

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 906 153**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/02** (2006.01)

**C12P 19/14** (2006.01)

**C13K 1/02** (2006.01)

**C12P 7/10** (2006.01)

**C13K 13/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2015 PCT/EP2015/074091**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2016 WO16062646**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2015 E 15781357 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.12.2021 EP 3209787**

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

30 Prioridad:

**21.10.2014 EP 14189619**

**15.06.2015 EP 15172060**

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

**13.04.2022**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)**

**Het Overloon 1**

**6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**SMITS, JOHANNES PETRUS y  
GIERVELD, ELISABETH MARIA**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 906 153 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

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

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un proceso para la hidrólisis enzimática de material lignocelulósico y fermentación de azúcares.

Antecedentes de la invención

10 El material lignocelulósico está compuesto principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina y proporciona una atractiva plataforma para generar fuentes de energía alternativas a los combustibles fósiles. El material está disponible en grandes cantidades y se puede convertir en productos valiosos, por ejemplo, azúcares o biocombustible, tales como el bioetanol.

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

15 Durante la hidrólisis, que puede comprender las etapas de licuefacción, presacarificación y/o sacarificación, la celulosa presente en el material lignocelulósico se convierte parcialmente (normalmente del 30 al 95 %, dependiendo de la actividad enzimática y las condiciones de hidrólisis) en azúcares reductores por enzimas celulolíticas. La hidrólisis tiene lugar normalmente durante un proceso que dura de 6 a 168 horas (véase Kumar, S., Chem. Eng. Technol. 32 (2009), 517-526) a temperaturas elevadas de 45 a 50 °C y condiciones no estériles.

20 Comúnmente, los azúcares se convierten entonces en productos de fermentación valiosos, tales como el etanol, por microorganismos como la levadura. La fermentación tiene lugar en una etapa de proceso separada, preferentemente anaerobia, ya sea en el mismo recipiente o en un recipiente diferente. La temperatura durante la fermentación se ajusta a 30 a 33 °C para acomodar el crecimiento y la producción de etanol por microorganismos, comúnmente levaduras. Durante el proceso de fermentación, el material celulósico restante se convierte en azúcares reductores por las enzimas ya presentes de la etapa de hidrólisis, mientras que se producen biomasa microbiana y etanol. La fermentación termina una vez el material celulósico se convierte en azúcares fermentables y todos los azúcares fermentables se convierten en etanol, dióxido de carbono y biomasa microbiana. Esto puede durar hasta 6 días. En general, el tiempo de proceso global de la hidrólisis y fermentación puede ascender a hasta 13 días.

30 En general, el coste de la producción de enzimas es un coste importante en el proceso general de producción de productos de fermentación a partir de material lignocelulósico (véase Kumar, S., Chem. Eng. Technol. 32 (2009), 517-526). Hasta la fecha, la reducción de los costes de producción de enzimas se logra aplicando productos enzimáticos de una o de múltiples fuentes microbianas (véase el documento de patente WO 2008/008793) con actividad hidrolítica más amplia y/o mayor (específica). Esto conduce a una menor necesidad de enzimas, velocidades de conversión más rápidas y/o a un mayor rendimiento de conversión y, por lo tanto, a menores costes de producción globales.

35 A continuación de la optimización de enzimas, la optimización del diseño de proceso es una herramienta crucial para reducir los costes globales de la producción de productos de fermentación.

El documento de patente WO 2011/157427 describe un proceso para la hidrólisis continua de biomasa celulósica que comprende el uso de al menos dos reactores en serie para realizar la primera licuefacción y luego la hidrólisis continua en al menos un reactor adicional.

40 El documento de patente US 2009/098616 describe un proceso de hidrólisis enzimática de dos etapas para tratar materiales lignocelulósicos y producir una corriente de proceso rica en azúcares, que comprende: (a) un primer proceso de hidrólisis usando una primera preparación enzimática que contiene una hemicelulasa y obtener una corriente baja viscosidad; (b) someter la corriente de baja viscosidad a un segundo proceso de hidrólisis usando una segunda preparación de enzimas que incluye principalmente una actividad de celulasa.

45 El documento de patente WO 2014/072392 describe un proceso para la hidrólisis enzimática de material lignocelulósico y la fermentación de azúcares en donde se añade oxígeno durante la parte de la hidrólisis.

Por motivos económicos, por lo tanto, es conveniente incluir configuraciones de proceso nuevas e innovadoras que pretenden reducir los costes de producción global en el proceso que implica la hidrólisis y la fermentación de material lignocelulósico.

Sumario de la invención

50 Es un objeto de la invención proporcionar un proceso mejorado para la preparación de un producto de azúcar y/o un producto de fermentación a partir de material lignocelulósico. Otro objeto es proporcionar un proceso que implica la hidrólisis, en donde las condiciones de proceso de la hidrólisis se optimizan. La optimización radica en cualquiera de las siguientes características.

El proceso de hidrólisis realizado en la presente invención comprende al menos dos etapas, una etapa de alimentación y una etapa de sacarificación. Dichas etapas se realizan en diferentes recipientes. La etapa de alimentación empieza añadiendo material lignocelulósico a un recipiente en donde está presente una composición de enzima. Por lo tanto, las enzimas usadas en el proceso de hidrólisis están presentes al comienzo de la etapa de alimentación. Durante la etapa de alimentación, el material lignocelulósico es licuado por las enzimas y se liberan los azúcares. La tasa de adición de material lignocelulósico al recipiente se determina por la viscosidad del material presente en el recipiente. Por lo tanto, se puede controlar la viscosidad del material en el recipiente. Preferentemente, el material lignocelulósico en el recipiente se mantiene líquido durante la etapa de alimentación y así es fácilmente miscible. Esto reduce los costes de energía, disminuye la intensidad de mezcla y, por lo tanto, conduce a un proceso de producción global más eficiente.

Además, este proceso de hidrólisis tiene la ventaja de que el pH se puede ajustar en línea en el recipiente en donde tienen lugar la etapa de alimentación y/o la etapa de sacarificación y que no existe la necesidad de ajustar el pH del material lignocelulósico antes de la adición al recipiente.

Durante la etapa de sacarificación, la viscosidad del material lignocelulósico no cambia sustancialmente en comparación con la viscosidad del material presente en el recipiente durante la etapa de alimentación.

Durante la etapa de alimentación y/o la etapa de sacarificación se suministra oxígeno a los recipientes, por ejemplo al espacio de cabeza de los recipientes. Mediante la adición de oxígeno es posible obtener muchas ventajas de proceso, que incluyen condiciones de temperatura óptimas, tiempo de proceso reducido, dosis de enzima reducida, reutilización de enzimas, mayores rendimientos y otras optimizaciones de proceso, que dan como resultado costes reducidos.

Como se puede controlar la tasa de adición de material lignocelulósico, el suministro de material lignocelulósico puede ser equilibrado con la necesidad de oxígeno por tipo de material lignocelulósico.

Además, al permitir que el material lignocelulósico atraviese el espacio de cabeza rico en oxígeno de un recipiente, se puede suministrar directamente oxígeno al material lignocelulósico. Por lo tanto, puede que no haya necesidad de aireación adicional por medio de, por ejemplo, burbujas o a través de agitación rigurosa. Esto previene la espumación y reduce el consumo de energía requerido para la agitación y/o la creación de un flujo de gas a través del material en el recipiente.

Además, usando diferentes enzimas durante la etapa de alimentación y la etapa de sacarificación, se puede optimizar aún más el proceso de hidrólisis. Por ejemplo, se puede usar una composición de enzima que comprende al menos dos celulasas, tales como endoglucanasas y/o monooxigenasas líficas de polisacáridos durante la etapa de alimentación, mientras que se puede usar una composición de enzima que comprende al menos dos celulasas, tales como celobiohidrolasas y beta-glucosidasas durante la fase de sacarificación.

Durante la etapa de alimentación, el calor es transferido fácilmente en el material presente en el recipiente, ya que la baja viscosidad permite la mezcla homogénea y, por lo tanto, dividir por igual el calor y la temperatura. Esto hace posible optimizar y minimizar la entrada de corriente para calentar y evitar la acumulación de temperatura local que podría inactivar la actividad enzimática.

Debido al bajo nivel controlado de baja viscosidad durante la etapa de alimentación y la etapa de sacarificación, se puede controlar el nivel de oxígeno disuelto sin una amplia agitación o mezcla. Esto hace posible optimizar y minimizar la entrada de corriente para el suministro de oxígeno y evita diferencias locales en la concentración de oxígeno disuelto que podrían dar como resultado la variación local de la actividad enzimática. Debido al control de oxígeno disuelto, se puede limitar la inactivación enzimática debido a la oxidación.

Usando los procesos de la presente invención, es posible obtener muchas ventajas de proceso, que incluyen condiciones óptimas de temperatura, tiempo de proceso reducido, dosis reducida de enzima, reutilización de enzimas y otras optimizaciones de proceso, que dan como resultado costes reducidos. Ventajosamente, la invención proporciona procesos en los que la etapa de hidrólisis se realiza en condiciones mejoradas. La invención también proporciona un proceso que implica la hidrólisis que tienen un tiempo de proceso reducido. La invención proporciona además un proceso que es simple y robusto.

