una membrana bipolar seguido de una etapa de cromatografía de intercambio iónico o mediante desionización capacitiva de membrana.

- 35 Realización 10 particularmente preferida

Procedimiento como se define para cualquiera de las realizaciones 5 a 9 particularmente preferidas, en el que la desionización por electrodiálisis se lleva a cabo preferentemente a temperatura dentro del intervalo de 5°C a 80°C, más preferido de 10°C a 75°C, lo más preferido de 15°C a 70°C.

Realización 11 particularmente preferida

- 40 Procedimiento como se define para cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10 particularmente preferidas, en el que la desionización se lleva a cabo por electrodiálisis y la caída de presión a través de la celda de electrodiálisis es preferentemente por debajo de 1 bar, más preferentemente por debajo de 0.5 bar.

Realización 12 particularmente preferida

- 45 Procedimiento como se define para cualquiera de las realizaciones 1 a 4 particularmente preferidas, en el que la desionización se lleva a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico preferentemente con intercambio

catiónico antes de intercambio aniónico.

Realización 13 particularmente preferida

Es particularmente preferido un procedimiento para la purificación de hidrolizado de biomasa que comprende las etapas

- 5 a) Proporcionar un hidrolizado de biomasa de paja de cereal o bagazo pretratados, en el que el hidrolizado se prepara añadiendo enzimas hidrolasa a la biomasa;
- b) Ajustar la temperatura del hidrolizado de biomasa a una temperatura seleccionada del intervalo de 50 a 90°C durante 2 a 75 minutos;
- c) Adición de por lo menos un ácido orgánico al hidrolizado de biomasa para ajustar el pH a de 2.0 a 3.0;
- 10 d) Separación sólido-líquido de la mezcla de ácido-hidrolizado de biomasa para obtener una fase sólida y una fase líquida mediante una prensa de filtro de membrana;
- e) Desionización de la fase líquida de la mezcla de ácido-hidrolizado después de la separación según la etapa d), en la que la desionización se lleva a cabo por electrodiálisis seguido de una etapa de cromatografía de intercambio iónico o desionización capacitiva de membrana.

Realización 14 particularmente preferida

15 Es particularmente preferido un procedimiento para la purificación de hidrolizado de biomasa que comprende las etapas

- a) Proporcionar un hidrolizado de biomasa de paja de cereal o bagazo pretratados, en el que el hidrolizado se prepara añadiendo enzimas hidrolasa a la biomasa;
- b) Ajustar la temperatura del hidrolizado de biomasa a una temperatura seleccionada del intervalo de 50 a 90°C durante de 2 a 75 minutos;
- 20 c) Adición de por lo menos un ácido orgánico al hidrolizado de biomasa para ajustar el pH a de 2.0 a 3.0;
- d) Separación sólido-líquido de la mezcla de ácido-hidrolizado de biomasa para obtener una fase sólida y una fase líquida mediante una prensa de filtro de membrana;
- e) Desionización de la fase líquida de la mezcla de ácido-hidrolizado después de la separación según la etapa d), en el que la desionización se lleva a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico con intercambio catiónico antes de intercambio aniónico.
- 25

Realización 15 particularmente preferida

Es particularmente preferido un procedimiento para la purificación de hidrolizado de biomasa que comprende las etapas

- a) Proporcionar un hidrolizado de biomasa de paja de cereal o bagazo pretratados, en el que el hidrolizado se prepara añadiendo enzimas hidrolasa a la biomasa;
- 30 b) Ajustar la temperatura del hidrolizado de biomasa a una temperatura seleccionada del intervalo de 50 a 90°C durante de 2 a 75 minutos;
- c) Adición de por lo menos un ácido orgánico al hidrolizado de biomasa para ajustar el pH a de 2.0 a 3.0;
- d) Separación sólido-líquido de la mezcla de ácido-hidrolizado de biomasa para obtener una fase sólida y una fase líquida mediante una prensa de filtro de membrana;
- 35 e) Desionización de la fase líquida de la mezcla de ácido-hidrolizado después de la separación según la etapa d); en el que la desionización se lleva a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico con intercambio catiónico antes de intercambio aniónico.

Realización 16 particularmente preferida

Es particularmente preferido un procedimiento para la purificación de hidrolizado de biomasa que comprende las etapas

- 40 a) Proporcionar un hidrolizado de biomasa a partir de paja de cereal o bagazo pretratados, en el que el hidrolizado se prepara añadiendo enzimas hidrolasa a la biomasa;
- b) Ajustar la temperatura del hidrolizado de biomasa a una temperatura seleccionada del intervalo de 50 a 90°C durante de 2 a 75 minutos;
- c) Adición de por lo menos un ácido orgánico al hidrolizado de biomasa para ajustar el pH a de 2.0 a 3.0;

d) Separación sólido-líquido de la mezcla de ácido-hidrolizado de biomasa para obtener una fase sólida y una fase líquida mediante una prensa de filtro de membrana;

e) Desionización de la fase líquida de la mezcla de ácido-hidrolizado después de la separación según la etapa d);

5 en el que la desionización se lleva a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico con intercambio catiónico antes de intercambio aniónico y

en el que se añade un aditivo antes de ajustar la temperatura según la etapa b).

Realización 17 particularmente preferida

Es particularmente preferido un procedimiento para la purificación de hidrolizado de biomasa que comprende las etapas

10 a) Proporcionar un hidrolizado de biomasa a partir de paja de cereal o bagazo, en el que el hidrolizado se prepara añadiendo enzimas hidrolasa a la biomasa;

b) Ajustar la temperatura del hidrolizado de biomasa a una temperatura seleccionada del intervalo de 50 a 90°C durante 2 a 75 minutos;

c) Adición de por lo menos un ácido orgánico al hidrolizado de biomasa para ajustar el pH a de 2.0 a 3.0;

15 d) Separación sólido-líquido de la mezcla de ácido-hidrolizado de biomasa para obtener una fase sólida y una fase líquida mediante una prensa de filtro de membrana;

e) Desionización de la fase líquida de la mezcla de ácido-hidrolizado después de la separación según la etapa d);

en el que la desionización se lleva a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico con intercambio catiónico antes de intercambio aniónico y

en el que se añade un aditivo después de ajustar el pH según la etapa c).

20 Los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que la combinación de un ajuste de temperatura y la adición de un ácido, que incluso aumentará el contenido de iones de la disolución, conducirá a una mejora de una desionización posterior y, por ello, a un hidrolizado purificado mejorado. La desionización se mejora en dos aspectos: se incrementa la cantidad de sales retiradas durante la desionización y se reduce el ensuciamiento en la unidad de desionización y las partes circundantes del procedimiento. Una ventaja adicional de la presente
25 invención es que el procedimiento también se puede aplicar si el hidrolizado de biomasa contiene ácidos orgánicos.

El término "biomasa" como se usa en la presente invención se refiere a cualquier tipo de biomasa conocida por una persona experta en la técnica como apropiada para el procedimiento de la invención. Particularmente preferida es la biomasa de origen vegetal. En una realización preferida adicional, el contenido inicial de materia seca de la biomasa se selecciona del 10 al 100% en peso, más preferido del 35 al 95% en peso y particularmente preferido del 40 al
30 80% en peso. La expresión "materia seca" (d.m.) se refiere a la relación de masa a biomasa determinada después de que el agua y otros compuestos volátiles se hayan retirado del tejido fresco usando un equilibrio IR. Por lo tanto, se prefiere particularmente seleccionar una biomasa por la cual su materia seca contenga por lo menos 25% en peso de sacáridos tales como azúcares monoméricos, azúcares diméricos y oligosacáridos y/o polisacáridos, más preferentemente por lo menos 40% en peso, particularmente preferido por lo menos 60% en peso, más preferido por
35 lo menos 80% en peso de sacáridos tales como azúcares monoméricos, azúcares diméricos y oligosacáridos y/o polisacáridos. Además, cualquier mezcla de biomasa apropiadas va a estar incluida dentro del término "biomasa".

La biomasa particularmente preferida es "biomasa de lignocelulosa".

La expresión "biomasa de lignocelulosa" se refiere a desechos, residuos y/o subproductos de la silvicultura y la agricultura, la industria de procesamiento de alimentos y papel y los residuos comunales. En particular, la expresión
40 "biomasa de lignocelulosa" como se usa dentro de la presente invención incluye paja de cereal y/o espelta (tales como trigo, centeno, cebada, avena), paja de maíz, rastrojo y/o mazorcas, hierbas tales como Sericea lespedeza, switchgrass (*Panicum virgatum*), hierba Napier (*Miscanthus*; caña de China), hierba de Sudán (*Sorghum sudanense*, *Sorghum drummondii*), *Arundo donax*, cortezas, madera, residuos de madera, astillas de madera y/o virutas de madera, pulpa de fruta, paja de arroz, hojas de plátano, racimos de frutas vacíos y residuos de agave.

45 La biomasa adicional apropiada para el procedimiento es el estiércol de establos, materiales herbáceos, molienda de café y residuos de molinos de aceite tales como torta prensada de colza y aguas residuales de molinos, material de fabricación de papel y aguas residuales de fábricas de papel, residuos de papel, restos de vegetales y frutas.

En una realización preferida del procedimiento de la presente invención, la biomasa se selecciona de biomasa que contiene celulosa, hemicelulosa y/o lignina.

50 En una realización particularmente preferida del procedimiento de la presente invención, la biomasa se selecciona

de pulpa de remolacha azucarera, bagazo de caña de azúcar, paja de caña de azúcar, paja de trigo, madera y mezclas de los mismos.

5 En otra realización particularmente preferida del procedimiento de la presente invención, la biomasa es biomasa lignocelulósica de residuos agrícolas, tales como paja de trigo, paja de cebada, paja de soja, bagazo de caña de azúcar, hojas y tallos de caña de azúcar, paja de caña de azúcar, paja de maíz, paja de cebada, rastrojo y mezclas de los mismos

10 Se debe entender que la expresión "hidrolizado de biomasa" como se usa aquí representa un polímero despolimerizado que se despolimerizó mediante una reacción de hidrólisis. La "reacción de hidrólisis" se debe entender como la escisión de los enlaces químicos mediante la adición de agua. Una forma de realizar la hidrólisis técnicamente es añadir enzimas hidrolasa a la biomasa.

15 En una realización preferida, el hidrolizado de biomasa comprende por lo menos 50% en peso de sacáridos en forma de azúcares monoméricos y diméricos, preferentemente por lo menos 65% en peso, más preferentemente por lo menos 75% en peso, también preferido por lo menos 85% en peso y lo más preferido 99% en peso, todos con relación a la materia seca (d.m.) de la biomasa. En una realización preferida adicional, el hidrolizado de biomasa comprende aminoácidos, oligopéptidos, minerales, oligosacáridos y/o proteínas, así como ácidos orgánicos. El contenido en minerales es preferentemente por lo menos 0.5% en peso de sales, preferentemente por lo menos 1% en peso, más preferentemente por lo menos 2% en peso y lo más preferido 3% en peso, todos con relación a la materia seca (d.m.) de la biomasa. El hidrolizado de biomasa puede comprender ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido galacturónico y ácido láctico. Puede comprender también los siguientes productos de degradación: compuestos fenólicos tales como 4-hidroxi-3-metoxifenilo y 4-hidroxi-3,5-dimetoxifenilo, ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido levulínico, furfural, 5-hidroximetilfurfural, taninos y terpenos.

El hidrolizado de biomasa tal como se usa dentro del procedimiento de la presente invención se ha preparado preferentemente según los siguientes métodos:

25 Se prefiere proporcionar la biomasa en forma de partículas, por ejemplo, cortando, moliendo, triturando, cortando, dispersando por cizalladura, picando, dispersando y/o mezclando la biomasa antes de la etapa (a). En otra realización, la biomasa se podría someter a un procedimiento de pretratamiento.

30 Los métodos apropiados para el pretratamiento de la biomasa incluyen cualquier tipo de método de pretratamiento mecánico, biológico, químico y/o físico conocido por una persona experta en la técnica. En una realización preferida, el método de pretratamiento se selecciona de los métodos de trituración mecánica, tratamiento con ácidos y/o álcalis, oxidación húmeda, hidrotérmolisis con pH controlado y/o explosión de vapor.

35 La "explosión de vapor" comprende preferentemente un tratamiento hidrotérmico presurizado a una temperatura de 60 a 350°C, preferentemente de 80 a 300°C, particularmente preferido de 100 a 250°C y lo más preferido de 110 a 220°C del material que contiene lignocelulosa en ausencia o presencia de catalizadores ácido (tal como H₂SO₄, HCl, H₃PO₄) o base/álcali (es decir, NH₄OH, NaOH, KOH, cal) que, si están presentes, se añaden en concentraciones de 0.01 a 15% (peso/peso), preferentemente de 0.05 a 12.5% (peso/peso), más preferentemente de 0.1 a 10% (peso/peso) y lo más preferido de 0.25 a 7.5%. En una realización preferida, la presión se selecciona preferentemente de 1 a 100 bares, preferentemente de 2 a 50 bares, también se prefiere de 3 a 25 bares y lo más preferido de 5 a 15 bares. Los tiempos de reacción durante la explosión de vapor se deben seleccionar de 10 s a 2 h, preferentemente de 1 minuto a 1.5 horas, y lo más preferido de 5 minutos a 1 hora para proporcionar una transformación eficiente de los componentes de biomasa en preparación para la hidrólisis enzimática. En una realización particularmente preferida, se lleva a cabo un pretratamiento de "desmenuzamiento mecánico" del material que contiene lignocelulosa antes o durante el pretratamiento de explosión de vapor, en el que el desmenuzamiento mecánico se selecciona del grupo que consiste en procesado mecánico, trituración, picado, aplastamiento, corte, irradiación, molienda y combinaciones de los mismos.

45 El "pretratamiento con ácido" constituye preferentemente un tratamiento con ácido diluido continuo y/o suave, tal como tratamiento con ácido sulfúrico u otro ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, cloruro de hidrógeno o mezclas de los mismos. También se pueden usar otros ácidos. Se debe entender que un "tratamiento con ácido suave" se lleva a cabo a un pH de 0.1 a 5, preferentemente un pH de 2 a 3. En una realización preferida, el ácido se añade en concentraciones de 0.01 a 15% en peso (peso/peso), preferentemente de 0.05 a 12.5% en peso (peso/peso), más preferido de 0.1 a 10% en peso (peso/peso) y el más preferido de 0.25 a 7.5% en peso. El ácido es preferentemente ácido sulfúrico. El ácido se puede poner en contacto con la biomasa a una temperatura en el intervalo de 120 a 280°C, preferentemente de 135 a 225°C. y lo más preferido de 150 a 200°C durante un período de 1 a 60 minutos, preferentemente de 2 a 30 minutos y lo más preferido de 5 a 15 minutos. La adición de ácidos fuertes, como el ácido sulfúrico, se puede aplicar en realizaciones particularmente preferidas para retirar hemicelulosa.

El "pretratamiento químico" también se refiere a tratamiento de la biomasa con H₂O₂, ozono, ácidos de Lewis, FeCl₃, Al₂(SO₄)₃ en alcoholes acuosos, glicerol, dioxano, fenol, etilenglicol, NaOH, Na₂CO₃ y/o amoníaco. Las concentraciones, la temperatura y la duración preferidas se eligen de forma análoga a las condiciones mencionadas

anteriormente con respecto al pretratamiento con ácido.

El "pretratamiento de oxidación húmeda" implica el uso de agentes oxidantes, tales como agentes oxidantes basados en sulfito.

5 La expresión "desmenuzamiento mecánico" se refiere a cualquier tratamiento mecánico que promueva la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina de la biomasa.

El desmenuzamiento mecánico se selecciona preferentemente del grupo que consiste en procesado mecánico, trituración, picado, aplastado, corte, irradiación, molienda tal como molienda en seco, molienda en húmedo y molienda con bolas vibratorias, y combinaciones de los mismos.

10 El "pretratamiento biológico" se refiere a cualquier pretratamiento biológico que promueve la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina de la biomasa. Las técnicas de pretratamiento biológico pueden implicar la aplicación de microorganismos solubilizadores de lignina tales como actinomicetos (por ejemplo, cepas de *Streptomyces*) u hongos de podredumbre blanca.

15 Los métodos de pretratamiento descritos anteriormente se van a llevar a cabo dentro de dispositivos apropiados conocidos por una persona experta en la técnica. Un dispositivo apropiado para llevar a cabo el pretratamiento químico puede ser cualquier tipo de recipiente, tal como un reactor de depósito o un reactor de depósito agitado. Un dispositivo apropiado para llevar a cabo una explosión de vapor puede ser cualquier tipo de recipiente, tal como un reactor de depósito o un reactor de depósito agitado, pero también se puede llevar a cabo dentro de un reactor de tornillo, preferentemente un reactor de tornillo continuo, o dentro de un reactor de flujo de tapón, preferentemente un reactor de flujo de tapón continuo.

20 El contenido de materia seca de la biomasa pretratada se selecciona preferentemente del 20 al 60% en peso, particularmente preferido del 35 al 50% en peso, en el que lo más preferido es que la biomasa haya sido pretratada por un método que no implique la adición de ningún ácido y/o álcali.

25 Sin embargo, es una ventaja particular del procedimiento para la hidrólisis de la biomasa que también la aplicación de partículas de biomasa relativamente grandes y/o no tratadas previamente logre resultados favorables. El tamaño de las partículas de biomasa es preferentemente tal que por lo menos 90% en peso de las partículas tienen una longitud máxima de 200 mm, más preferentemente 100 mm, incluso más preferentemente 50 mm y lo más preferido 25 mm. Se prefiere además que el tamaño de las partículas de biomasa es preferentemente tal que por lo menos el 95% en peso de las partículas tiene una longitud máxima de 200 mm, más preferido de 100 mm, aún más preferido de 50 mm y lo más preferido de 25 mm.

30 La biomasa pretratada se pone en contacto a continuación preferentemente con una composición enzimática que contiene por lo menos una enzima seleccionada de la clase de hidrolasas.

35 El término "contacto" (o "en contacto") comprende cualquier tipo de contacto de biomasa con una composición enzimática conocida por una persona experta en la técnica como apropiada para el procedimiento de la invención. En una realización preferida, el "contacto" de la biomasa con la composición enzimática se lleva a cabo añadiendo la composición enzimática a la biomasa. Además, es particularmente preferido que la adición de la composición de enzima vaya seguida o se lleve a cabo al mismo tiempo con una mezcla de la composición enzimática y la biomasa.

40 La expresión "composición enzimática" se refiere a cualquier composición que comprende por lo menos una enzima seleccionada de la clase de hidrolasas. La por lo menos una enzima seleccionada de la clase de hidrolasas asciende preferentemente a de 1 a 99.99% en peso (con relación al peso de la composición enzimática), más preferido de 5 a 99% en peso, particularmente preferido de 10 a 95% en peso y lo más preferido de 20 a 90% en peso y además puede contener por lo menos una enzima seleccionada de la clase de liasas. Dentro de las realizaciones, en las que la composición enzimática contiene por lo menos una enzima seleccionada de la clase de liasas, la por lo menos una enzima seleccionada de la clase de hidrolasas asciende preferentemente a de 0.01 a 50% en peso (en relación con el peso de la composición de enzima), preferido de 0.05 a 20% en peso, más preferido de 0.08 a 5% en peso, y lo más preferido de 0.1 a 1% en peso.

En una realización preferida, la composición enzimática contiene celulasas, hemicelulasas y/o pectinasas.

En una realización particularmente preferida, la composición enzimática contiene por lo menos una celobiohidrolasa (EC 3.2.1.-) y por lo menos una endo-1,4-β-glucanasa (EC 3.2.1.4).

50 En una realización particularmente preferida, la composición enzimática contiene por lo menos una celobiohidrolasa (EC 3.2.1.-), por lo menos una endo-1,4-β-glucanasa (EC 3.2.1.4), por lo menos una β-glucosidasa (EC 3.2.1.4), por lo menos una glucosidohidrolasa 61 (GH61 y CBM33), por lo menos una endo-xilanasas (EC 3.2.1.8) y por lo menos una β-xilosidasa (EC 3.2.1.37).

En una realización particularmente preferida, la composición enzimática definida anteriormente contiene además una o más enzimas seleccionadas de β-glucanasa (EC 3.2.1.-), acetilxilanoesterasa (EC 3.1.1.72),

5 acetilgalactanesterasa (3.1.1.6), α -arabinopiranosidasa (3.2.1.-), α -galactosidasa (EC 3.2.1.22), β -galactosidasa (EC 3.2.1.23), α -glucuronidasas (EC 3.2.1.139), β -manasa (EC 3.2.1.78), pectinmetilesterasa (EC 3.1.1.11), pectinacetilesterasa (EC 3.1.1.-), ramnogalacturonasa (EC 3.2.1.-; GH28), ramnogalacturonanacetilesterasa (EC 3.1.1.86), ramnogalacturonanendoliasa (EC 4.2.2.23), ramnogalacturonanliasa (EC 4.2.2.-) y β -manosidasas (EC 3.2.1.25), poligalacturonasas (EC 3.2.1.15, 67, 82; GH28) y pectina/pectato liasas (EC 4.2.2.2, 6, 9, 10)

10 Los términos "celulasas", "hemicelulasas" y "pectinasas" se refieren a cualquier mezcla de enzimas que esté implicada en la degradación hidrolítica (despolimerización) de celulosa polimérica, hemicelulosa y/o pectina a azúcares monoméricos. Como se usa aquí, los términos "celulasas", "hemicelulasas" y "pectinasas" se refieren a mezclas tanto naturales como no naturales que incluyen una pluralidad de enzimas producidas por un organismo, por ejemplo, un hongo filamentoso. Las "celulasas", "hemicelulasas" y "pectinasas" se derivan preferentemente de hongos tales como miembros de la subdivisión Eumycota y Oomycota, que incluyen pero no están limitados a los siguientes géneros: Aspergillus, Acremonium, Aureobasidium, Beauveria, Cephalosporium, Ceriporiopsis, Chaetomium, Chrysosporium, Claviceps, Cochiobolus, Cryptococcus, Cyathus, Endothia, Endothia mucor, Fusarium, Gilocladium, Humicola, Magnaporthe, Myceliophthora, Myrothecium, Mucor, Neurospora, Phanerochaete, Podospora, Paecilomyces, Pyricularia, Rhizomucor, Rhizopus, Schizophyllum, Stagonospora, Talaromyces, Trichoderma, Thermomyces, Thermoascus, Thielavia, Tolypocladium, Trichophyton y Trametes. En una implementación preferida, el hongo filamentoso es una especie Trichoderma.

En una realización preferida de la composición enzimática, las celulasas y/o pectinasas son de una fuente fúngica. En una realización particularmente preferida de la composición enzimática, esta fuente fúngica es Trichoderma reesei.

20 La expresión "mezcla de enzimas" se refiere preferentemente a una mezcla de enzimas secretadas por una o más fuentes microbianas. En algunas realizaciones, las enzimas para uso en estas mezclas de enzimas se pueden preparar a partir de una o más cepas de hongos filamentosos producidas naturalmente o modificadas genéticamente. Las cepas preferidas se enumeran anteriormente. La proporción deseada de componentes enzimáticos dentro de la (s) mezcla (s) final (es) se puede lograr alterando la cantidad relativa de enzima en la mezcla final, por ejemplo, mediante la suplementación de enzima (s) purificada (s) o parcialmente purificada (s). En algunas realizaciones, la (s) mezcla (s) final (es) puede (n) complementarse con una o más actividades enzimáticas que no se expresan endógenamente, o se expresan a un nivel relativamente bajo por los hongos filamentosos, para mejorar la degradación del sustrato celulósico a azúcares fermentables. La (s) enzima (s) suplemental (es) se puede (n) añadir como un suplemento a la (s) mezcla (s) final (es) y las enzimas pueden ser un componente de un caldo de fermentación total separado, o se pueden purificar, o recuperar mínimamente y/o purificar.

El término "celulasa" se refiere a cualquier enzima capaz de hidrolizar polímeros de celulosa a oligómeros más cortos y/o glucosa. Las celulasas preferidas dentro de la composición enzimática incluyen celobiohidrolasas (CBH) (EC 3.2.1.-), endo-1,4- β -glucanasas (EG) (EC 3.2.1.4), β -glucosidasa (EC 3.2.1.4), celobiosa hidrolasa (EC 3.2.1.21), glucósido hidrolasa 61 (GH61 y CBM33), expansina, swolenina, loosinina y proteínas CIP (EC 3.1.1.-; CE15).

35 El término "hemicelulosa" se refiere a cualquier enzima capaz de degradar o favorecer la degradación de la hemicelulosa. Las hemicelulasas preferidas dentro de la composición enzimática incluyen β -glucanasas (EC 3.2.1.-), endo-xilanasas (EC 3.2.1.8), β -xilosidasas (EC 3.2.1.37), acetilxilanesterasa (EC 3.1.1.72), acetilgalactanesterasa (3.1.1.6), acetilmananesterasa, feruloilesterasa (EC 3.1.1.73), glucuronoilesterasa (EC 3.1.1.-), α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55), α -arabinopiranosidasa (3.2.1.-), α -galactosidasa (EC 3.2.1.22), β -galactosidasa (EC 3.2.1.23), α -glucuronidasas (EC 3.2.1.139), β -manasa (EC 3.2.1.78), β -manosidasa (EC 3.2.1.25), manan-1,4-manobiosidasa (EC 3.2.1.100), arabinogalactan-endo-beta-1,4-galactanasa (EC 3.2.1.89), endo-beta-1,3-galactanasa (EC 3.2.1.90), galactan-endo-beta-1,3-galactanasa (EC 3.2.1.181), glucoronoarabinoxilan-endo-1,4-betaxilanasas (EC 3.2.1.136), alfa-L-fucosidasa (EC 3.2.1.151), coniferin-beta-glucosidasa (EC 3.2.1.126), xiloglucanhidrolasas (EC 3.2.1.150, 151, 155), xilan- α -1,2-glucuronosidasa (EC 3.2.1.131), endo-xilogalacturonanhidroxisilasa (EC 3.2.1.-; GH28), α -amilasa (EC 3.2.1.1), glucan-1,4- α -glucosidasa (EC 3.2.1.3), galactan-1,3-galactosidasa (GH43), -1,4-endogalactanasa (EC 3.5.1.89; GH53), α -ramnosidasa (EC 3.2.1.40), β -ramnosidasa (EC 3.2.1.43), ligninperoxidasa (EC 1.11.1.14), Mn-peroxidasa (EC 1.11.1.13), alcohol arílico-oxidasa (EC 1.1.3.7), glioxaloxidasa (EC 1.1.3), carbohidrato-oxidadas (EC 1.1.3.4, 9, 10), lacasa (EC 1.10.3.2) y celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.18).