#### Descripción detallada de la invención

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

La presente invención se refiere a 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) adición por lotes alimentados del

material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado a un primer recipiente que comprende una composición de enzima que comprende al menos dos celulasas; (d) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado en el primer recipiente usando la composición de enzima que comprende al menos dos celulasas para licuar el material lignocelulósico; (e) adición del material lignocelulósico licuado a un segundo recipiente; (f) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico licuado en el segundo recipiente usando una composición de enzima que comprende al menos dos celulasas para obtener un producto de azúcar; y (g) opcionalmente, recuperación del producto de azúcar, en donde se añade oxígeno al primer recipiente y/o segundo recipiente y en donde la etapa de alimentación empieza añadiendo material lignocelulósico a un recipiente en donde una composición de enzima está presente y en donde las enzimas usadas en el proceso de hidrólisis están presentes al comienzo de la etapa de alimentación.

La presente invención también se refiere a 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; (c) adición por lotes alimentados del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado a un primer recipiente que comprende una composición de enzima que comprende al menos dos celulasas; (d) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado en el primer recipiente usando la composición de enzima que comprende al menos dos celulasas para licuar el material lignocelulósico; (e) adición del material lignocelulósico licuado a un segundo recipiente; (f) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico licuado en el segundo recipiente usando una composición de enzima que comprende al menos dos celulasas para obtener un material lignocelulósico hidrolizado; (g) opcionalmente, recuperación del material lignocelulósico hidrolizado; (h) fermentación del material lignocelulósico hidrolizado para producir un producto de fermentación; y (i) opcionalmente, recuperación del producto de fermentación, en donde se añade oxígeno al primer recipiente y/o segundo recipiente y en donde la etapa de alimentación empieza añadiendo material lignocelulósico a un recipiente en donde una composición de enzima está presente y en donde las enzimas usadas en el proceso de hidrólisis están presentes al comienzo de la etapa de alimentación.

La etapa (c) de los procesos según la presente invención también se puede denominar etapa de alimentación, mientras que la etapa (f) de los procesos según la presente invención también se puede denominar etapa de sacarificación. En la etapa de alimentación, el material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado se añade en un modo de lotes alimentados al recipiente que comprende la composición de enzima.

El término "primer recipiente", como se usa en el presente documento, puede significar un único recipiente, pero también puede significar un grupo de recipientes. El término "segundo recipiente", como se usa en el presente documento, puede significar un único recipiente, pero también puede significar un grupo de recipientes.

En la etapa (c) de los procesos según la presente invención, el material lignocelulósico que es opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado se añade a un primer recipiente en donde ya está presente una composición de enzima que comprende al menos dos celulasas. La composición de enzima presente en el primer recipiente puede ser una composición acuosa. En una realización, la composición de enzima presente en el primer recipiente comprende una cantidad de material lignocelulósico antes de que el material lignocelulósico que es opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado se añada a un primer recipiente. En una realización, el contenido de materia seca de la composición de enzima que ya comprende algo de material lignocelulósico es desde 0,01 - 5 % en peso. El material lignocelulósico que ya puede estar presente en la composición de enzima se puede lavar opcionalmente y/o pretratar opcionalmente. El material lignocelulósico que ya puede estar presente en la composición de enzima puede ser opcionalmente licuado. La presencia de cierto material lignocelulósico en la composición de enzima antes de que el material lignocelulósico se añada al primer recipiente puede conducir a un aumento de la estabilidad de las enzimas presentes en el primer recipiente. En una realización preferida en la etapa (c) de los procesos según la presente invención, el material lignocelulósico que es opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado se añade en un modo de lotes alimentados a un primer recipiente en donde ya está presente una composición de enzima que comprende al menos dos celulasas. En una realización, el material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado se añade durante la etapa (d) de los procesos según la presente invención. Esto significa que el material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado se añade en porciones al recipiente en donde ya está presente una composición de enzima que comprende al menos dos celulasas. Es decir, en la etapa (c) de los procesos según la presente invención, el material lignocelulósico que es opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado se añade en un modo de lotes alimentados a un primer recipiente en donde ya está presente una composición de enzima que comprende al menos dos celulasas.

En una realización adicional, las enzimas se añaden durante la etapa (d) y/o etapa (f) de los procesos según la presente invención.

En una realización, la viscosidad del material lignocelulósico en el primer recipiente durante la etapa (d) de los procesos según la presente invención se controla ajustando la tasa de adición del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado. La viscosidad del material lignocelulósico en el primer recipiente durante la etapa (d) de los procesos según la presente invención se mantiene por debajo de 1 Pa·s (1000 cP). En una realización, la viscosidad del material lignocelulósico en el primer recipiente durante la etapa (d) de los procesos según la presente invención se mantiene entre 10 y 1000 cP, entre 10 y 900 cP, entre 10 y 800 cP, entre 10 y 700 cP, entre 10 y 600 cP,

entre 10 y 500 cP, entre 10 y 400 cP, entre 10 y 300 cP, entre 10 y 200 cP y preferentemente entre 10 y 100 cP. La viscosidad se puede determinar con un reómetro Brookfield DV III a la temperatura usada para la hidrólisis.

En una realización, una composición acuosa, opcionalmente una composición acuosa de enzima que comprende al menos dos celulasas, se añade al primer recipiente.

- 5 En una realización se añade oxígeno al primer recipiente y/o segundo recipiente. En una realización se añade oxígeno al primer recipiente y/o segundo recipiente durante una única parte o múltiples partes del tiempo de proceso.

10 El oxígeno se puede añadir de varias formas. Por ejemplo, se puede añadir oxígeno como gas oxígeno, gas enriquecido en oxígeno, tal como aire enriquecido en oxígeno, o aire. El oxígeno también se puede añadir por medio de generación *in situ* de oxígeno. Por ejemplo, el oxígeno se puede generar por electrólisis, el oxígeno se puede producir enzimáticamente, por ejemplo mediante la adición de peróxido, o el oxígeno se puede producir químicamente, por ejemplo por un sistema de generación de oxígeno, tal como  $\text{KHSO}_5$ . Por ejemplo, el oxígeno es producido a partir de peróxido por catalasa. El peróxido se puede añadir en forma de peróxido disuelto o generar por una reacción enzimática o química. En caso de que se use catalasa como enzima para producir oxígeno, se puede usar la catalasa presente en la composición de enzima para la hidrólisis o se puede añadir catalasa para este fin.

15 El oxígeno se puede añadir continuamente o discontinuamente. Los ejemplos de cómo añadir oxígeno incluyen, pero no se limitan a, adición de oxígeno en la fase líquida que comprende el material lignocelulósico en el recipiente (por ejemplo como burbujas) y adición de oxígeno al espacio de cabeza del recipiente. Cuando el oxígeno se añade al espacio de cabeza del recipiente y el material lignocelulósico se pasa a través del espacio de cabeza rico en oxígeno, se necesita oxígeno suficiente para que la reacción de hidrólisis se pueda suministrar. En general, se puede controlar y/o variar la cantidad de oxígeno añadida al primer y/o segundo recipiente. La restricción del oxígeno suministrado es posible añadiendo solo oxígeno durante parte del tiempo de hidrólisis en dicho recipiente. Otra opción es añadir oxígeno a una baja concentración, por ejemplo, usando una mezcla de aire y aire recirculado (aire que abandona el recipiente) o "diluyendo" el aire con un gas inerte. El aumento de la cantidad de oxígeno añadida se puede lograr mediante la adición de oxígeno durante periodos del tiempo de hidrólisis más largos, añadiendo el oxígeno a una mayor concentración o añadiendo más aire. Otra opción para cambiar la captación de oxígeno es variar la temperatura de la hidrólisis. Una mayor temperatura de hidrólisis provocará una menor concentración máxima de saturación del oxígeno en el contenido del recipiente. Otra forma de controlar la concentración de oxígeno es añadir un consumidor de oxígeno y/o un generador de oxígeno. La adición del oxígeno al material celulolítico se puede hacer antes y/o durante la hidrólisis enzimática. El oxígeno se puede introducir, por ejemplo soplando, en el contenido del recipiente de hidrólisis líquida de material lignocelulósico. También se puede soplar en el espacio de cabeza del recipiente.

20 En una realización se añade oxígeno al primer y/o segundo recipiente antes y/o durante la adición del material lignocelulósico a dicho recipiente. El oxígeno se puede introducir junto con el material lignocelulósico que entra en el recipiente de hidrólisis. En una realización se añade oxígeno al material lignocelulósico antes y/o durante la adición del material lignocelulósico al primer recipiente. El oxígeno se puede introducir en la corriente de material que entrará en el recipiente o con parte del contenido del recipiente que pasa a un bucle externo del recipiente.