50 El término "pectinasa" se refiere a cualquier enzima capaz de degradar o favorecer la degradación de la pectina. Las pectinasas preferidas dentro de la composición enzimática incluyen poligalacturonasas (EC 3.2.1.15, 67, 82; GH28), pectina/pectato-liasa (EC 4.2.2.2, 6, 9, 10), pectinmetilesterasa (EC 3.1.1.11), pectinacetilesterasa (EC 3.1.1.-), ramnogalacturonasa (EC 3.2.1.-; GH28), ramnogalacturonanacetilesterasa (EC 3.1.1.86), ramnogalacturonanendoliasa (EC 4.2.2.23), ramnogalacturonanliasa (EC 4.2.2.-), ramnogalacturonangalacturonohidrolasa (EC 3.2.1.-), xilogalacturonanhidrolasa (EC 3.2.1.-), pectinmetilesterasa (EC 3.1.1.11), beta-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55), beta-1,4-galactanasa (EC 3.2.1.89), beta-1,3-galactanasa (EC 3.2.1.90), beta-galactosidasa (EC 3.2.1.23), alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22), feruloilacetilesterasa (EC 3.1.1.-), alfafucosidasa (EC 3.2.1.51), betafucosidasa (EC 3.2.1.38), betaapiosidasa (EC 3.2.1.-), alfaramnosidaxa (EC 3.2.1.40), betaramnosidasa (EC 3.2.1.43), alfaarabinopiranosidasa (EC 3.2.1.-), betagluconosidasa (EC 3.2.1.31), alfagluconosidasa (EC 3.2.1.139), beta-xilosidasa (EC 3.2.1.37) y alfa-xilosidasa (EC 3.2.1.x).

Las enzimas se clasifican según las nomenclaturas que se basan en la Nomenclatura y Clasificación de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>) o en la base de datos Carbohydrate-Active EnZYmes (<http://www.cazy.org/>).

5 El término "actividad" de una enzima se refiere a la actividad catalítica de la enzima en condiciones apropiadas en las que la enzima sirve como un catalizador de proteína, que convierte sustratos poliméricos o artificiales específicos en productos oligoméricos o monoméricos específicos. En este contexto, la expresión "condiciones apropiadas" es bien conocida y aplicable por una persona experta en la técnica.

10 El "contacto" se puede llevar a cabo por cualquier medio conocido por una persona experta en la técnica como apropiado para el propósito de la invención. Por ello se prefiere que la mezcla de enzimas se añada a la biomasa mientras se agita la biomasa dentro del recipiente. La (s) enzima (s) también se puede (n) inmovilizar en un material portador.

15 En una realización preferida, la hidrólisis de biomasa se lleva a cabo durante un tiempo suficiente para hidrolizar por lo menos 20% en peso, preferentemente por lo menos 30% en peso, más preferentemente por lo menos 50% en peso y lo más preferido por lo menos 60% en peso de la biomasa. En una realización preferida adicional, la hidrólisis de la biomasa se lleva a cabo durante un tiempo suficiente para hidrolizar del 10 al 100% en peso, preferentemente del 20 al 90% en peso, aún más preferido del 30 al 85.0% en peso y lo más preferido del 40 al 75% en peso de la celulosa de la biomasa. El término "hidrolizar" se debe entender como la conversión hidrolítica de componentes poliméricos insolubles de la biomasa en compuestos solubles monoméricos, diméricos y/o oligoméricos mediante procedimientos químicos, físicos y/o enzimáticos tales como la hidrólisis.

20 En una realización particularmente preferida, la hidrólisis de biomasa se lleva a cabo durante de 1 minuto a 136 horas, más preferido durante de 30 minutos a 112 horas, particularmente preferido durante de 1 hora a 100 horas, incluso más preferido durante de 4 horas a 96 horas también particularmente preferido de 12 horas a 85 horas.

25 En una realización preferida adicional, la hidrólisis de biomasa se lleva a cabo hasta que el contenido de sólidos insolubles restantes es inferior al 40% en peso, preferentemente inferior al 30% en peso, incluso más preferido inferior al 20% en peso y lo más preferido inferior al 15% en peso. En una realización preferida adicional, la hidrólisis de biomasa se lleva a cabo hasta que el contenido de sólidos insolubles restantes es del 5 al 40% en peso, preferentemente del 8 al 30% en peso y lo más preferido del 10 al 25% en peso.

30 En otra realización preferida, la hidrólisis de biomasa se lleva a cabo hasta que la biomasa se licúa hasta por lo menos el 50%, preferentemente por lo menos el 60% y lo más preferido por lo menos el 80%, en la que se prefiere particularmente una licuefacción del 60 al 90%.

La temperatura de reacción durante la hidrólisis se selecciona preferentemente de 25 a 80°C, más preferentemente se selecciona de 30 a 75°C y particularmente preferido de 35 a 65°C. En otra realización preferida, la hidrólisis de biomasa se lleva a cabo durante de 1 a 120 horas, preferentemente de 2 a 110 horas, más preferentemente de 3 a 100 horas, en la que la temperatura se selecciona de 35 a 75°C o de 45 a 65°C.

35 En otra realización preferida, el pH durante la hidrólisis se selecciona preferentemente de 4 a 6.5, particularmente preferido de 4.5 a 5.5.

40 Los niveles de dosificación apropiados y las condiciones de funcionamiento serán evidentes para las personas expertas en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada aquí. Los niveles de dosificación óptima variarán considerablemente dependiendo del sustrato y las tecnologías de pretratamiento usadas. La composición enzimática se añade preferentemente a la biomasa en una cantidad de 0.01 a 24% en peso de la materia seca de la biomasa, más preferentemente de 0.025 a 12% en peso de la materia seca de la biomasa, siendo particularmente preferido de 0.05 a 6% en peso de la materia seca de la biomasa y lo más preferido de 0.1 a 3% en peso de la materia seca de la biomasa. La concentración total de enzima (proteína) se determinó mediante el método de Bradford con albúmina de suero bovino como patrón de referencia (Bradford, M., 1976).

45 La hidrólisis de biomasa se lleva a cabo dentro de cualquier tipo de recipiente conocido por una persona experta en la técnica como apropiado para el procedimiento de la invención, preferentemente dentro de un reactor. Los reactores apropiados están dentro del conocimiento de una persona experta en la técnica. Los recipientes/reactores preferibles incluyen, pero no están limitados a, recipientes/reactores que comprenden un medio de agitación y/o un medio para bombear o recircular el contenido de biomasa dentro del reactor. Medios preferidos adicionales de los reactores preferidos incluyen, pero no están limitados a, medios para controlar la temperatura y/o el pH y la regulación de la temperatura y/o el pH.

55 Según la etapa b) del procedimiento de la invención, la temperatura del hidrolizado de biomasa se ajusta a una temperatura seleccionada del intervalo de 50 a 95°C, preferentemente del intervalo de 60 a 90°C, más preferentemente del intervalo de 65 a 85°C. El ajuste se debe llevar a cabo por cualquier medio conocido por una persona experta en la técnica como apropiado para el procedimiento de la invención.

En una realización particularmente preferida, la etapa b) del procedimiento de la invención se lleva a cabo durante

de 1 minuto a 120 minutos, preferentemente de 2 minutos a 90 minutos y particularmente preferido de 3 minutos a 75 minutos, mientras que de 30 minutos a 90 minutos y de 45 minutos a 75 también son preferidos.

5 Según la etapa c) del procedimiento de la invención, se añade por lo menos un ácido al hidrolizado de biomasa para obtener una mezcla de ácido-hidrolizado de biomasa. El por lo menos un ácido puede ser un ácido orgánico o uno inorgánico. En una realización preferida, el por lo menos un ácido se selecciona preferentemente del grupo que consiste en ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, ácido galacturónico, ácido cítrico, ácido succínico y mezclas de los mismos. En una realización preferida, el por lo menos un ácido se selecciona de ácidos con un valor de pKa por debajo de 5.0, preferentemente de ácidos con un valor de pKa por debajo de 3.5, un valor de pKa de -4.0 a 5.0 es por ello particularmente y de -3.0 a 5.0 es el más preferido.

En una realización preferida adicional, el por lo menos un ácido se añade al hidrolizado de biomasa hasta que se alcanza un pH de 1.5 a 4.5, preferentemente de 2.0 a 4.0 y lo más preferido de 2.5 a 3.5 del hidrolizado de biomasa.

En una realización preferida adicional, la temperatura se selecciona del intervalo de 65 a 85°C y el pH del intervalo de 2.0 a 3.5. En una realización preferida adicional, la temperatura se incrementa a 70°C y el pH se establece en 2.5.

15 En otra realización preferida, las etapas b) y c) del procedimiento de la invención se llevan a cabo por lo menos parcialmente al mismo tiempo. De este modo, se prefiere particularmente que el por lo menos un ácido se añada durante el ajuste de la temperatura del hidrolizado de biomasa a una temperatura seleccionada del intervalo de 60 a 90°C a partir de una temperatura de 50°C, también preferido a partir de una temperatura de 60°C. Se prefiere además que se añada por lo menos un ácido durante el ajuste de la temperatura del hidrolizado de biomasa a una temperatura seleccionada del intervalo de 65 a 85°C, a partir de una temperatura de 50°C, también se prefiere a partir de una temperatura de 60°C.

20 En otra realización preferida, la temperatura del por lo menos un ácido se selecciona del intervalo de 5 a 50°C, preferentemente de 10 a 40°C y lo más preferido de 15 a 30°C y el por lo menos un ácido se añade al hidrolizado de biomasa a una temperatura del hidrolizado de biomasa seleccionada del intervalo de 50 a 95°C, preferentemente de 65 a 85°C. Por ello se prefiere particularmente que la diferencia de temperatura entre el por lo menos un ácido y el hidrolizado de biomasa se seleccione del intervalo de 35 a 95%, preferentemente de 40 a 90%.

También está dentro del alcance de la presente invención que la etapa c) del procedimiento de la invención se lleve a cabo antes de la etapa b).

30 Después de la adición del por lo menos un ácido al hidrolizado de biomasa y del ajuste de la temperatura del hidrolizado de biomasa, la composición resultante se denomina "mezcla de ácido-hidrolizado de biomasa" dentro del alcance de la presente solicitud.

35 Según la etapa (d) del procedimiento de la invención, una fase sólida y una fase líquida se separan de la mezcla de ácido-hidrolizado de biomasa. La separación de la fase sólida y líquida de la mezcla de ácido-hidrolizado (a continuación "fase líquida" o "fase líquida del hidrolizado" se usan como sinónimo de "fase líquida de la mezcla de ácido-hidrolizado") se puede llevar a cabo por cualquier medio conocido por una persona experta en la técnica como apropiada para el propósito de la invención y se lleva a cabo preferentemente por filtración, centrifugación, decantación o prensado, por ejemplo, mediante una prensa de tornillo. Se prefiere una prensa de filtro, lo más preferido una prensa de filtro de membrana. En una realización preferida, la tela de filtro de la prensa de filtro tiene una permeabilidad al aire de 2 a 10 l/dm²/min. También se pueden añadir ayudas de filtración tales como tierra de diatomeas o kieselguhr o perlite durante la filtración, preferentemente en concentraciones de 0.1% en peso a 10% en peso, más preferentemente entre 0.5% en peso y 5% en peso, y lo más preferido entre 1% en peso y 3% en peso.

40 Después de la separación de la fase sólida y la fase líquida, se lleva a cabo la desionización de la fase líquida según la etapa (e). La desionización se lleva a cabo preferentemente mediante electrodiálisis, desionización capacitiva, desionización capacitiva de membrana, nanofiltración, ósmosis inversa, separación cromatográfica tal como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y/o cromatografía de exclusión por tamaño o mediante cualquier combinación de dos o más de estos métodos. La "desionización capacitiva de membrana" se realiza insertando una membrana de intercambio catiónico y una membrana de intercambio aniónico en la unidad de desionización capacitiva.

50 En las realizaciones particularmente preferidas, la desionización se lleva a cabo mediante electrodiálisis estándar o mediante electrodiálisis que usa por lo menos una membrana bipolar, particularmente preferido seguida de desionización capacitiva, desionización capacitiva de membrana o cromatografía de intercambio iónico.