25 Se puede añadir oxígeno antes de la hidrólisis, durante una parte de la hidrólisis, durante la hidrólisis completa, o cualquier combinación de los mismos. En caso de que el oxígeno presente en el contenido del recipiente de hidrólisis o el producto de azúcar o el hidrolizado formado en la etapa de hidrólisis puedan influir o perturbar la etapa de fermentación posterior, se puede añadir oxígeno, excepto durante la última parte de la hidrólisis en la etapa (f). De esta forma, (la mayoría de) el oxígeno puede ser consumido antes de que fermente el material lignocelulósico hidrolizado.

30 En una realización, la concentración de oxígeno (DO) en el material lignocelulósico presente durante la hidrólisis enzimática en la etapa (f) de los procesos de la presente invención es al menos  $0,001 \text{ mol/m}^3$ , preferentemente al menos  $0,002 \text{ mol/m}^3$ , más preferentemente al menos  $0,003 \text{ mol/m}^3$ , incluso más preferentemente al menos  $0,01 \text{ mol/m}^3$ , lo más preferentemente al menos  $0,02 \text{ mol/m}^3$  y en particular al menos  $0,03 \text{ mol/m}^3$ . En reactores de menos de  $1 \text{ m}^3$ , se obtendrá una concentración de oxígeno en el material lignocelulósico inferior a  $0,01 \text{ mol/m}^3$  o  $0,02 \text{ mol/m}^3$  por agitación lenta. La mezcla o agitación vigorosa a dicha escala introduce parte de la fase gaseosa del espacio de cabeza en el líquido de reacción. Por ejemplo, la mezcla o agitación puede crear un remolino que extrae oxígeno en el líquido. En general, el lavado del espacio de cabeza con aire en combinación con mezcla o agitación (vigorosa) introducirá oxígeno suficiente en el material celulósico en el recipiente de hidrólisis para recipientes de hasta un tamaño de 100 litros a  $1 \text{ m}^3$ . A mayor escala, por ejemplo en un reactor de  $50 \text{ m}^3$  o más, por ejemplo  $100 \text{ m}^3$ , se necesita demasiada energía para la agitación vigorosa que desde un punto de vista económico esto no se aplicará en un proceso de explotación comercial.

35 En una realización, la concentración de oxígeno (DO) en el material lignocelulósico presente durante la hidrólisis enzimática en la etapa (d) y/o la etapa (f) de los procesos de la presente invención es preferentemente como máximo del 80 % de la concentración de saturación del oxígeno en las condiciones de la reacción de hidrólisis, más preferentemente como máximo  $0,12 \text{ mol/m}^3$ , todavía más preferentemente como máximo  $0,09 \text{ mol/m}^3$ , incluso más preferentemente como máximo  $0,06 \text{ mol/m}^3$ , lo más preferentemente como máximo  $0,045 \text{ mol/m}^3$  y en particular como máximo  $0,03 \text{ mol/m}^3$ . La temperatura y la presión influirán en la DO.

Los valores de mol/m<sup>3</sup> preferidos y a modo de ejemplo dados anteriormente se refieren a presión atmosférica normal y a temperatura de aproximadamente 62 °C. El experto en la técnica apreciará valores de DO favorables basándose en las presentes enseñanzas.

5 En la hidrólisis enzimática, polisacáridos amorfos y cristalinos o celulosa se hidrolizan dando azúcares, tales como la glucosa. Los polisacáridos amorfos se convierten, por ejemplo, en oligosacáridos por endoglucanasas y luego los oligosacáridos se pueden convertir por celobiohidrolasas y beta-glucosidasas en glucosa. La conversión de los polisacáridos cristalinos puede ocurrir en paralelo o secuencialmente e incluso continuar cuando se hidrolizan la mayoría de los polisacáridos amorfos. La adición de oxígeno en combinación con monooxigenasas líticas de polisacáridos es beneficiosa durante la hidrólisis de los polisacáridos cristalinos, por ejemplo, en la degradación de los polisacáridos en oligosacáridos. La estructura cristalina de los glucanos puede ser abierta por monooxigenasas líticas de polisacáridos. Este tipo de enzima abre la estructura oxidando los enlaces glucosídicos y haciéndola accesible para las otras enzimas celulolíticas para la posterior hidrólisis de oligosacáridos en glucosa. La adición de oxígeno es muy útil, especialmente en la fase en donde los polisacáridos cristalinos son convertidos por enzimas. Fuera de esta fase, puede ser más eficiente no añadir oxígeno o añadir menos oxígeno.

15 Los procesos de la presente invención muestran ventajas, especialmente a escala de planta piloto e industrial. En una realización, el primer recipiente y/o segundo recipiente tienen un volumen de al menos 1 m<sup>3</sup>. Preferentemente, el primer recipiente y/o segundo recipiente tienen un volumen de al menos 1 m<sup>3</sup>, al menos 2 m<sup>3</sup>, al menos 3 m<sup>3</sup>, al menos 4 m<sup>3</sup>, al menos 5 m<sup>3</sup>, al menos 6 m<sup>3</sup>, al menos 7 m<sup>3</sup>, al menos 8 m<sup>3</sup>, al menos 9 m<sup>3</sup>, al menos 10 m<sup>3</sup>, al menos 15 m<sup>3</sup>, al menos 20 m<sup>3</sup>, al menos 25 m<sup>3</sup>, al menos 30 m<sup>3</sup>, al menos 35 m<sup>3</sup>, al menos 40 m<sup>3</sup>, al menos 45 m<sup>3</sup>, al menos 50 m<sup>3</sup>, al menos 60 m<sup>3</sup>, al menos 70 m<sup>3</sup>, al menos 75 m<sup>3</sup>, al menos 80 m<sup>3</sup>, al menos 90 m<sup>3</sup>, al menos 100 m<sup>3</sup>, al menos 200 m<sup>3</sup>, al menos 300 m<sup>3</sup>, al menos 400 m<sup>3</sup>, al menos 500 m<sup>3</sup>, al menos 600 m<sup>3</sup>, al menos 700 m<sup>3</sup>, al menos 800 m<sup>3</sup>, al menos 900 m<sup>3</sup>, al menos 1000 m<sup>3</sup>, al menos 1500 m<sup>3</sup>, al menos 2000 m<sup>3</sup>, al menos 2500 m<sup>3</sup>. En general, el recipiente será más pequeño que 3000 m<sup>3</sup> o 5000 m<sup>3</sup>. El primer recipiente y el segundo recipiente pueden tener el mismo volumen, pero también pueden tener un volumen diferente. En el caso de que se usen varios primeros recipientes y/o segundos recipientes, pueden tener el mismo volumen, pero también pueden tener un volumen diferente.

El proceso de la invención se aplica ventajosamente en combinación con el uso de enzimas termoestables. En una realización, la composición de enzima deriva de un hongo, preferentemente un microorganismo del género *Rasamsonia*, o la composición de enzima comprende una enzima fúngica, preferentemente una enzima *Rasamsonia*. Las enzimas celulolíticas de *Rasamsonia* aplicadas sobre materia prima lignocelulósica pretratada muestran velocidades de conversión máximas a temperatura en el intervalo de 50 a 70 °C. Las enzimas siguen siendo activas en estas circunstancias durante 14 días y más sin cese completo de la actividad. Usando condiciones óptimas de temperatura, se puede liberar una cantidad máxima de azúcares reductores del material lignocelulósico (hidrólisis total) en el tiempo de hidrólisis más corto posible. De esta forma, se puede lograr un 100 % de conversión de celulosa en glucosa en menos de 5 días. El rendimiento máximo teórico (Yps máx en g de producto por gramo de glucosa) de un producto de fermentación se puede obtener de la bioquímica de libros de texto. Para el etanol, 1 mol de glucosa (180 g) da según la vía de fermentación de glicólisis normal en levadura 2 moles de etanol (= 2 × 46 = 92 g de etanol). El rendimiento máximo teórico del etanol en glucosa es, por lo tanto, 92/180 = 0,511 g de etanol/g de glucosa. Para butanol (MW 74 g/mol) o isobutanol, el rendimiento máximo teórico es 1 mol de butanol por mol de glucosa. Por lo tanto, Yps máx para (iso-)butanol = 74/180 = 0,411 g de (iso-)butanol/g de glucosa. Para el ácido láctico, el rendimiento de fermentación para la fermentación homoláctica es 2 moles de ácido láctico (MW = 90 g/mol) por mol de glucosa. Según esta estequiometría, Yps máx = 1 g de ácido láctico/g de glucosa. Para otros productos de fermentación se puede hacer un cálculo similar. La reducción de coste lograda con la aplicación de enzimas celulolíticas de *Rasamsonia* es el resultado de una reducción del tiempo de proceso global.