55 Cuando se usa electrodiálisis estándar o electrodiálisis que usa por lo menos una membrana bipolar para la desionización, los iones retirados de la disolución se recuperan preferentemente en un líquido llamado "concentrado". Con respecto a esto, se prefiere particularmente añadir un líquido en un compartimento de la unidad de electrodiálisis antes del comienzo de la desionización. En una realización preferida adicional, este líquido no se reemplaza después de detener la desionización de un volumen dado, sino que el concentrado se reutiliza en desionizaciones repetidas durante por lo menos 2 ciclos, más preferido por lo menos 4 ciclos, particularmente

preferido 6 ciclos y lo más preferido 10 ciclos.

En la presente invención, se debe entender que "electrodiálisis que usa por lo menos una membrana bipolar" es cualquier técnica que comprende el uso de tres tipos diferentes de membranas apropiadas para retirar sales mediante la retirada de iones tales como, por ejemplo, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , SO_4^{2-} , PO_3^{3-} , Cl^- y H_2O ionizada preferentemente el uso de una membrana de intercambio catiónico, una membrana de intercambio aniónico y una capa catalítica intermedia, una denominada "membrana bipolar", para permitir la ionización del agua dentro de la fase líquida en protones y iones hidroxilo. Mediante la combinación de la retirada selectiva de sales por las membranas de intercambio catiónico y aniónico con la disociación simultánea de agua en la capa catalítica intermedia, se forman fracciones ácido y base.

En una realización preferida, se usan por lo menos una membrana de intercambio catiónico, por lo menos una membrana de intercambio aniónico y por lo menos una capa intermedia catalítica o membrana bipolar. En una realización preferida adicional, por lo menos dos conjuntos de estas membranas están dispuestos en serie, preferentemente por lo menos 4 conjuntos, más preferentemente por lo menos 6 conjuntos y lo más preferido por lo menos 10 conjuntos. En una realización particularmente preferida, las tres membranas o todos los conjuntos de membranas como se definieron anteriormente están dispuestos dentro de un único dispositivo.

La desionización se lleva a cabo preferentemente a una temperatura dentro del intervalo de 5°C a 80°C , más preferentemente dentro del intervalo de 10°C a 75°C , lo más preferido dentro del intervalo de 15°C a 70°C . La caída de presión a través de la celda de electrodiálisis es preferentemente inferior a 1 bar, más preferentemente inferior a 0.5 bar. En otra realización particularmente preferida, la desionización se lleva a cabo hasta que la conductividad de la disolución se reduce hasta por lo menos 10 mS/cm, más preferentemente hasta por lo menos 6 mS/cm, particularmente preferido hasta por lo menos 4 mS/cm y lo más preferido hasta por lo menos 2 mS/cm.

En una realización preferida adicional, la desionización por electrodiálisis que usa por lo menos una membrana bipolar es seguida por desionización capacitiva. La desionización capacitiva se aplica preferentemente como la denominada "desionización capacitiva de membrana", es decir, insertando una membrana de intercambio catiónico y una membrana de intercambio aniónico en la unidad de desionización capacitiva. Si la electrodiálisis que usa por lo menos una membrana bipolar es seguida por la desionización capacitiva de membrana, la electrodiálisis se realiza preferentemente hasta que la conductividad de la disolución se reduce hasta por lo menos 10 mS/cm, más preferentemente hasta por lo menos 6 mS/cm, particularmente preferido hasta por lo menos 4 mS/cm y lo más preferido hasta por lo menos 2 mS/cm antes de cambiar a desionización capacitiva de membrana. La desionización capacitiva de membrana después de la diálisis se usa a continuación para disminuir más la conductividad de la disolución preferentemente hasta por lo menos 8 mS/cm, más preferido hasta por lo menos 6 mS/cm, particularmente preferido hasta por lo menos 4 mS/cm y lo más preferido hasta por lo menos 2 mS/cm.

En una realización preferida adicional, la desionización por electrodiálisis que usa por lo menos una membrana bipolar es seguida por cromatografía de intercambio iónico. Si la electrodiálisis que usa por lo menos una membrana bipolar es seguida por cromatografía de intercambio iónico, la electrodiálisis se realiza preferentemente hasta que la conductividad de la disolución se reduce hasta por lo menos a 10 mS/cm, más preferentemente hasta por lo menos 6 mS/cm, particularmente preferido hasta por lo menos 4 mS/cm y lo más preferido por lo menos 2 mS/cm antes de cambiar a desionización capacitiva de membrana. La cromatografía de intercambio iónico después de la electrodiálisis se usa a continuación para disminuir aún más la conductividad de la disolución preferentemente hasta por lo menos 8 mS/cm, más preferentemente hasta por lo menos 6 mS/cm, particularmente preferido hasta por lo menos 4 mS/cm y lo más preferido hasta por lo menos 2 mS/cm.

En la presente invención, "intercambio iónico" se define como un intercambio de iones entre una disolución que contiene por lo menos un ión y un material de intercambio iónico polimérico o mineral sólido, en el que un ión disuelto en la disolución se intercambia y reemplaza por contacto con el material de intercambio iónico por un ion de la misma carga.

La desionización por electrodiálisis que usa por lo menos una membrana bipolar reduce los residuos producidos durante la desionización, así como los costes del procedimiento en otras aplicaciones. El uso de electrodiálisis que usa por lo menos una membrana bipolar conduce a la producción de una fracción base, que se puede usar, por ejemplo, como agente de pH en la producción de enzimas, en la hidrólisis de la biomasa o para el pretratamiento de la biomasa. En una realización preferida, la fracción base producida tiene un pH de 9 a 14, más preferentemente de 12 a 13. El uso de electrodiálisis que usa por lo menos una membrana bipolar también conduce a la producción de una fracción ácida, que se puede usar, por ejemplo, para la hidrólisis de biomasa o para el pretratamiento de la biomasa o para la etapa c) del procedimiento de la invención. En una realización preferida, la fracción ácida producida tiene un pH de 1 a 5, más preferido de 2 a 4. Particularmente preferido es el uso de la fracción ácida para la explosión de vapor. Lo más preferido es la adición de la fracción ácida al hidrolizado de biomasa según la etapa c) del procedimiento de la invención. La desionización por electrodiálisis se lleva a cabo preferentemente con la fase líquida a una temperatura dentro del intervalo de 5°C a 80°C , más preferido de 10°C a 75°C , lo más preferido de 15°C a 70°C . La caída de presión a través de la celda de electrodiálisis es preferentemente inferior a 1 bar, más preferentemente inferior a 0.5 bar. En otra realización particularmente preferida, la desionización se lleva a cabo

mediante electrodiálisis estándar o mediante electrodiálisis que usa por lo menos una membrana bipolar hasta que la conductividad de la disolución se reduce a 10 mS/cm, más preferido hasta 6 mS/cm, particularmente preferido hasta 4 mS/cm y lo más preferido hasta 2 mS/cm. En una realización preferida adicional, la desionización continúa a continuación mediante desionización capacitiva, desionización capacitiva de membrana o cromatografía de intercambio iónico.

En una realización preferida, las resinas de intercambio iónico usadas en la etapa de cromatografía de intercambio iónico son una resina de intercambio catiónico y una resina de intercambio aniónico. En una realización preferida adicional, la resina de intercambio aniónico y la resina de intercambio catiónico se usan en etapas subsecuentes de intercambio iónico. Las resinas de intercambio aniónico particularmente preferidas son las resinas de intercambio aniónico con grupos funcionales de amina terciaria. La matriz de resina de intercambio aniónico es preferentemente un copolímero de estireno y divinilbenceno o una estructura de gel acrílico reticulado. Más preferidas son las resinas de intercambio aniónico en la forma OH⁻. Las resinas de intercambio catiónico particularmente preferidas son las resinas de intercambio catiónico con grupos funcionales sulfonato o ácido carboxílico. La matriz de resina de intercambio catiónico es preferentemente un copolímero de estireno y divinilbenceno o una estructura acrílica reticulada. Más preferidas son las resinas de intercambio catiónico en la forma H⁺. En una realización preferida, las resinas de intercambio iónico tienen una capacidad de por lo menos 0.5 eq/l de resina, más preferentemente por lo menos 1 eq/l de resina, lo más preferido por lo menos 2 eq/l de resina. 1 eq se define como 1 mol del ion que se va a intercambiar por la resina dividido entre la valencia de este ion.

Al poner en contacto la resina de intercambio catiónico con el líquido, el líquido debe estar a una temperatura de 5°C a 135°C, preferentemente entre 10°C y 70°C. Al poner en contacto la resina de intercambio aniónico con el líquido, el líquido debe estar a una temperatura de 5°C a 75°C, preferentemente entre 10°C y 60°C.

En una realización preferida, el tiempo de contacto de cada contacto entre la resina de intercambio iónico y el líquido debe estar entre 0.1 y 300 min, más preferido entre 0.2 y 100 min, lo más preferido entre 0.3 y 10 min.

La resina de intercambio catiónico se regenera usando un ácido, preferentemente ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico o ácido clorhídrico. El ácido usado debe ser concentrado, preferentemente a una concentración entre 0.05 y 20 M, lo más preferentemente entre 0.5 y 10 M. La regeneración de la resina de intercambio catiónico se realiza preferentemente por lo menos a 15°C. La resina de intercambio aniónico se regenera usando una base, preferentemente hidróxido de sodio, carbonato de sodio o carbonato de amonio. La base usada debe ser concentrada, preferentemente a una concentración entre 0.05 y 20 M, lo más preferentemente entre 0.5 y 10 M. La regeneración de la resina de intercambio aniónico se realiza preferentemente por lo menos a 15°C. El tiempo de contacto de la resina de intercambio iónico y la base o el ácido debe ser preferentemente por lo menos 5 min, más preferentemente por lo menos 15 min. Las resinas de intercambio catiónico y aniónico se usan preferentemente durante por lo menos 500 ciclos de desionización-regeneración, más preferentemente durante por lo menos 1500 ciclos.

En una realización preferida, la cromatografía de intercambio iónico se realiza en un lecho fijo o en un lecho móvil dentro de una columna de cromatografía. Sin embargo, el intercambio iónico según la presente invención no se llevará a cabo en una configuración de lecho móvil simulado. Las configuraciones de lecho móvil simulado solo se usan cuando especies con propiedades muy similares tienen que ser separadas unas de otras, como por ejemplo dos monómeros de azúcar en caso de una separación de, por ejemplo, glucosa y xilosa. Sin embargo, en el método de la presente invención, las sales se retiran del líquido, es decir, los iones (especies cargadas) se separan del resto de los componentes (especies no cargadas). Como estas dos clases de componentes a separar unos de otros difieren significativamente en sus propiedades físicas básicas, la configuración de lecho móvil simulado no es apropiada para el método de la presente invención. Además, como una configuración de lecho móvil simulado es una configuración bastante compleja y costosa, la realización preferida que usa un lecho fijo o un lecho móvil dentro de una columna de cromatografía proporciona ventajas adicionales.

En una realización preferida adicional, la resina de intercambio aniónico y la resina de intercambio catiónico están en dos columnas diferentes y no están mezcladas. En una realización preferida adicional, el líquido a desionizar se pone primero en contacto con la resina de intercambio catiónico y a continuación con la resina de intercambio aniónico. Una realización preferida adicional consiste en poner el líquido en contacto con la resina de intercambio catiónico, a continuación, con la resina de intercambio aniónico y a continuación nuevamente con resina de intercambio catiónico de nueva aportación o con la resina de intercambio catiónico que ya se ha usado en la primera etapa. Una realización preferida adicional consiste en ciclos repetitivos de resina de intercambio catiónico y resina de intercambio aniónico. La resina de intercambio iónico usada en los ciclos repetidos puede ser resina de intercambio iónico de nueva aportación o resina de intercambio iónico que ya se ha usado en un ciclo anterior. El número de ciclos de contacto repetidos entre la resina de intercambio iónico y el líquido está preferentemente entre 1 y 10, lo más preferentemente entre 2 y 5.

Cuando se pone en contacto el líquido con la resina de intercambio iónico en una columna, el caudal debe estar preferentemente entre 1 y 200 volúmenes de lecho por hora, más preferentemente entre 2 y 80 volúmenes de lecho por hora.

En una realización preferida adicional, la cromatografía de intercambio iónico se realiza en un depósito agitado.

En otra realización particularmente preferida, se añade por lo menos un adsorbente antes o durante cualquiera de las etapas (b), (c) o (d). El por lo menos un adsorbente se selecciona preferentemente del grupo que consiste en bentonita, carbón, carbón activado, tierra de diatomeas o kieselguhr, perlite, tierra de blanqueo, minerales arcillosos, resinas poliméricas y cualquier mezcla de los mismos.

- 5 La realización de las etapas de a) a e) del procedimiento de la invención conducirá a una composición que se denomina "hidrolizado purificado" dentro del alcance de la presente solicitud.

El contenido de sal del hidrolizado purificado es preferentemente como mucho 80%, preferentemente como mucho 60%, más preferido como mucho 40%, más preferido como mucho 20% y lo más preferido como mucho 10%, todo con relación al contenido de sal después de la hidrólisis del sustrato.

- 10 El hidrolizado purificado preparado según el procedimiento de la invención se puede usar como medio de fermentación.

Los compuestos orgánicos valiosos que son el resultado de la fermentación bacteriana del hidrolizado purificado comprenden, pero no están limitados a, ácidos orgánicos (tales como ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, ácido itacónico, ácido fumárico, ácido propiónico y ácido glucurónico), aminoácidos (tales como ácido glutámico, leucina, lisina, treonina, ácido aspártico, fenilalanina, cisteína), caprolactamas (tales como alfa-amino-caprolactama),
15 antibióticos (tales como bleomicina, virginamicina, lincomicina, monensina, blasticidina, tetraciclina), vitaminas (tales como la vitamina B2, B12 y C), enzimas, nucleótidos/nucleósidos (tales como NADH, ATP, cAMP, FAD, coenzima A), biogás, biopolímeros (tales como polihidroxibutirato, poliamidas/fibroínas), proteínas, polisacáridos (tales como xantano, dextrano), aminoglucanos (tales como ácido hialurónico), así como disolventes orgánicos y biocombustibles
20 (tales como acetona, etanol, butanol, propanodiol).

Los compuestos orgánicos valiosos que son el resultado de la fermentación con levadura del hidrolizado purificado comprenden, pero no están limitados a, disolventes orgánicos (por ejemplo, etanol, propanol), nucleótidos (por ejemplo, ARN), biotensioactivos (por ejemplo, lípidos de soforosa), enzimas y biopolímeros (por ejemplo, espidroínas).

- 25 Los compuestos orgánicos valiosos que son el resultado de la fermentación fúngica del hidrolizado purificado comprenden ácidos orgánicos (tales como ácido cítrico, ácido fumárico, ácido itacónico), antibióticos (tales como penicilina, cefalosporina), enzimas y polisacáridos (tales como quitina).

En una realización preferida adicional de este procedimiento, el compuesto orgánico se selecciona de alcoholes, ácidos orgánicos, biopolímeros, antibióticos, aminoácidos, caprolactamas, polisacáridos, disolventes orgánicos,
30 biocombustibles, aminoglucanos, nucleótidos/nucleósidos, vitaminas, biotensioactivos, enzimas y mezclas de los mismos.

Ejemplos y figuras

La presente invención se describe ahora mediante los siguientes ejemplos y figuras. Los ejemplos y figuras son para propósitos ilustrativos solo y no se debe entender que limitan la invención.

- 35 La Fig. 1 muestra el incremento relativo de la retirada de sal después de la cromatografía de intercambio iónico de hidrolizado no tratado (columna izquierda) y después de la cromatografía de intercambio iónico de hidrolizado tratado (procedimiento de la invención: calentamiento a 70°C, seguido de un cambio de pH a 2.5) (columna derecha) cuando se lleva a cabo el procedimiento de la presente invención según el ejemplo 1.

La Fig. 2 muestra el incremento relativo de peso de la resina de intercambio aniónico después de la cromatografía de intercambio iónico de hidrolizado no tratado (columna izquierda) y después de la cromatografía de intercambio iónico de hidrolizado tratado (procedimiento de la invención: calentamiento a 70°C, seguido de un cambio de pH a 2.5) (columna derecha) cuando se lleva a cabo el procedimiento de la presente invención según el ejemplo 1.

La Fig. 3 muestra el incremento relativo de la retirada de sal después de la cromatografía de intercambio iónico de hidrolizado no tratado (columna izquierda) y después de la cromatografía de intercambio iónico de hidrolizado tratado (procedimiento de la invención: adición de bentonita, calentamiento a 70°C, seguido de un cambio de pH a 2.5) (columna derecha) cuando se lleva a cabo el procedimiento de la presente invención según el ejemplo 2.

La Fig. 4 muestra el incremento relativo de peso de la resina de intercambio aniónico después de la cromatografía de intercambio iónico de hidrolizado no tratado (columna izquierda) y después de la cromatografía de intercambio iónico de hidrolizado tratado (procedimiento de la invención: adición de bentonita, calentamiento a 70°C, seguido de un cambio de pH a 2.5) (columna derecha) cuando se lleva a cabo el procedimiento de la presente invención según el ejemplo 2.

La Fig. 5 muestra el incremento relativo de la retirada de sal después de la cromatografía de intercambio iónico de hidrolizado no tratado (columna izquierda) y después de la cromatografía de intercambio iónico de hidrolizado tratado (procedimiento de la invención: calentamiento a 70°C, seguido de un cambio de pH a 2.5 y adición de

kieselguhr) (columna derecha) cuando se lleva a cabo el procedimiento de la presente invención según el ejemplo 3.

La Fig. 6 muestra el incremento relativo de peso de la resina de intercambio aniónico después de la cromatografía de intercambio iónico de hidrolizado no tratado (columna izquierda) y después de la cromatografía de intercambio iónico de hidrolizado tratado (procedimiento de la invención: calentamiento a 70°C, seguido de un cambio de pH a 2.5 y adición de kieselguhr) (columna derecha) cuando se lleva a cabo el procedimiento de la presente invención según el ejemplo 3.

La Fig. 7 muestra la cantidad relativa de xilosa consumida después de 16 h de fermentación de *Pachysolen tannophilus* cuando se usa hidrolizado tratado según la presente invención como se describe en el ejemplo 4.

La Fig. 8 muestra el rendimiento de la fermentación en términos de g de ácido itacónico producido después de 100 h de fermentación de *Aspergillus terreus* por g de azúcar cuando se usa hidrolizado tratado según la presente invención como se describe en el ejemplo 5.

La Fig. 9 muestra el rendimiento de la fermentación en términos de g de ácido itacónico producido después de 100 h de fermentación de *Aspergillus terreus* por g de azúcar cuando se usa hidrolizado tratado según la presente invención como se describe en el ejemplo 6.

Ejemplo 1:

La paja de cereal con un contenido de materia seca de 45% en peso se pretrató por explosión de vapor (220°C). Después de la explosión de vapor, la paja de cereal así pretratada ("sustrato") se introdujo en un depósito agitado (Labfors, Infors AG, Suiza). Se añadió una composición enzimática que contenía 91.3% en peso de Celluclast® (Celulasa de *Trichoderma reesei* ATCC 26921, C2730 Sigma) y 8.7% en peso de Glucosidasa (49291 Sigma) al sustrato con una relación de enzima a sólido de 0.5% en peso para hidrolizar el sustrato para obtener una suspensión. La hidrólisis se llevó a cabo a 50°C, pH 5.0 durante 72 horas con agitación a 50 rpm. Después de la hidrólisis, la suspensión se calentó a 70°C durante 1 h mientras se agitaba a 200 rpm y a continuación el pH se ajustó a 2.5 usando H₂SO₄ 1 M. La suspensión así tratada se filtró a continuación usando una prensa de filtro con tela de filtro que tenía una permeabilidad al aire de 5 l/dm²/min a una presión constante de 3 bar para obtener una fase líquida y una sólida. A continuación, se desionizaron 200 ml de la fase líquida usando resinas de intercambio iónico: el líquido se bombeó a una columna de vidrio (XK16, GE Healthcare) que contenía 30 g de resina de intercambio catiónico (Lewatit® S8528, Lanxess) a una velocidad de bombeo de 5 ml/min y a temperatura ambiente. Después de la columna de intercambio catiónico, la fase líquida resultante se bombeó a una columna de vidrio (XK16, GE Healthcare) que contenía 30 g de resina de intercambio aniónico (Lewatit® S6368 A, Lanxess) a una velocidad de bombeo de 5 ml/min y a temperatura ambiente. La misma desionización se realizó con hidrolizado que no se trató con una etapa de calentamiento y un cambio de pH a pH 2.5 (es decir, procedimiento del estado de la técnica). El procedimiento de purificación mejorado se demostró por dos medios: (1) la eficiencia de desionización y (2) el ensuciamiento en la resina IEX.

La eficiencia de desionización en ambos ensayos se determinó midiendo la cantidad de sales retiradas de la fase líquida del hidrolizado. Los resultados se muestran en la figura 1. La comparación muestra un incremento significativo de la retirada de sal para la fase líquida del hidrolizado que se trató con la etapa de calentamiento y el cambio de pH, con relación a la retirada de sal de la fase líquida no tratada del hidrolizado (procedimiento del estado de la técnica).

El ensuciamiento de la resina de intercambio aniónico en ambos ensayos se determinó comparando el incremento de peso de la resina de intercambio aniónico antes y después de la desionización. Los resultados se muestran en la figura 2. La comparación de este valor entre ambos ensayos indica un ensuciamiento más fuerte en un 30.3% en la resina que se puso en contacto con el hidrolizado no tratado (producido según el procedimiento del estado de la técnica).

Ejemplo 2

La paja de cereal con un contenido de materia seca de 45% en peso se pretrató mediante explosión de vapor (220°C). Después de la explosión de vapor, la paja de cereal así pretratada ("sustrato") se introdujo en un depósito agitado (Labfors, Infors AG, Suiza). Una composición enzimática que contiene 91.3% en peso de Celluclast® (Celulasa de *Trichoderma reesei* ATCC 26921, C2730 Sigma) y 8.7% en peso de glucosidasa (49291 Sigma) se añadieron al sustrato en una relación de enzima a sólido de 0.5% en peso para hidrolizar el sustrato para obtener una suspensión. La hidrólisis se llevó a cabo a 50°C, pH 5.0 durante 72 horas con agitación a 50 rpm. Después de la hidrólisis, se añadió a la suspensión 2% en peso de bentonita (Tonsil® 210 FF, Clariant Produkte (Deutschland) GmbH) y la mezcla se agitó a 200 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, la suspensión se calentó a 70°C durante 1 hora mientras se agitaba a 200 rpm y a continuación se ajustó el pH a 2.5 usando H₂SO₄ 1 M. La suspensión así tratada se filtró a continuación usando una prensa de filtro con tela de filtro que tenía una permeabilidad al aire de 5 l/dm²/min a una presión constante de 3 bar para obtener una fase líquida y una sólida. A continuación, se desionizaron 200 ml de la fase líquida usando resinas de intercambio iónico: el líquido se bombeó a una columna de vidrio (XK16, GE Healthcare) que contiene 30 g de resina de intercambio catiónico (Lewatit® S8528, Lanxess) a una velocidad de bombeo de 5 ml/min y a temperatura ambiente. Después de la columna de intercambio

catiónico, la fase líquida resultante se bombeó a una columna de vidrio (XK16, GE Healthcare) que contenía 30 g de resina de intercambio aniónico (Lewatit® S6368 A, Lanxess) a una velocidad de bombeo de 5 ml/min y a temperatura ambiente. La misma desionización se realizó con hidrolizado que no se trató con bentonita, con una etapa de calentamiento y un cambio de pH a pH 2.5 (es decir, un procedimiento del estado de la técnica). El procedimiento de purificación mejorado se demostró por dos medios: (1) la eficiencia de desionización y (2) el ensuciamiento en la resina IEX.

La eficiencia de desionización en ambos ensayos se determinó midiendo la cantidad de sales retiradas de la fase líquida del hidrolizado. Los resultados se muestran en la figura 3. La comparación muestra un incremento significativo en la retirada de sal para la fase líquida del hidrolizado que se trató con bentonita, con la etapa de calentamiento y con el cambio de pH, con relación a la retirada de sal de la fase líquida no tratada del hidrolizado (procedimiento del estado de la técnica).

El ensuciamiento de la resina de intercambio aniónico en ambos ensayos se determinó comparando el aumento de peso de la resina de intercambio aniónico antes y después de la desionización. Los resultados se muestran en la figura 4. La comparación de este valor entre ambos ensayos indica un ensuciamiento más fuerte en un 26.5% en la resina que se puso en contacto con el hidrolizado no tratado (producido según el procedimiento del estado de la técnica).