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

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

Durante la etapa de fermentación, en la que se produce etanol, las temperaturas son normalmente entre 30 y 37 °C y preferentemente no se elevan debido a las pérdidas de producción. Aplicando tiempos cortos del proceso de fermentación, se reducen los riesgos y los efectos de la contaminación y/o el crecimiento de contaminantes en la medida de lo posible. Con enzimas estables, como las de *Rasamsonia*, se puede aplicar un tiempo de fermentación corto y así se reducen en la medida de lo posible los riesgos de contaminación y/o crecimiento de contaminantes. La reducción de costes lograda con la aplicación de enzimas celulolíticas termostables de *Rasamsonia* de esta forma produce un menor riesgo de fallos del proceso debido a la contaminación.

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

Al final de la hidrólisis, las actividades enzimáticas parecen ser bajas, puesto que pocos azúcares reductores son liberados una vez se convierte casi toda la celulosa. La cantidad de actividad enzimática presente, sin embargo, ha disminuido solo un poco, supuestamente principalmente debido a la absorción de las enzimas al sustrato. Aplicando separación sólido-líquido después de la hidrólisis, tal como centrifugación, filtración, decantación, sedimentación, el 60 % o más (por ejemplo, el 70 %) de la actividad enzimática en disolución se puede recuperar y reutilizar para la hidrólisis de un nuevo material lignocelulósico pretratado durante la siguiente hidrólisis.

Además, después de la separación sólido-líquido, la enzima en disolución se puede separar de la disolución que contiene azúcares reductores y otros productos de hidrólisis de las acciones enzimáticas. Esta separación se puede hacer por técnicas que incluyen, pero no se limitan a, ultra- y microfiltración, centrifugación, decantación, sedimentación, con o sin primera adsorción de la enzima a un vehículo de cualquier tipo. Por ejemplo, después de la hidrólisis de material pretratado con 0,175 ml/g de carga enzimática de materia seca de material durante 20 h, se libera el 50 % de la cantidad máxima teórica de azúcares reductores y después de la misma hidrólisis durante 72 h, se libera el 90 % de la cantidad máxima teórica de azúcares reductores. Por centrifugación y ultrafiltración, el 60-70 % de la actividad enzimática se recuperó en el concentrado, mientras que el filtrado contuvo más del 80 % de los azúcares reductores liberados. Por reutilización del concentrado, ya sea tal cual o después de más purificación y/o concentración, la dosis de enzimas durante la siguiente etapa de hidrólisis se pueden reducir con 60 al 70 %. La reducción de costes lograda usando enzimas celulolíticas estables, tales como las de *Rasamsonia*, de esta forma es la consecuencia de una menor dosis de enzimas.

El proceso que incluye la recirculación de enzimas después de la hidrólisis, como se ha descrito anteriormente, se puede combinar con la recirculación del microorganismo productor de etanol después de la fermentación y con el uso de los azúcares reductores que contienen filtrado como sustrato (purificado y/o concentrado o diluido) en la fermentación de la producción de enzimas y como sustrato para el cultivo del microorganismo productor de etanol.

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

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

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

Una enzima "termoestable", como se usa en el presente documento, significa que la enzima tiene un óptimo de temperatura de 60 °C o superior, 70 °C o superior, 75 °C o superior, 80 °C o superior, 85 °C o superior. Se pueden

aislar, por ejemplo, de microorganismos termófilos o pueden ser diseñadas por el experto y sintetizar artificialmente. En una realización, los polinucleótidos se pueden aislar u obtener de hongos filamentosos termófilos o termotolerantes, o aislar de hongos no termófilos o no termotolerantes, pero se encuentra que son termoestables.

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

Los ejemplos de cepas fúngicas termófilas son *Rasamsonia emersonii* (antiguamente conocida como *Talaromyces emersonii*). *Talaromyces emersonii*, *Penicillium geosmitia emersonii* y *Rasamsonia emersonii* se usan indistintamente en el presente documento.

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

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

35 *Rasamsonia* es un nuevo género que comprende las especies termotolerantes y termófilas *Talaromyces* y *Geosmithia* (J. Houbraken et al., ver más arriba). Basándose en datos fenotípicos, fisiológicos y moleculares, Houbraken et al. propusieron transferir las especies *Talaromyces emersonii*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Talaromyces eburneus*, *Geosmithia argillacea* y *Geosmithia cylindrospora* a *Rasamsonia* gen. Nov.

Los hongos termófilos preferidos son *Rasamsonia byssochlamydoides*, *Rasamsonia emersonii*, *Thermomyces lenuginosus*, *Talaromyces thermophilus*, *Thermoascus crustaceus*, *Thermoascus thermophilus* y *Thermoascus aurantiacus*, siendo *Rasamsonia emersonii* el más preferido.

45 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, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, GB.). Los hongos filamentosos se caracterizan por una pared micelial compuesta de quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por elongación hifal y el catabolismo del carbono es aerobio estricto. Las cepas fúngicas filamentosas incluyen, pero no se limitan a, 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*.

55 Varias cepas de hongos filamentosos están fácilmente accesibles para el público en varias colecciones de cultivos, 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). Los ejemplos de dichas cepas incluyen *Aspergillus niger* CBS 513.88, *Aspergillus oryzae* ATCC 20423, IFO 4177, ATCC 1011, ATCC 9576, ATCC14488-14491, ATCC 11601, ATCC12892, *P. chrysogenum* CBS 455.95, *Penicillium citrinum* ATCC 38065, *Penicillium chrysogenum* P2, *Talaromyces emersonii* CBS 393.64, *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225 or 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 la composición de enzima que se puede usar en los procesos de la presente invención.

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

15 La composición de enzima se puede preparar por fermentación de un sustrato adecuado con un microorganismo adecuado, por ejemplo *Rasamsonia emersonii* o *Aspergillus niger*, en donde la composición de enzima se produce por el microorganismo. El microorganismo se puede alterar para mejorar o preparar la composición. Por ejemplo, el microorganismo se puede mutar por procedimientos de mejora de cepas clásicas o por técnicas de ADN recombinante. Por lo tanto, los microorganismos mencionados en el presente documento se pueden usar como tales para producir la composición o se pueden alterar para aumentar la producción o para producir una composición alterada que podría incluir enzimas heterólogas, por ejemplo celulasas, por lo tanto enzimas que no son originalmente producidas por ese microorganismo. Preferentemente, se usa un hongo, más preferentemente un hongo filamentoso, para producir la composición. Ventajosamente, se usa un microorganismo termófilo o termotolerante. Opcionalmente, se usa un sustrato que induce la expresión de las enzimas en la composición de enzima durante la producción de la composición de enzima.

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

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

40 La celulosa es un polisacárido lineal compuesto de restos de glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -1,4. La naturaleza lineal de las fibras de celulosa, así como la estequiometría de la glucosa unida por  $\beta$  (con respecto a  $\alpha$ ) genera estructuras más propensas a un enlace de hidrógeno intercatenario que las estructuras de almidón unidas por  $\alpha$  altamente ramificadas. Por lo tanto, los polímeros de celulosa son, en general, menos solubles y forman fibras más fuertemente unidas que las fibras encontradas en el almidón.

Las enzimas que se pueden incluir en la composición estable de enzima usada en la invención se describen más abajo en más detalle.

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

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

55 Las xilanasas junto con otras enzimas accesorias, por ejemplo  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas, feruloil y acetilxilano estererasas, glucuronidasas y  $\beta$ -xilosidasas) catalizan la hidrólisis de hemicelulosas.