Ejemplo 3

La paja de cereal con un contenido de materia seca de 45% en peso se pretrató mediante explosión de vapor (220°C). Después de la explosión de vapor, la paja de cereal así pretratada ("sustrato") se introdujo en un depósito agitado (Labfors, Infors AG, Suiza). Se añadió una composición enzimática que contenía 91.3% en peso de Celluclast® (Celulasa de *Trichoderma reesei* ATCC 26921, C2730 Sigma) y 8.7% en peso de Glucosidasa (49291 Sigma) al sustrato con una relación de enzima a sólido de 0.5% en peso para hidrolizar el sustrato para obtener una suspensión. La hidrólisis se llevó a cabo a 50°C, pH 5.0 durante 72 horas con agitación a 50 rpm. Después de la hidrólisis, la suspensión se calentó a 70°C durante 1 h mientras se agitaba a 200 rpm y a continuación el pH se ajustó a 2.5 usando H₂SO₄ 1 M. A continuación, se añadió 2% en peso de kieselguhr (Becogur® 200, Eaton) a la suspensión y se agitó a 200 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente. La suspensión así tratada se filtró a continuación usando una prensa de filtro con tela de filtro que tenía una permeabilidad al aire de 5 l/dm²/min a una presión constante de 3 bar para obtener una fase líquida y una sólida. La fase líquida se desionizó a continuación usando resinas de intercambio iónico: el líquido se vertió en un depósito de vidrio agitado (Multifors, Infors AG) y se añadió resina de intercambio catiónico al 15% en peso (Lewatit® S8528, Lanxess) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 hora a 200 rpm. A continuación, la resina de intercambio catiónico se retiró mediante filtración de la mezcla usando un filtro de papel (cinta negra 589/1, Whatman). La fase líquida resultante se vertió nuevamente en un depósito de vidrio agitado (Multifors, Infors AG) y se añadió 15% en peso de resina de intercambio aniónico (Lewatit® S6368 A, Lanxess) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 hora a 200 rpm. A continuación, la resina de intercambio aniónico se retiró por filtración de la mezcla usando un filtro de papel (cinta negra 589/1, Whatman). La misma desionización se realizó con hidrolizado que no se trató con una etapa de calentamiento y un cambio de pH a pH 2.5, seguido de la adición de kieselguhr (procedimiento de "estado de la técnica"). El procedimiento de purificación mejorado se demostró por dos medios: (1) la eficiencia de desionización y (2) el ensuciamiento de la resina IEX.

La eficiencia de desionización en ambos ensayos se determinó midiendo la cantidad de sales retiradas de la fase líquida del hidrolizado. Los resultados se muestran en la figura 5. La comparación muestra un incremento significativo de la retirada de sal para la fase líquida del hidrolizado que se trató con la etapa de calentamiento y con el cambio de pH, seguido de la adición de kieselguhr, con relación a la retirada de sal de la fase líquida no tratada del hidrolizado (procedimiento del estado de la técnica).

El ensuciamiento de la resina de intercambio aniónico en ambos ensayos se determinó comparando el incremento de peso de la resina de intercambio aniónico antes y después de la desionización. Los resultados se muestran en la figura 6. La comparación de este valor entre ambos ensayos indica un ensuciamiento más fuerte en un 26.4% en la resina que se puso en contacto con el hidrolizado no tratado (producido según el procedimiento del estado de la técnica).

Ejemplo 4

La paja de cereal con un contenido de materia seca de 45% en peso se pretrató mediante explosión de vapor (220°C). Después de la explosión de vapor, la paja de cereal así pretratada ("sustrato") se introdujo en un depósito agitado (Labfors, Infors AG, Suiza). Se añadió una composición enzimática que contenía 91.3% en peso de Celluclast® (Celulasa de *Trichoderma reesei* ATCC 26921, C2730 Sigma) y 8.7% en peso de Glucosidasa (49291 Sigma) al sustrato en una relación de enzima a sólido de 0.5% en peso para hidrolizar el sustrato para obtener una suspensión. La hidrólisis se llevó a cabo a 50°C, pH 5.0 durante 72 horas con agitación a 50 rpm. Después de la hidrólisis, la suspensión se calentó a 70°C durante 1 h mientras se agitaba a 200 rpm y a continuación el pH se ajustó a 2.5 usando H₂SO₄ 1 M. La suspensión así tratada se filtró a continuación usando una prensa de filtro con tela de filtro que tiene una permeabilidad al aire de 5 l/dm²/min a una presión constante de 3 bar para obtener una

fase líquida y una sólida. La fase líquida se desionizó a continuación por electrodiálisis usando membranas bipolares (ED64004, PCCell) con una pila de membranas compuesta de 10 membranas bipolares (PCCell), 10 membranas de intercambio aniónico (PC 200D, PCCell) y 9 membranas de intercambio catiónico (PC SK, PCCell). La electrodiálisis se realizó a 32°C durante un período de 2 h y con velocidades de bombeo de 50 l/h para el diluido y el concentrado.

5 Después de 2 h, la conductividad disminuyó en un 83%. El pesaje de las membranas de electrodiálisis después de la desionización mostró que estas membranas tenían un peso menor en comparación con las membranas usadas con hidrolizado no tratado (producido según el procedimiento del estado de la técnica).

Después de ser sometido a electrodiálisis, el hidrolizado tratado se usó como sustrato para la fermentación de *Pachysolen tannophilus*. La fermentación se realizó en un depósito de vidrio agitado (Multifors, Infors AG, Suiza) con un dispositivo de control de temperatura y pH. La fermentación se inició añadiendo 10% (peso/peso) de cultivo de siembra de *Pachysolen tannophilus* (DSMZ No. 70352, Braunschweig) a 750 ml del hidrolizado tratado después de la electrodiálisis. La fermentación se realizó en modo discontinuo a 30°C y pH 6.0, con agitación a 200 rpm durante 100 horas. En comparación con el hidrolizado no tratado, la tasa de consumo de xilosa se incrementó significativamente cuando se usó el hidrolizado según el procedimiento de la invención, acelerando significativamente de este modo el procedimiento de fermentación, incrementando la productividad y reduciendo los costes. Los resultados se muestran en la figura 7.

Ejemplo 5

La paja de cereal con un contenido de materia seca de 45% en peso se pretrató mediante explosión de vapor (220°C). Después de la explosión de vapor, la paja de cereal así pretratada ("sustrato") se introdujo en un depósito agitado (Labfors, Infors AG, Suiza). Se añadió una composición enzimática que contenía 91.3% en peso de Celluclast® (Celulasa de *Trichoderma reesei* ATCC 26921, C2730 Sigma) y 8.7% en peso de Glucosidasa (49291 Sigma) al sustrato en una relación de enzima a sólido de 0.5% en peso para hidrolizar el sustrato para obtener una suspensión. La hidrólisis se llevó a cabo a 50°C, pH 5.0 durante 72 horas con agitación a 50 rpm. Después de la hidrólisis, la suspensión se calentó a 70°C durante 1 h mientras se agitaba a 200 rpm y a continuación el pH se ajustó a 2.5 usando H₂SO₄ 1 M. La suspensión así tratada se filtró a continuación usando una prensa de filtro con tela de filtro que tenía una permeabilidad al aire de 5 l/dm²/min a una presión constante de 3 bar para obtener una fase líquida y una sólida. La fase líquida se desionizó a continuación por electrodiálisis usando membranas bipolares (ED64004, PCCell) con una pila de membranas compuesta de 10 membranas bipolares (PCCell), 10 membranas de intercambio aniónico (PC 200D, PCCell) y 9 membranas de intercambio catiónico (PC SK, PCCell). La electrodiálisis se realizó a 32°C durante un período de 2 h y con velocidades de bombeo de 50 l/h para el diluido y el concentrado. Después de 2 h, la conductividad disminuyó en un 83%. El pesaje de las membranas de electrodiálisis después de la desionización mostró que estas membranas tenían un peso menor en comparación con las membranas usadas con hidrolizado no tratado (producido después del procedimiento de última generación). El ensuciamiento de las membranas usadas con hidrolizado tratado se redujo de este modo en comparación con el rendimiento de electrodiálisis con hidrolizado no tratado (estado de la técnica).

Después de ser sometido a electrodiálisis, el hidrolizado tratado se usó como sustrato para la fermentación de *Aspergillus terreus*. La fermentación se realizó en matraces de agitación de 50 ml colocados en una incubadora (Multitron, Infors AG, Suiza). La fermentación se inició añadiendo 10% (peso/peso) de cultivo de siembra de *Aspergillus terreus* (ATCC 32359) a 10 ml del hidrolizado tratado después de la electrodiálisis. La fermentación se realizó en modo discontinuo a 35°C y pH 3.0, con agitación a 250 rpm durante 100 horas a una humedad relativa del 80%. Mientras que la fermentación de *Aspergillus terreus* en el hidrolizado no tratado no mostró crecimiento significativo ni producción significativa de ácido itacónico, el hidrolizado tratado según la presente invención permitió un crecimiento celular significativo y una producción significativa de ácido itacónico. El rendimiento de la fermentación en términos de g de ácido itacónico por g de azúcar se muestra en la figura 8.

Ejemplo 6

La paja de cereal con un contenido de materia seca de 45% en peso se pretrató mediante explosión de vapor (220°C). Después de la explosión de vapor, la paja de cereal así pretratada ("sustrato") se introdujo en un depósito agitado (Labfors, Infors AG, Suiza). Se añadió una composición enzimática que contiene 91.3% en peso de Celluclast® (Celulasa de *Trichoderma reesei* ATCC 26921, C2730 Sigma) y 8.7% en peso de Glucosidasa (49291 Sigma) al sustrato en una relación de enzima a sólido de 0.5% en peso para hidrolizar el sustrato para obtener una suspensión. La hidrólisis se llevó a cabo a 50°C, pH 5.0 durante 72 horas con agitación a 50 rpm. Después de la hidrólisis, la suspensión se calentó a 70°C durante 1 h mientras se agitaba a 200 rpm y a continuación el pH se ajustó a 2.5 usando H₂SO₄ 1 M. La suspensión así tratada se filtró a continuación usando una prensa de filtro con tela de filtro que tenía una permeabilidad al aire de 5 l/dm²/min a una presión constante de 3 bar para obtener una fase líquida y una sólida. La fase líquida se desionizó a continuación por electrodiálisis usando membranas bipolares (ED64004, PCCell) con una pila de membranas compuesta de 10 membranas bipolares (PCCell), 10 membranas de intercambio aniónico (PC 200D, PCCell) y 9 membranas de intercambio catiónico (PC SK, PCCell). La electrodiálisis se realizó a 32°C durante un período de 2 h y con velocidades de bombeo de 50 l/h para el diluido y el concentrado. Después de 2 h, la conductividad disminuyó en un 83%. El pesaje de las membranas de electrodiálisis después de la desionización mostró que estas membranas tenían un peso menor en comparación con las membranas usadas con hidrolizado no tratado (producido después del procedimiento del estado de la técnica).

Después de ser sometido a electrodiálisis, 200 ml de este hidrolizado tratado se pusieron en contacto con 30 g de resina de intercambio iónico (Lewatit® S6368 A, Lanxess) en una columna de vidrio XK16 usando una unidad Äkta Explorer (GE Healthcare). El caudal fue de 1 ml/min y el contacto se realizó a 21°C.

- 5 Después de ser sometido a electrodiálisis y cromatografía de intercambio iónico, el hidrolizado tratado se usó como sustrato para la fermentación de *Aspergillus terreus*. La fermentación se realizó en matraces de agitación de 50 ml colocados en una incubadora (Multitron, Infors AG, Suiza). La fermentación se inició mediante la adición de 10% (peso/peso) de cultivo de semillas de *Aspergillus terreus* (ATCC 32359) a 10 ml del hidrolizado tratado después de la electrodiálisis y la cromatografía de intercambio iónico. La fermentación se realizó en modo discontinuo a 35°C y pH 3.0, con agitación a 250 rpm durante 100 horas a una humedad relativa del 80%. Aunque la fermentación de
- 10 *Aspergillus terreus* en el hidrolizado no tratado no mostró crecimiento significativo ni producción significativa de ácido itacónico, el hidrolizado tratado según la presente invención permitió un crecimiento celular significativo y una producción significativamente mejorada de ácido itacónico. El rendimiento de la fermentación en términos de ácido itacónico por g de azúcar se muestra en la figura 9.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la purificación de hidrolizado de biomasa que comprende las etapas
 - a) Proporcionar un hidrolizado de biomasa, en el que el hidrolizado se prepara añadiendo enzimas hidrolasa a la biomasa;
 - 5 b) Ajustar la temperatura del hidrolizado de biomasa a una temperatura seleccionada del intervalo de 50 a 95°C;
 - c) Adición de por lo menos un ácido al hidrolizado de biomasa;
 - d) Separación sólido-líquido de la mezcla de ácido-hidrolizado de biomasa para obtener una fase sólida y una fase líquida;
 - 10 e) Desionización de la fase líquida de la mezcla de ácido-hidrolizado de biomasa después de la separación según la etapa d).
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la temperatura según la etapa b) se selecciona del intervalo de 65 a 90°C.
3. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el por lo menos un ácido se añade hasta que se llega a un pH de 2.0 a 4.5 del hidrolizado de biomasa
- 15 4. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el por lo menos un ácido se selecciona de ácidos con un valor de pKa de -4.0 a 5.0.
5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se añade por lo menos un adsorbente antes o durante cualquiera de las etapas b) o d).
- 20 6. Un procedimiento según la reivindicación 5, en el que el por lo menos un adsorbente se selecciona del grupo que consiste en bentonita, carbón vegetal, carbono activado, diatomita, kieselguhr, tierra de blanqueo, minerales arcillosos, resinas poliméricas y cualquier mezcla de los mismos.
7. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las etapas a) y c) se llevan a cabo por lo menos parcialmente al mismo tiempo.
- 25 8. Un procedimiento según la reivindicación 7, en el que el por lo menos un ácido se añade durante el ajuste de la temperatura del hidrolizado a una temperatura seleccionada del intervalo de 65 a 90°C, a partir de una temperatura de 50°C.
9. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la temperatura del por lo menos un ácido se selecciona de 5 a 45°C y el por lo menos un ácido se añade al hidrolizado de biomasa a una temperatura del hidrolizado seleccionada del intervalo de 70 a 95°C.
- 30 10. Un procedimiento según la reivindicación 9, en el que la diferencia de temperatura entre el por lo menos un ácido y el hidrolizado de biomasa se selecciona del intervalo de 35 a 95°C.
11. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la desionización se lleva a cabo por electrodiálisis, cromatografía de intercambio iónico, desionización capacitiva de membrana, nanofiltración, ósmosis inversa, separación cromatográfica, cromatografía hidrófoba y/o cromatografía de exclusión de tamaño o cualquier combinación de los mismos.
- 35 12. Un procedimiento según la reivindicación 11, en el que la desionización se lleva a cabo por electrodiálisis seguido de desionización capacitiva de membrana o por cromatografía de intercambio iónico.
13. Un procedimiento según la reivindicación 11, en el que la desionización se lleva a cabo por electrodiálisis que usa por lo menos una membrana bipolar.
- 40 14. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u 11 a 13, en el que la etapa c) se lleva a cabo antes de la etapa b).