- Las sustancias pécticas incluyen pectinas, arabinanos, galactanos y arabinogalactanos. Las pectinas son los polisacáridos más complejos en la pared celular vegetal. Se forman alrededor de una cadena central de unidades de ácido D-galacturónico enlazadas en  $\alpha(1,4)$  intercaladas hasta cierto grado con L-ramnosa. En una pared celular cualquiera, existen varias unidades estructurales que se ajustan a esta descripción y se ha considerado, en general, que en una única molécula péctica, las cadenas del núcleo de diferentes unidades estructurales son continuas entre sí. Los principales tipos de unidad estructural son: galacturonano (homogalacturonano), que se pueden sustituir con metanol en el grupo carboxilo y acetato en O-2 y O-3; ramnogalacturonano I (RGI), en el que las unidades de ácido galacturónico se alternan con unidades de ramnosa que llevan cadenas laterales de galactano unido en (1,4) y de arabinano unido en (1,5). Las cadenas laterales de arabinano se pueden fijar directamente a ramnosa o indirectamente mediante las cadenas de galactano; xilogalacturonano, con unidades de xilosilo individuales en O-3 de ácido galacturónico (estrechamente asociado a RGI); y ramnogalacturonano II (RGII), una unidad secundaria particularmente compleja que contiene azúcares poco usuales, por ejemplo apiosa. Una unidad de RGII puede contener dos restos de apiosilo que, en condiciones iónicas adecuadas, puede formar reversiblemente ésteres con borato.
- Una composición de enzima para su uso en los procesos de la presente invención comprende preferentemente al menos dos actividades, aunque normalmente una composición comprenderá más de dos actividades, por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o incluso más actividades. Normalmente, una composición de enzima para su uso en los procesos de la presente invención comprende al menos dos celulasas. Las al menos dos celulasas pueden contener las mismas actividades o diferentes. La composición de enzima para su uso en los procesos de la presente invención también puede comprender al menos una enzima distinta de una celulasa. Preferentemente, la al menos otra enzima tiene una actividad enzimática auxiliar, es decir, una actividad adicional que, conduce directamente o indirectamente a la degradación de lignocelulosa. Los ejemplos de dichas actividades auxiliares se mencionan en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, hemicelulasas.
- Por lo tanto, una composición para su uso en los procesos de la presente invención puede comprender actividad de monooxigenasa lítica de polisacáridos, actividad de endoglucanasa y/o actividad de celobiohidrolasa y/o actividad de  $\beta$ -glucosidasa. Una composición para su uso en la invención puede comprender más de una actividad enzimática por clase de actividad. Por ejemplo, una composición para su uso en la invención puede comprender dos actividades de endoglucanasa, por ejemplo, actividad de endo-1,3(1,4)- $\beta$  glucanasa y actividad de endo- $\beta$ -1,4-glucanasa.
- Una composición para su uso en los procesos de la presente invención se puede obtener de *Rasamsonia emersonii*. En la invención, se tiene previsto que un conjunto central de actividades enzimáticas (que degradan lignocelulosa) se puedan obtener de *Rasamsonia emersonii*. *Rasamsonia emersonii* puede proporcionar un conjunto altamente eficaz de actividades como se demuestra en el presente documento para la hidrólisis de material lignocelulósico. Si se necesita, el conjunto de actividades puede ser complementado con actividades enzimáticas adicionales de otras fuentes. Dichas actividades adicionales se pueden obtener de fuentes clásicas y/o producir por un organismo genéticamente modificado.
- Las actividades en una composición para su uso en los procesos de la presente invención pueden ser termoestables. En el presente documento, esto significa que la actividad tiene un óptimo de temperatura de 60 °C o más, 70 °C o más, 75 °C o más, 80 °C o más, 85 °C o más. Las actividades en una composición para su uso en los procesos de la presente invención normalmente no tendrán el mismo óptimo de temperatura, pero preferentemente serán, sin embargo, termoestables.
- Además, las actividades enzimáticas en una composición para su uso en los procesos de la presente invención pueden ser capaces de trabajar a pH bajo. Para los fines de la presente invención, pH bajo indica un pH de 5,5 o menos, 5 o menos, 4,9 o menos, 4,8 o menos, 4,7 o menos, 4,6 o menos, 4,5 o menos, 4,4 o menos, 4,3 o menos, 4,2 o menos, 4,1 o menos, 4,0 o menos, 3,9 o menos, o 3,8 o menos, 3,7 o menos, 3,6 o menos, 3,5 o menos.
- Las actividades en una composición para su uso en los procesos de la presente invención se pueden definir por una combinación de cualquiera de los óptimos de temperatura y valores de pH anteriores.
- La composición de enzima para su uso en los procesos de la presente invención puede comprender, además de las actividades obtenidas de *Rasamsonia*, una celulasa (por ejemplo, una obtenida de una fuente distinta de *Rasamsonia*) y/o una hemicelulasa (por ejemplo, una obtenida de una fuente distinta de *Rasamsonia*) y/o una pectinasa.
- Una composición de enzima para su uso en los procesos de la presente invención puede comprender una, dos, tres, cuatro clases o más de celulasa, por ejemplo una, dos tres o cuatro o todas de una monooxigenasa lítica de polisacáridos (LPMO), endoglucanasa (EG), una o dos exo-celobiohidrolasas (CBH) y una  $\beta$ -glucosidasa (BG). Una composición para su uso en los procesos de la presente invención puede comprender dos o más de cualquiera de estas clases de celulasas.
- Una composición de enzima para su uso en los procesos de la presente invención puede comprender un tipo de actividad de celulasa y/o actividad de hemicelulasa y/o actividad de pectinasa proporcionada por una composición como se describe en el presente documento y un segundo tipo de actividad de celulasa y/o actividad de hemicelulasa y/o actividad de pectinasa proporcionada por una celulosa/hemicelulasa/pectinasa adicional.

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

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

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

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

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

Por consiguiente, una composición de enzima para su uso en los procesos de la presente invención puede comprender cualquier celulasa, por ejemplo, una monooxigenasa lítica de polisacáridos (por ejemplo, GH61), una celobiohidrolasa, una endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, una  $\beta$ -glucosidasa o una  $\beta$ -(1,3)(1,4)-glucanasa.

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

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

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

Como se usa en el presente documento, una  $\beta$ -(1,3)(1,4)-glucanasa (EC 3.2.1.73) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de enlaces 1,4- $\beta$ -D-glucosídicos en  $\beta$ -D-glucanos que contienen enlaces 1,3 y 1,4. Dicho polipéptido puede actuar sobre liquenina y  $\beta$ -D-glucanos de cereal, pero no sobre  $\beta$ -D-glucanos que solo

- 5 contienen enlaces 1,3 o 1,4. Esta enzima también se puede denominar liqueninasa, 1,3-1,4-β-D-glucano 4-glucanohidrolasa, β-glucanasa, endo-β-1,3-1,4 glucanasa, liquenasa o β-glucanasa de 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-glucanasa cuando el resto de glucosa cuyo grupo reductor participa en el enlace a hidrolizar se sustituye él mismo en C-3. Los nombres alternativos incluyen endo-1,3-beta-glucanasa, laminarinasa, 1,3-(1,3;1,4)-beta-D-glucano 3 (4) glucanohidrolasa. Los sustratos incluyen laminarina, liquenina y beta-D-glucanos de cereal.
- 10 Una composición para su uso en los procesos de la presente invención puede comprender cualquier hemicelulasa, por ejemplo, una endoxilanasas, una β-xilosidasa, una α-L-arabionofuranosidasa, una α-D-glucuronidasa, una acetil xilano esterasa, una feruloil esterasa, una cumaroil esterasa, una α-galactosidasa, una β-galactosidasa, una β-mananasa o una β-manosidasa.
- 15 Como se usa en el presente documento, una endoxilanasas (EC 3.2.1.8) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,4-β-D-xilosídicos en xilanos. Esta enzima también se puede denominar endo-1,4-β-xilanasas o 1,4-β-D-xilano xilano hidrolasa. Una alternativa es EC 3.2.1.136, una glucuronoarabinoxilano endoxilanasas, una enzima que es capaz de hidrolizar enlaces 1,4-xilosídicos en glucuronoarabinoxilanos.
- 20 Como se usa en el presente documento, una β-xilosidasa (EC 3.2.1.37) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de 1,4-β-D-xilanos, para retirar los restos de D-xilosa sucesivos de los extremos no reductores. Dichas enzimas también pueden hidrolizar xilobiosa. Esta enzima también se puede denominar xilano 1,4-β-xilosidasa, 1,4-β-D-xilano xilohidrolasa, exo-1,4-3-xilosidasa o xilobiasa.
- 25 Como se usa en el presente documento, una α-L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) es cualquier polipéptido que es capaz de actuar sobre α-L-arabinofuranósidos, α-L-arabinanos que contienen enlaces (1,2) y/o (1,3) y/o (1,5), arabinoxilanos y arabinogalactanos. Esta enzima también se puede denominar α-N-arabinofuranosidasa, arabinofuranosidasa o arabinosidasa.
- 30 Como se usa en el presente documento, una α-D-glucuronidasa (EC 3.2.1.139) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar una reacción de la siguiente forma: alfa-D-glucuronósido + H(2)O = un alcohol + D-glucuronato. Esta enzima también se puede denominar alfa-glucuronidasa o alfa-glucosiduronasa. Estas enzimas también pueden hidrolizar ácido glucurónico 4-O-metilado, que también puede estar presente como un sustituyente en xilanos. Una alternativa es EC 3.2.1.131: xilano alfa-1,2-glucuronosidasa, que cataliza la hidrólisis de enlaces alfa-1,2-(4-O-metil)glucuronosilo.
- 35 Como se usa en el presente documento, una acetil xilano esterasa (EC 3.1.1.72) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la desacetilación de xilanos y xilo-oligosacáridos. Dicho polipéptido puede catalizar la hidrólisis de grupos acetilo de xilano polimérico, xilosa acetilada, glucosa acetilada, acetato de alfa-naftilo o acetato de p-nitrofenilo, pero, normalmente, no de triacilglicerol. Dicho polipéptido no actúa normalmente sobre manano acetilado o pectina.
- 40 Como se usa en el presente documento, una feruloil esterasa (EC 3.1.1.73) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar una reacción de la forma: feruloil-sacárido + H(2)O = ferulato + sacárido. El sacárido puede ser, por ejemplo, un oligosacárido o un polisacárido. Normalmente puede catalizar la hidrólisis del grupo 4-hidroxi-3-metoxicinamoilo (feruloilo) de un azúcar esterificado, que es normalmente arabinosa en sustratos 'naturales'. El acetato de p-nitrofenol y el ferulato de metilo son normalmente sustratos más pobres. Esta enzima también se puede denominar cinamoil éster hidrolasa, ácido ferúlico esterasa o hidroxicinamoil esterasa. También se puede denominar una enzima accesoria de hemicelulasa, puesto que puede ayudar a xilanasas y pectinasas a degradar hemicelulosa y pectina de la pared celular vegetal.
- 45 Como se usa en el presente documento, una cumaroil esterasa (EC 3.1.1.73) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar una reacción de la forma: cumaroil-sacárido + H(2)O = cumarato + sacárido. El sacárido puede ser, por ejemplo, un oligosacárido o un polisacárido. Esta enzima también se puede denominar trans-4-cumaroil esterasa, trans-p-cumaroil esterasa, p-cumaroil esterasa o ácido p-cumárico esterasa. Esta enzima también se encuentra dentro de EC 3.1.1.73, por lo que también se puede denominar una feruloil esterasa.
- 50 Como se usa en el presente documento, una α-galactosidasa (EC 3.2.1.22) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de restos de α-D-galactosa no reductores terminales en α-D-galactósidos, que incluyen oligosacáridos de galactosa, galactomananos, galactanos y arabinogalactanos. Dicho polipéptido también puede ser capaz de hidrolizar α-D-fucósidos. Esta enzima también se puede denominar melibiasa.
- 55 Como se usa en el presente documento, una β-galactosidasa (EC 3.2.1.23) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de restos de β-D-galactosa no reductores terminales en β-D-galactósidos. Dicho polipéptido también puede ser capaz de hidrolizar α-L-arabinósidos. Esta enzima también se puede denominar exo-(1->4)-β-D-galactanasa o lactasa.
- Como se usa en el presente documento, una β-mananasa (EC 3.2.1.78) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis al azar de enlaces 1,4-β-D-manosídicos en mananos, galactomananos y glucomananos. Esta enzima también se puede denominar manano endo-1,4-β-manosidasa o endo-1,4-mananasa.

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

5 Una composición para su uso en los procesos de la presente invención puede comprender cualquier pectinasa, por ejemplo una endo-poligalacturonasa, una pectina metil esterasa, una endo-galactanasa, una beta-galactosidasa, una pectina acetil esterasa, una endo-pectina liasa, pectato liasa, alfa-ramnosidasa, una exo-galacturonasa, una exo-poligalacturonato liasa, una ramnogalacturonano hidrolasa, una ramnogalacturonano liasa, una ramnogalacturonano acetil esterasa, una ramnogalacturonano galacturonohidrolasa, una xilogalacturonasa.

10 Como se usa en el presente documento, una endo-poligalacturonasa (EC 3.2.1.15) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis al azar de enlaces 1,4- $\alpha$ -D-galactosidurónicos en pectato y otros galacturonanos. Esta enzima también se puede denominar poligalacturonasa pectina depolimerasa, pectinasa, endopoligalacturonasa, pectolasa, pectina hidrolasa, pectina poligalacturonasa, poli- $\alpha$ -1,4-galacturónido glucanohidrolasa, endogalacturonasa; endo-D-galacturonasa o poli(1,4- $\alpha$ -D-galacturónido) glucanohidrolasa.

15 Como se usa en el presente documento, una pectin metil esterasa (EC 3.1.1.11) es cualquier enzima que es capaz de catalizar la reacción: pectina + n H<sub>2</sub>O = n metanol + pectato. La enzima también se puede conocer como pectinesterasa, pectina demetoxilasa, pectina metoxilasa, pectina metilesterasa, pectasa, pectinoesterasa o pectina pectilhidrolasa.

20 Como se usa en el presente documento, una endo-galactanasa (EC 3.2.1.89) es cualquier enzima capaz de catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,4- $\beta$ -D-galactosídicos en arabinogalactanos. La enzima también se puede conocer como arabinogalactano endo-1,4- $\beta$ -galactosidasa, endo-1,4- $\beta$ -galactanasa, galactanasa, arabinogalactanasa o arabinogalactano 4- $\beta$ -D-galactanohidrolasa.

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

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

30 Como se usa en el presente documento, una pectato liasa (EC 4.2.2.2) es cualquier enzima capaz de catalizar la escisión eliminativa de (1  $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-galacturonano para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi- $\alpha$ -D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. La enzima también se puede conocer como transeliminasa poligalacturónica, ácido péptico transeliminasa, poligalacturonato liasa, endopectina metiltranseliminasa, pectato transeliminasa, endogalacturonato transeliminasa, ácido péptico liasa, liasa péptica, ácido  $\alpha$ -1,4-D-endopoligalacturónico liasa, PGA liasa, PPasa-N, ácido endo- $\alpha$ -1,4-poligalacturónico liasa, ácido poligalacturónico liasa, pectina trans-eliminasa, ácido poligalacturónico trans-eliminasa o (1  $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-galacturonano liasa.

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

Como se usa en el presente documento, la exo-galacturonasa (EC 3.2.1.82) es cualquier polipéptido capaz de hidrolizar el ácido péptico a partir del extremo no reductor, liberando digalacturonato. La enzima también se puede conocer como exo-poli- $\alpha$ -galacturonosidasa, exopoligalacturonosidasa o exopoligalacturanosidasa.

45 Como se usa en el presente documento, la exo-galacturonasa (EC 3.2.1.67) es cualquier polipéptido capaz de catalizar: (1,4- $\alpha$ -D-galacturónido)<sub>n</sub> + H<sub>2</sub>O = (1,4- $\alpha$ -D-galacturónido)<sub>n-1</sub> + D-galacturonato. La enzima también se puede conocer como galacturano 1,4- $\alpha$ -galacturonidasa, exopoligalacturonasa, poli(galacturonato) hidrolasa, exo-D-galacturonasa, exo-D-galacturonanasa, exopoli-D-galacturonasa o poli(1,4- $\alpha$ -D-galacturónido) galacturonohidrolasa.

50 Como se usa en el presente documento, la exopoligalacturonato liasa (EC 4.2.2.9) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la escisión eliminativa de 4-(4-desoxi- $\alpha$ -D-galact-4-enuronosil)-D-galacturonato a partir del extremo reductor de pectato, es decir, pectina desesterificada. Esta enzima se puede conocer como pectato disacárido-liasa, pectato exo-liasa, ácido exopéptico transeliminasa, exopectato liasa, ácido exopoligalacturónico-*trans*-eliminasa, PATE, exo-PATE, exo-PGL o disacárido-liasa del extremo reductor de (1  $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-galacturonano.

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

Como se usa en el presente documento, la ramnogalacturonano liasa es cualquier polipéptido que es cualquier polipéptido que es capaz de escindir enlaces  $\alpha$ -L-Rhap-(1  $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GalpA en un modo endo en ramnogalacturonano por eliminación beta.

5 Como se usa en el presente documento, la ramnogalacturonano acetil esterasa es cualquier polipéptido que cataliza la desacetilación del esqueleto de restos alternos de ramnosa y ácido galacturónico en ramnogalacturonano.

Como se usa en el presente documento, la ramnogalacturonano galacturonohidrolasa es cualquier polipéptido que es capaz de hidrolizar ácido galacturónico del extremo no reductor de estructuras de ramnogalacturona estrictamente alternas en un modo exo.

10 Como se usa en el presente documento, la xilogalacturonasa es cualquier polipéptido que actúa sobre el xilogalacturonano escindiendo el esqueleto de ácido galacturónico sustituido por  $\beta$ -xilosa en un modo endo. Esta enzima también se puede conocer como xilogalacturonano hidrolasa.

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

Como se usa en el presente documento, la endo-arabinanasa (EC 3.2.1.99) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,5- $\alpha$ -arabinofuranosídicos en 1,5-arabinanos. La enzima también se puede conocer como endo-arabinasa, arabinano endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinosidasa, endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinanasa, endo- $\alpha$ -1,5-arabanasa; endo-arabanasa o 1,5- $\alpha$ -L-arabinano 1,5- $\alpha$ -L-arabinanohidrolasa.

20 Una composición de enzima para su uso en los procesos de la presente invención comprenderá normalmente al menos dos celulasas y opcionalmente al menos una hemicelulasa y opcionalmente al menos una pectinasa. Una composición para uso en los procesos de la presente invención puede comprender una GH61, una celobiohidrolasa, una endoglucanasa y/o una  $\beta$ -glucosidasa. Dicha composición también puede comprender una o más hemicelulasas y/o una o más pectinasas.

25 Además, una o más (por ejemplo dos, tres, cuatro o todas) de una amilasa, una proteasa, una lipasa, una ligninasa, una hexosiltransferasa, una glucuronidasa, una expansina, una proteína inducida por celulosa o una proteína integrante de celulosa o proteína similar puede estar presente en una composición para su uso en los procesos de la presente invención (esto se denomina actividades auxiliares anteriormente).

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

35 "Lipasa" incluye enzimas que hidrolizan lípidos, ácidos grasos y acilglicéridos, que incluyen fosfoglicéridos, lipoproteínas, diacilgliceroles y similares. En las 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.