Fig. 1

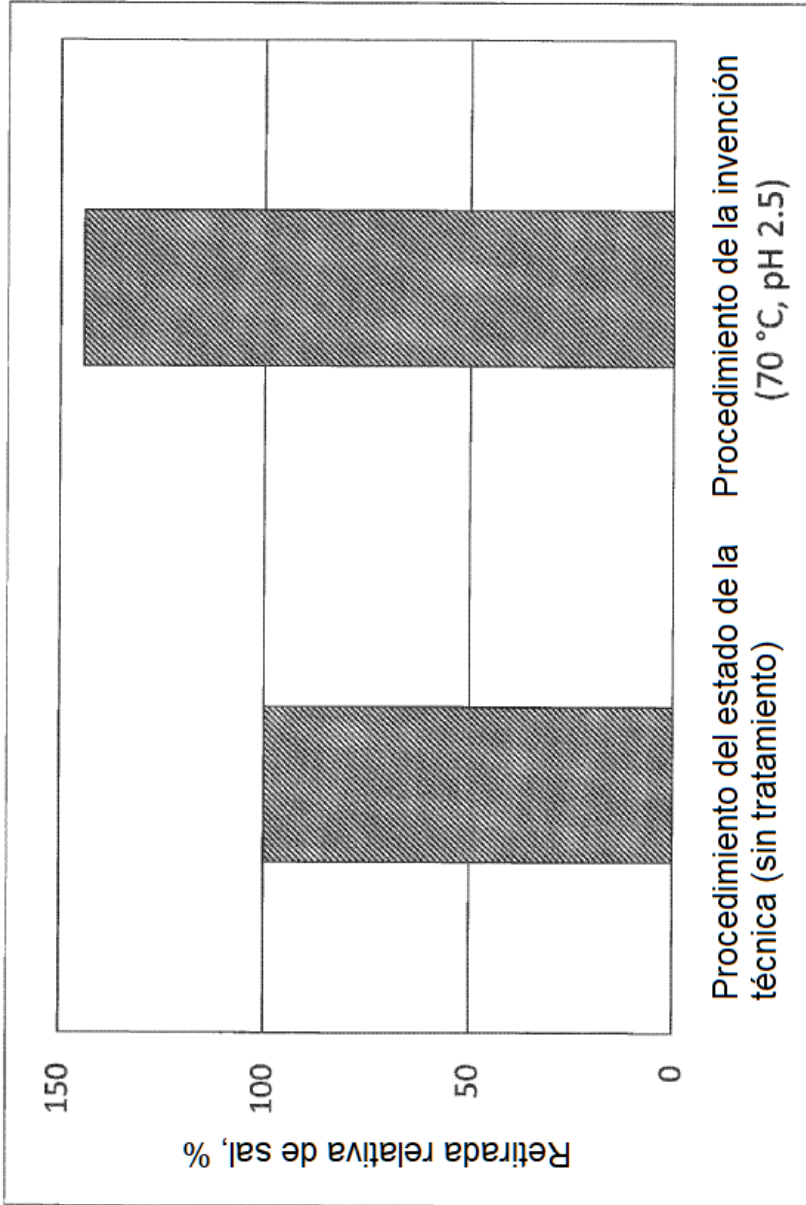


Fig. 2

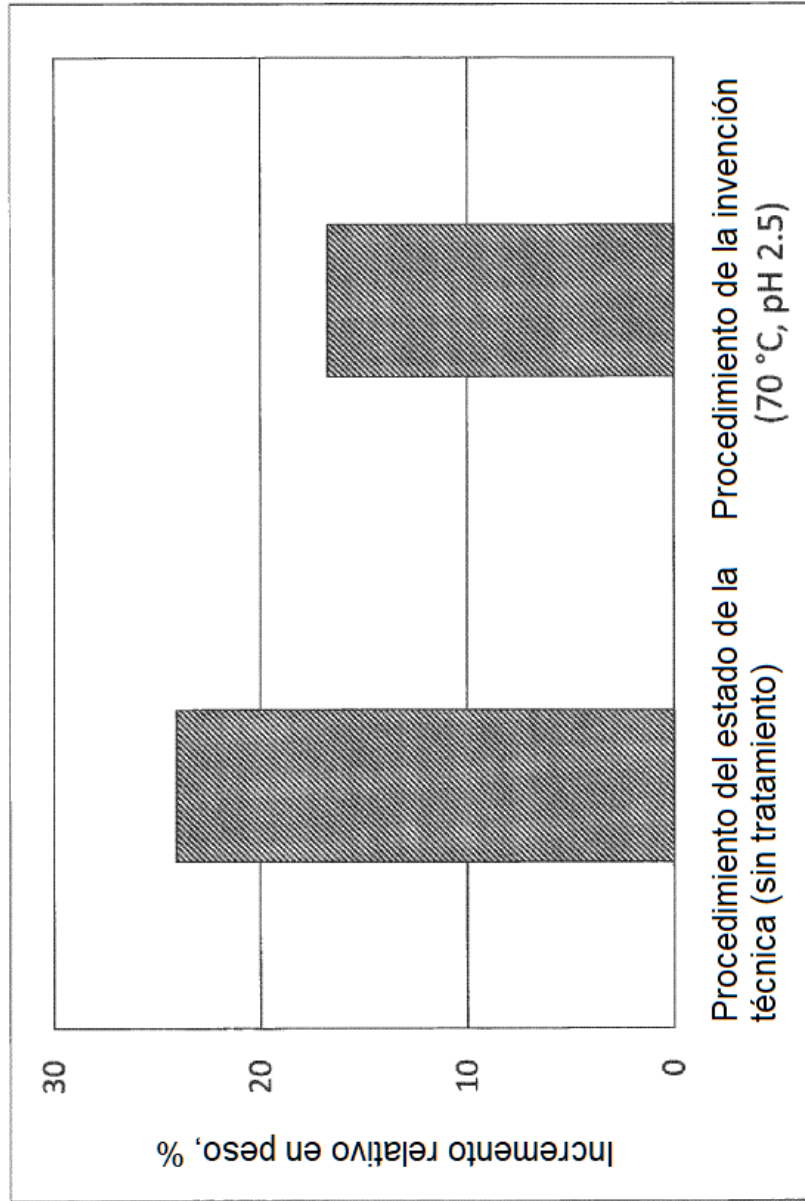


Fig. 3

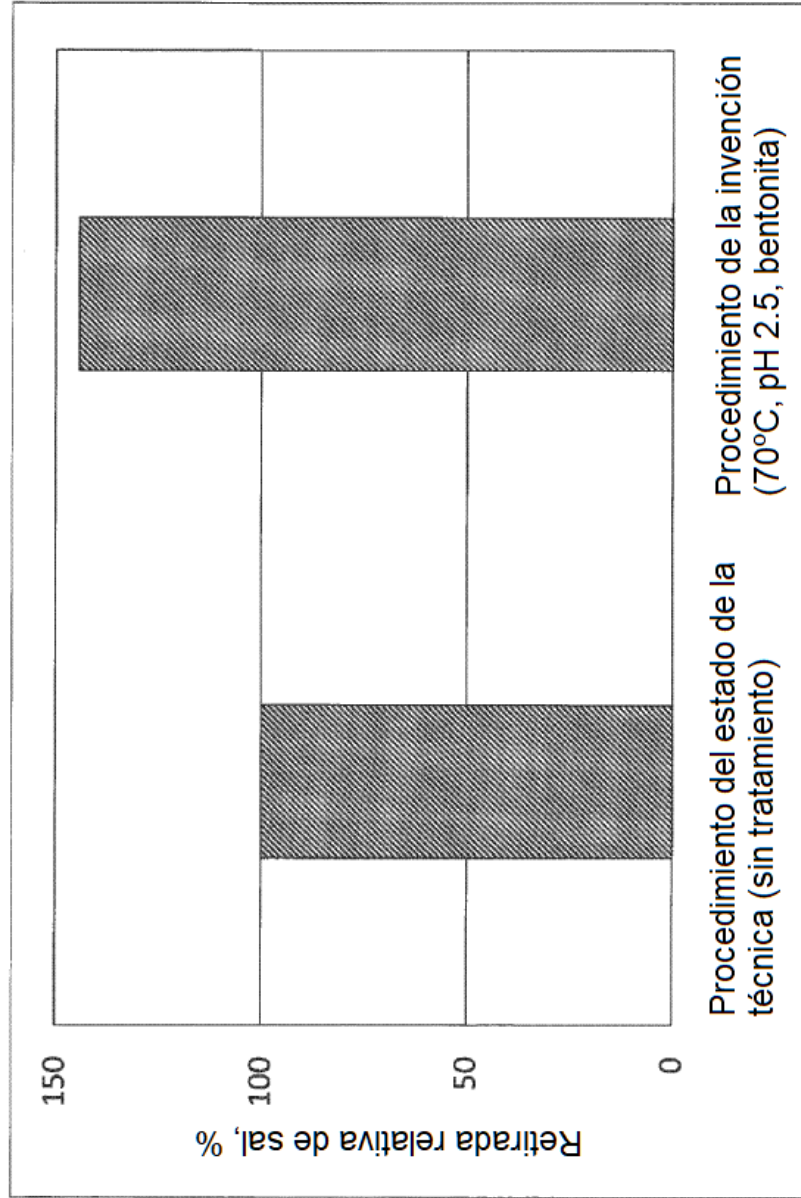


Fig. 4

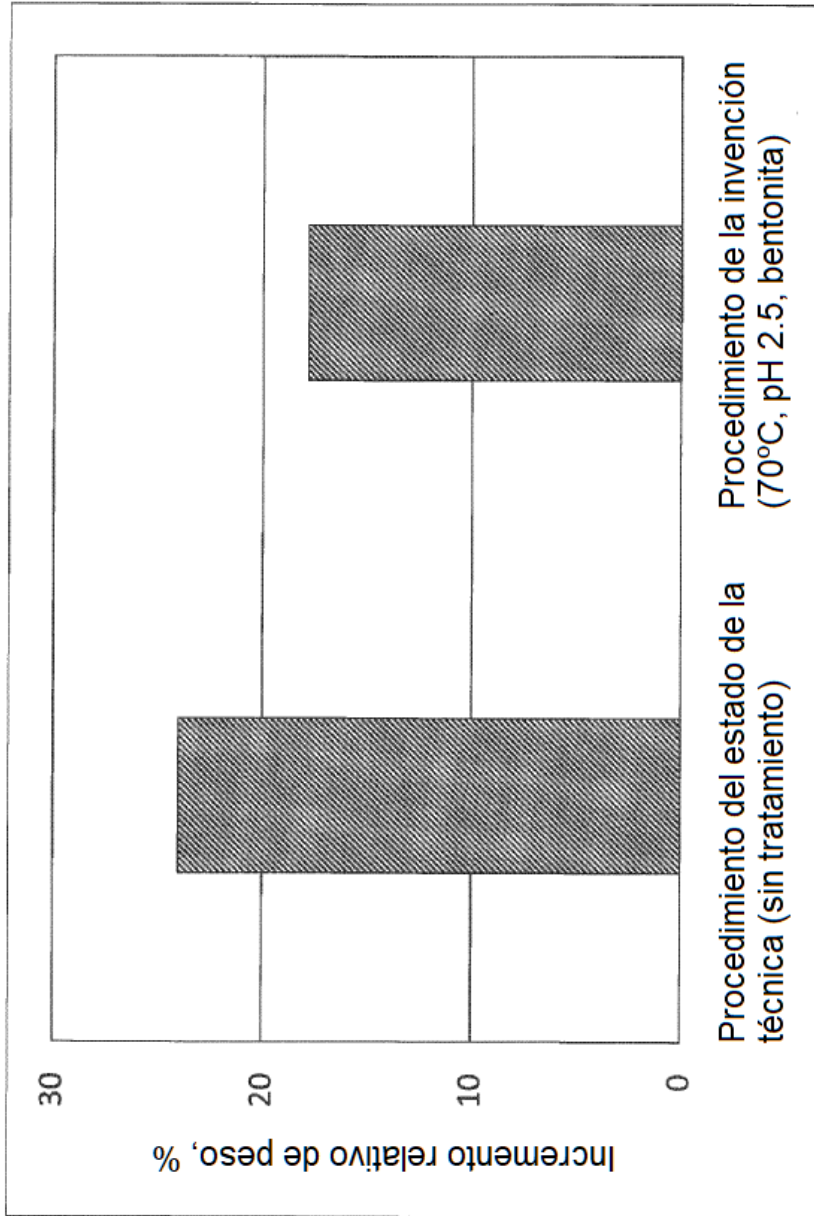