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

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

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

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

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

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

Una composición para su uso en los procesos de la presente invención puede estar compuesto de un miembro de cada una de las clases de enzimas mencionadas anteriormente, varios miembros de una clase de enzima, o cualquier combinación de estas clases de enzimas o proteínas auxiliares (es decir, las proteínas mencionadas en el presente documento que no tienen actividad enzimática por sí mismas, pero, sin embargo, ayudan en la degradación lignocelulósica).  
25

Una composición para su uso en los procesos de la presente invención puede estar compuesto de enzimas de (1) proveedores comerciales; (2) genes clonados que expresan enzimas; (3) caldo (tal como el resultante del crecimiento de una cepa microbiana en medio, en donde las cepas secretan proteínas y enzimas en los medios; (4) lisados celulares de cepas cultivadas como en (3); y/o (5) enzimas que expresan el material vegetal. Las diferentes enzimas en una composición de la invención se pueden obtener de diferentes fuentes.  
30

Las enzimas se pueden producir exógenamente en microorganismos, levaduras, hongos, bacterias o plantas, luego se aíslan y se añaden, por ejemplo, a material lignocelulósico. Alternativamente, la enzima se puede producir en una fermentación que usa material lignocelulósico (pretratado) (tal como tallos y hojas de maíz o paja de trigo) para proporcionar la alimentación a un organismo que produce una enzima(s). De este modo, las plantas que producen las enzimas pueden ellas mismas servir de material lignocelulósico y añadirse en el material lignocelulósico.  
35

En los usos y métodos descritos en el presente documento, los componentes de las composiciones descritas anteriormente se pueden proporcionar simultáneamente (es decir, como una única composición en sí misma) o por separado, o una detrás de otra.

40 En una realización, las composiciones de enzima para su uso en los procesos de la presente invención pueden ser un caldo de fermentación completo como se describe a continuación. El caldo de fermentación completo puede comprender cualquiera de los polipéptidos anteriormente mencionados o cualquier combinación de los mismos. Preferentemente, la composición de enzima es caldo de fermentación completo, en donde las células están inactivadas. El caldo de fermentación completo puede contener ácido(s) orgánico(s) (usados para la inactivación de las células), células inactivadas y/o residuo celular, y medio de cultivo. En una realización, el caldo de fermentación completo comprende un primer componente de ácido orgánico que comprende al menos un ácido orgánico de 1-5 carbonos y/o una sal del mismo y un segundo componente de ácido orgánico que comprende un ácido orgánico de al menos 6 o más carbonos y/o una sal del mismo. En una realización, el primer componente de ácido orgánico es ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, una sal de los mismos, o cualquier combinación de los mismos, y el segundo  
45 componente de ácido orgánico es ácido benzoico, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido 4-metilvalérico, ácido fenilacético, una sal de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.  
50

El término "caldo de fermentación completo", como se usa en el presente documento, se refiere a una preparación producida por fermentación celular que no se somete a recuperación y/o purificación o a una mínima. Por ejemplo, los caldos de fermentación completos se producen cuando cultivos microbianos se cultivan hasta la saturación, se incuban en condiciones de carbono limitante para permitir la síntesis de proteínas (por ejemplo, expresión de enzimas por células hospedadoras) y secreción en medio de cultivo celular. Normalmente, el caldo de fermentación completo no está fraccionado y comprende medio de cultivo celular agotado, enzimas extracelulares y células microbianas, preferentemente no viables.  
55

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

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

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

10 Como se ha descrito anteriormente, una composición de enzima está presente en la etapa (d) y en la etapa (f) de los procesos de la presente invención. Estas composiciones de enzima pueden ser las mismas o pueden ser diferentes. Además, como se ha descrito anteriormente, se añaden enzimas adicionales durante la etapa (d) y/o etapa (f) de los procesos según la presente invención. Las enzimas añadidas pueden ser enzimas que ya están presentes en la etapa (d) y etapa (f). Alternativamente, pueden ser enzimas diferentes. Además, las enzimas adicionales añadidas durante la etapa (d) se pueden diferenciar o pueden ser las mismas que las enzimas adicionales añadidas durante la etapa (f) de los procesos según la presente invención.

15 El material lignocelulósico que se usa en el presente documento incluye cualquier material lignocelulósico y/o hemicelulósico. El material lignocelulósico adecuado para su uso en los procesos de la presente invención incluye biomasa, por ejemplo, biomasa virgen y/o biomasa no virgen tal como biomasa agrícola, extractos orgánicos comerciales, escombros de construcción y de demolición, residuos sólidos municipales, papel usado y desechos de jardín. Las formas comunes de biomasa incluyen árboles, arbustos y pastos, trigo, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, pasto varilla, miscanto, caña energética, maíz, tallos y hojas de maíz, cascarillas de maíz, mazorcas de maíz, tallos de colza, tallos de soja, sorgo dulce, granos de maíz que incluyen fibra de los granos, productos y subproductos de la molienda de los granos tales como maíz, trigo y cebada (incluyendo molienda en húmedo y molienda en seco) denominados frecuentemente "salvado o fibra", así como residuo sólido municipal, residuos de papel y restos de jardín. La biomasa también puede ser, pero no se limita a, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos de silvicultura, residuos sólidos municipales, residuos de papel y pulpa y residuos de fábricas de papel. La "biomasa agrícola" incluye ramas, arbustos, cañas, maíz y cascarillas de maíz, cultivos de energía, bosques, frutos, flores, granos, céspedes, cultivos herbáceos, hojas, corteza, agujas, troncos, raíces, árboles jóvenes, cultivos leñosos de rotación corta, arbustos, pastos varilla, árboles, verduras, cáscaras de fruta, vides, pulpa de remolacha azucarera, harinillas de trigo, cáscaras de avena y maderas duras y blandas (que no incluyen maderas con materiales perjudiciales). Además, la biomasa agrícola incluye materiales residuales orgánicos generados a partir de procesos agrícolas que incluyen actividades de la agricultura y la silvicultura, específicamente que incluyen residuo de maderas de la silvicultura. La biomasa agrícola puede ser cualquiera de la mezcla anteriormente mencionada singularmente o en cualquier combinación o mezcla de las mismas.

20 La celulosa es un compuesto orgánico con la fórmula  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , un polisacárido que consiste en una cadena lineal de varios cientos a más de diez mil unidades de D-glucosa unidas por  $\beta(1 \rightarrow 4)$ . Una molécula de glucano es un polisacárido de monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos. En el presente documento, glucano y celulosa se usan indistintamente para un polisacárido de monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos. Los métodos para el análisis cuantitativo de composiciones de glucano o polisacárido son bien conocidos y se describen en la técnica y se resumen, por ejemplo, en Carvalho de Souza et al., Carbohydrate Polymers 95 (2013) 657-663. En general, del 50 al 70 % del glucano es celulosa cristalina, el resto es celulosa amorfa.

25 Como se ha descrito anteriormente, el material lignocelulósico puede ser pretratado opcionalmente. Se conocen en la técnica métodos de pretratamiento e incluyen, pero no se limitan a, calor, modificación mecánica, química, modificación biológica y cualquier combinación de los mismos. El pretratamiento se realiza normalmente para potenciar la accesibilidad del material lignocelulósico a la hidrólisis enzimática y/o para hidrolizar la hemicelulosa y/o solubilizar la hemicelulosa y/o celulosa y/o lignina, en el material lignocelulósico. En una realización, el pretratamiento comprende tratar el material lignocelulósico con explosión de vapor de agua, tratamiento con agua caliente o tratamiento con ácido diluido o base diluida.

30 Como se ha descrito anteriormente, el material lignocelulósico puede ser lavado opcionalmente. La etapa de lavado opcional se puede usar para retirar compuestos solubles en agua que pueden actuar de inhibidores de la etapa de fermentación y/o de hidrólisis. La etapa de lavado se puede realizar en un modo conocido por el experto.

35 La composición de enzima usada en el proceso de la invención puede hidrolizar de manera extremadamente eficaz el material lignocelulósico, por ejemplo las hojas y los tallos del maíz o la paja del trigo, que pueden entonces ser convertidos posteriormente en un producto, tal como etanol, biogás, butanol, ácido láctico, un plástico, un ácido orgánico, un disolvente, un suplemento para pienso animal, un fármaco, una vitamina, un aminoácido, una enzima o una materia prima química. Además, se pueden usar productos intermedios de un proceso tras la hidrólisis, por ejemplo ácido láctico como producto intermedio en la producción de biogás, como elemento estructural para otros

materiales. La presente invención se ejemplifica con la producción de etanol, pero esto se hace como ejemplificación solo en vez de como limitación, los otros productos mencionados se pueden producir igual de bien.

El proceso según la invención comprende dos etapas de hidrólisis enzimática, la etapa (d) y la etapa (f). En la etapa (d), la hidrólisis se realiza principalmente con el fin de licuefacción del material lignocelulósico, mientras que en la etapa (f) la hidrólisis se realiza principalmente con el fin de liberar el azúcar del material lignocelulósico. Dependiendo del material lignocelulósico y el método de pretratamiento, el experto puede adaptar diferentes condiciones de reacción, por ejemplo temperatura, dosificación de enzimas, tiempo de reacción de la hidrólisis y concentración de materia seca, para lograr un fin deseado de la hidrólisis. Algunas indicaciones se dan a continuación.