Fig. 5

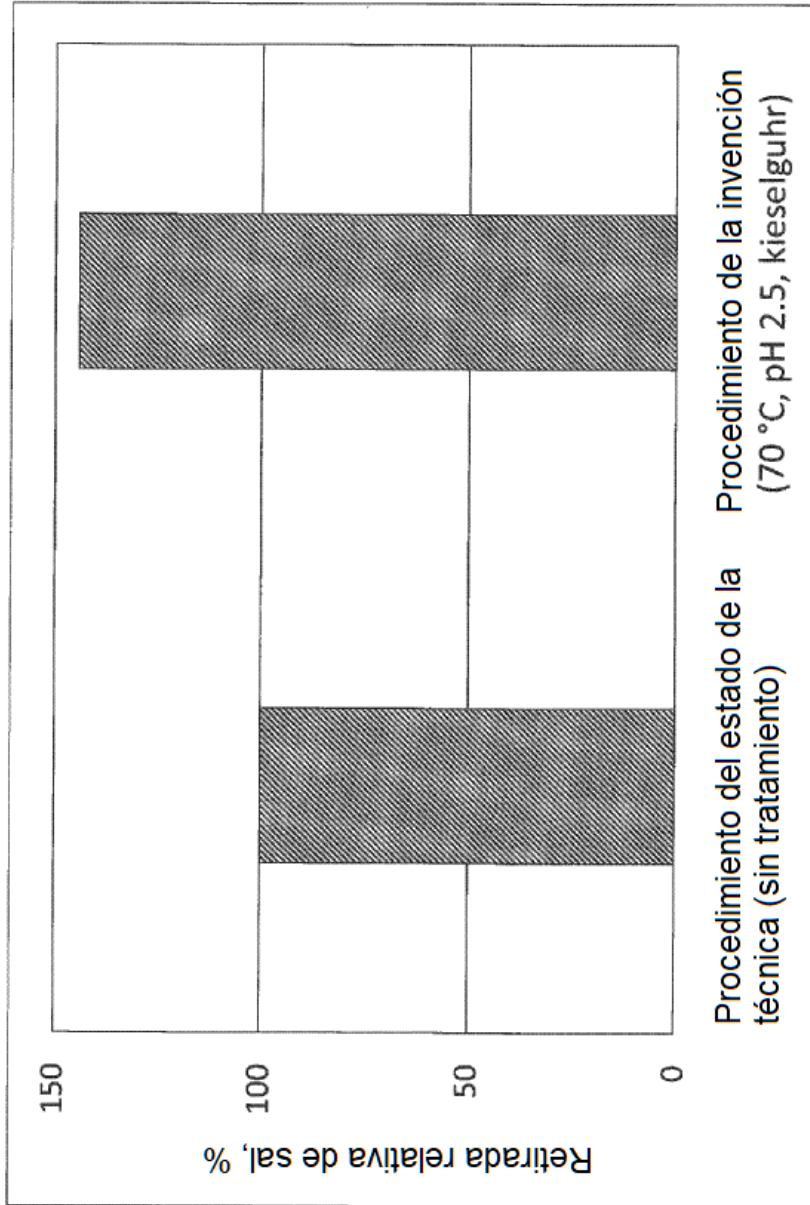


Fig. 6

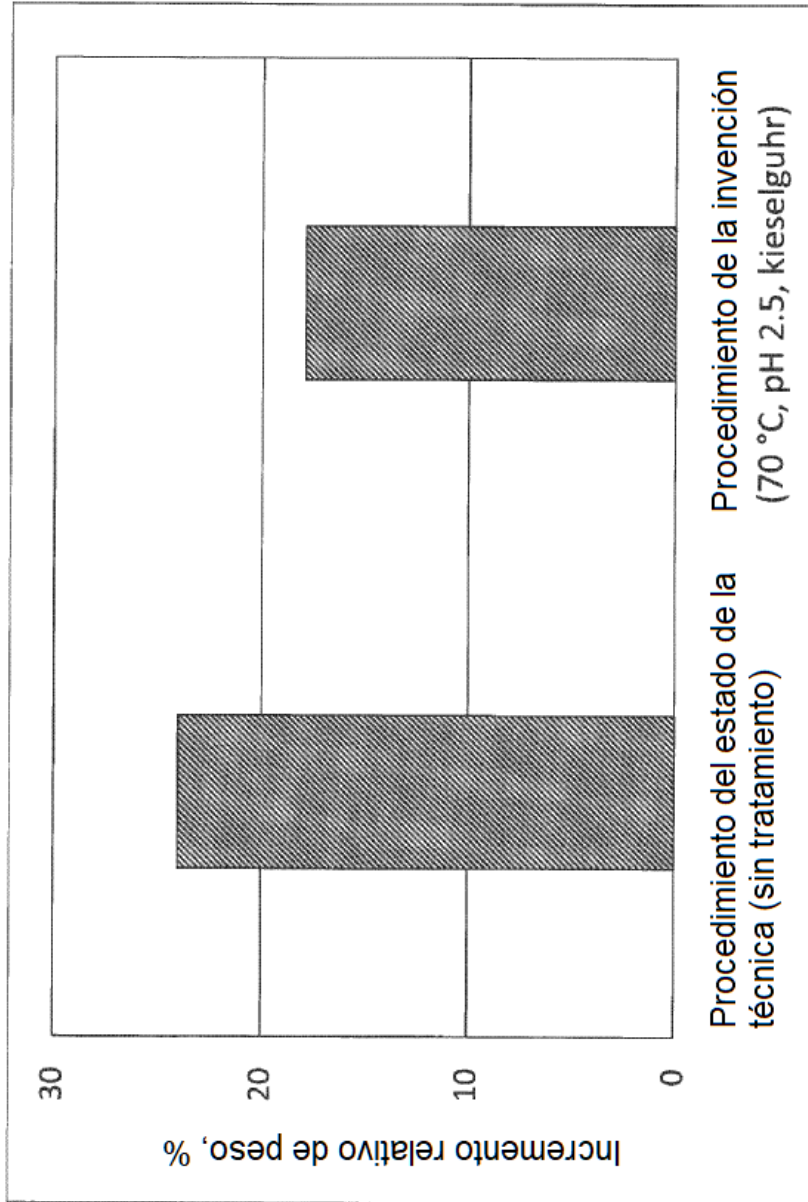


Fig. 7

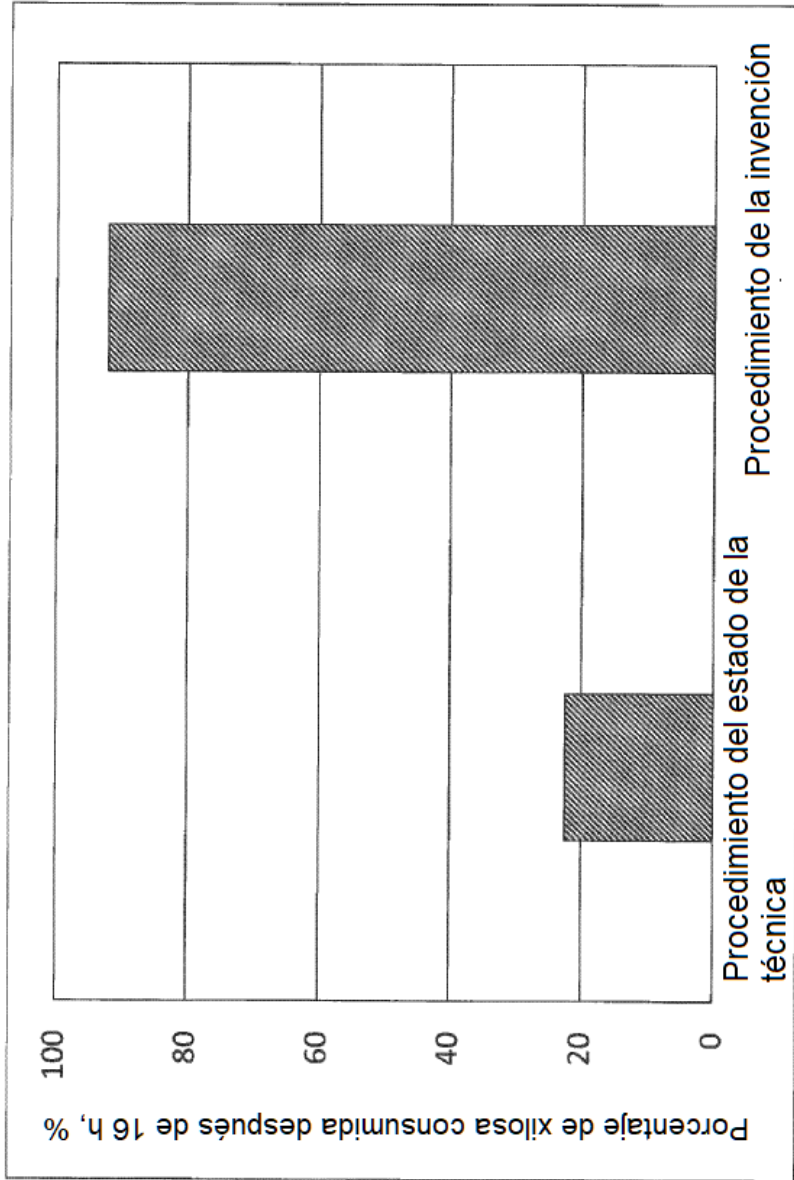


Fig. 8

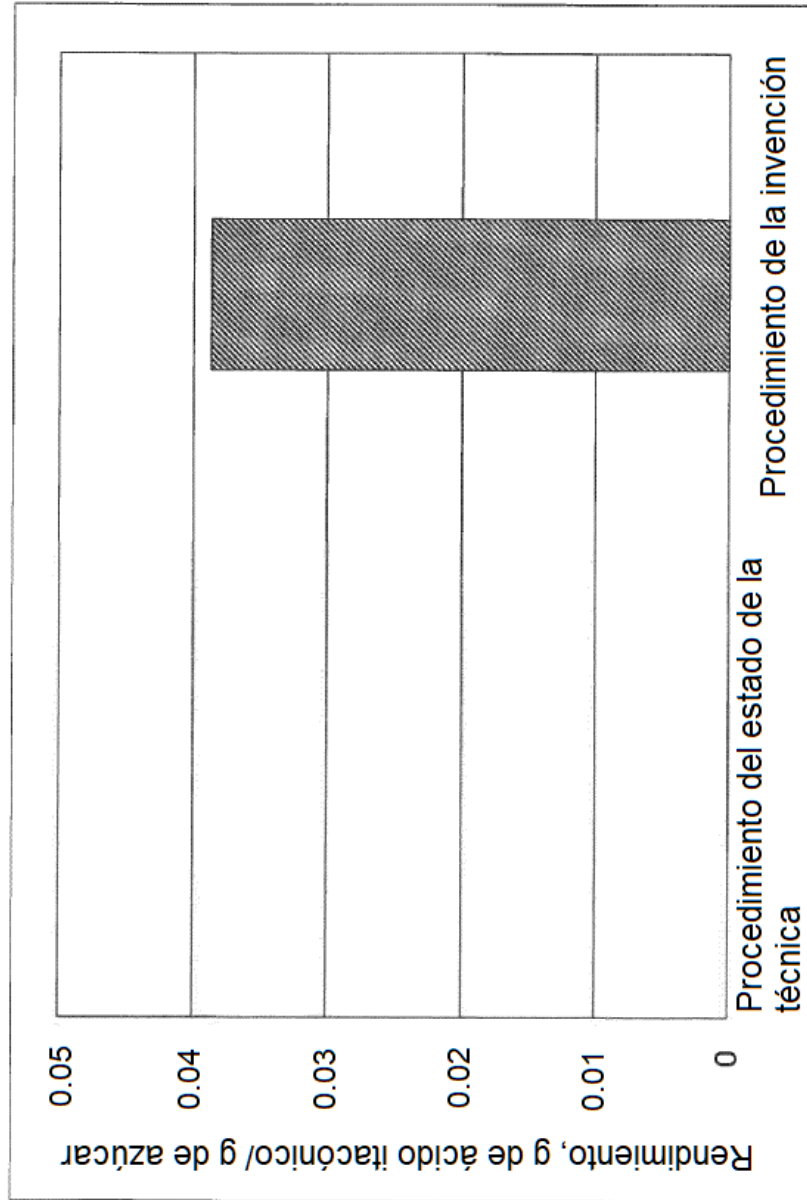


Fig. 9