En una realización, la hidrólisis enzimática en la etapa (d) y/o etapa (f) de los procesos según la presente invención se realiza a una temperatura de 45 °C o más, 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 hidrólisis tiene muchas ventajas, que incluyen trabajar a la temperatura óptima de la composición de enzima, la reducción del riesgo de contaminación (bacteriana), viscosidad reducida, cantidad más pequeña de agua de refrigeración requerida, uso de agua de refrigeración con una temperatura más alta, reutilización de las enzimas y más. La temperatura usada en la hidrólisis enzimática en la etapa (d) y/o la etapa (f) se puede diferenciar o puede ser la misma.

En una realización, la cantidad de composición de enzima añadida (también denominada en el presente documento la dosis de enzima o carga de enzima) es baja. En una realización, la cantidad de enzima es 6 mg de proteína / g de peso de materia seca o inferior, 5 mg de proteína / g de materia seca o inferior, 4 mg de proteína / g de materia seca o inferior, 3 mg de proteína / g de materia seca o inferior, 2 mg de proteína / g de materia seca o inferior, o 1 mg de proteína / g de materia seca o inferior (expresada como proteína en mg de proteína / g de materia seca). En una realización, la cantidad de enzima es 0,5 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,4 mg de composición de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,3 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,25 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,20 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,18 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,15 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior o 0,10 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior (expresada como el total de enzimas celulasa en mg de enzima / g de materia seca). Es posible una baja dosis de enzima debido a la actividad y estabilidad de las enzimas. La cantidad de composición de enzima añadida en la hidrólisis enzimática en la etapa (d) y/o etapa (f) se puede diferenciar o puede ser la misma.

En una realización, el tiempo de hidrólisis total es 6 horas o más, 10 horas o más, 20 horas o más, 40 horas o más, 50 horas o más, 60 horas o más, 70 horas o más, 80 horas o más, 90 horas o más, 100 horas o más, 120 horas o más, 130 h o más.

En una realización, el tiempo de hidrólisis total es 5 a 150 horas, 30 a 140 horas, 40 a 120 horas, 45 a 110 horas, 50 a 100 horas, 55 a 95 horas, 60 a 90 horas, 65 a 85 horas o 70 a 80 horas. Debido a la estabilidad de la composición de enzima son posibles tiempos de reacción de la hidrólisis más largos con rendimientos de azúcar más elevados correspondientes. "Tiempo de hidrólisis total", como se usa en el presente documento, significa tiempo de reacción de la etapa (d) y la etapa (f).

En una realización, el tiempo de hidrólisis enzimática en la etapa (d) de los procesos según la presente invención es 3 a 30 horas.

En una realización, el tiempo de hidrólisis enzimática en la etapa (f) de los procesos según la presente invención es 3 a 120 horas.

El pH durante la hidrólisis puede ser elegido por el experto. En una realización, el pH durante la hidrólisis puede ser 3,0 a 6,4. Las enzimas estables de la invención pueden tener un amplio intervalo de pH de hasta 2 unidades de pH, hasta 3 unidades de pH, hasta 5 unidades de pH. El pH óptimo puede encontrarse dentro de los límites de pH 2,0 a 8,0, 2,5 a 7,5, 3,0 a 7,0, 3,5 a 6,5, 4,0 a 5,0, 4,0 a 4,5, o es aproximadamente 4,2. El pH usado en la hidrólisis enzimática en la etapa (d) y/o etapa (f) se puede diferenciar o puede ser el mismo. El pH óptimo de la composición de enzima usada en la hidrólisis enzimática en la etapa (d) y/o etapa (f) se puede diferenciar o puede ser el mismo.

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

Significativamente, un proceso de la invención se puede llevar a cabo usando altos niveles de materia seca (del material lignocelulósico) en la reacción de hidrólisis. En una realización, el contenido de materia seca al final de la hidrólisis de la etapa (f) es del 5 % en peso o superior, 6 % en peso o superior, 7 % en peso o superior, 8 % en peso o superior, 9 % en peso o superior, 10 % en peso o superior, 11 % en peso o superior, 12 % en peso o superior, 13 % en peso o superior, 14 % en peso o superior, 15 % en peso o superior, 16 % en peso o superior, 17 % en peso o superior, 18 % en peso o superior, 19 % en peso o superior, 20 % en peso o superior, 21 % en peso o superior, 22 % en peso o superior, 23 % en peso o superior, 24 % en peso o superior, 25 % en peso o superior, 26 % en peso o superior, 27 % en peso o superior, 28 % en peso o superior, 29 % en peso o superior, 30 % en peso o superior, 31 % en peso o superior, 32 % en peso o superior, 33 % en peso o superior, 34 % en peso o superior, 35 % en peso o superior, 36 % en peso o superior, 37 % en peso o superior, 38 % en peso o superior, 39 % en peso o superior, 40 % en peso o superior, 41 % en peso o superior, 42 % en peso o superior, 43 % en peso o superior, 44 % en peso o superior, 45 % en peso o superior, 46 % en peso o superior, 47 % en peso o superior, 48 % en peso o superior, 49 % en peso o superior, 50 % en peso o superior, 51 % en peso o superior, 52 % en peso o superior, 53 % en peso o superior, 54 % en peso o superior, 55 % en peso o superior, 56 % en peso o superior, 57 % en peso o superior, 58 % en peso o superior, 59 % en peso o superior, 60 % en peso o superior, 61 % en peso o superior, 62 % en peso o superior, 63 % en peso o superior, 64 % en peso o superior, 65 % en peso o superior, 66 % en peso o superior, 67 % en peso o superior, 68 % en peso o superior, 69 % en peso o superior, 70 % en peso o superior, 71 % en peso o superior, 72 % en peso o superior, 73 % en peso o superior, 74 % en peso o superior, 75 % en peso o superior, 76 % en peso o superior, 77 % en peso o superior, 78 % en peso o superior, 79 % en peso o superior, 80 % en peso o superior, 81 % en peso o superior, 82 % en peso o superior, 83 % en peso o superior, 84 % en peso o superior, 85 % en peso o superior, 86 % en peso o superior, 87 % en peso o superior, 88 % en peso o superior, 89 % en peso o superior, 90 % en peso o superior, 91 % en peso o superior, 92 % en peso o superior, 93 % en peso o superior, 94 % en peso o superior, 95 % en peso o superior, 96 % en peso o superior, 97 % en peso o superior, 98 % en peso o superior, 99 % en peso o superior, 100 % en peso o superior.

superior, 36 % en peso o superior, 37 % en peso o superior, 38 % en peso o superior, 39 % en peso o superior o 40 % en peso o superior.

5 En una realización, la fermentación en la etapa (h) de los procesos según la presente invención se realiza en el segundo recipiente. Es decir, la fermentación se puede hacer simultáneamente con la sacarificación en un recipiente (un proceso denominado SSF). Alternativamente, la fermentación en la etapa (h) también se puede realizar en un tercer recipiente. Preferentemente, la fermentación se hace después de la hidrólisis y se pueden seleccionar condiciones óptimas para tanto la hidrólisis como la fermentación que podrían ser diferentes para la hidrólisis y la fermentación. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención incluye en la etapa procesos de fermentación en los que un microorganismo se usa para la fermentación de una fuente de carbono que comprende azúcar(es), por ejemplo glucosa, L-arabinosa y/o xilosa. La fuente de carbono puede incluir cualquier oligo- o polímero de hidrato de carbono que comprende unidades de L-arabinosa, xilosa o glucosa, tales como, por ejemplo, lignocelulosa, xilanos, celulosa, almidón, arabinano y similares. Para la liberación de unidades de xilosa o glucosa a partir de dichos hidratos de carbono, se pueden añadir carbohidrasas apropiadas (tales como xilanasas, glucanasas, amilasas y similares) al medio de fermentación o se pueden producir por la célula hospedadora modificada. En el último caso, la célula hospedadora modificada puede ser genéticamente manipulada para producir y eliminar dichas carbohidrasas. Una ventaja adicional del uso de las fuentes oligo- o poliméricas de glucosa es que permite mantener una concentración (más) baja de glucosa libre durante la fermentación, por ejemplo, usando cantidades limitantes de la velocidad de las carbohidrasas. Esto, a su vez, prevendrá la represión de sistemas requeridos para el metabolismo y el transporte de azúcares no de glucosa tales como xilosa. En un proceso preferido, la célula hospedadora modificada fermenta tanto la L-arabinosa (opcionalmente xilosa) como la glucosa, preferentemente simultáneamente, en cuyo caso se usa preferentemente una célula hospedadora modificada que es insensible a la represión de la glucosa para prevenir el crecimiento diaúxico. Además de una fuente de L-arabinosa, opcionalmente xilosa (y glucosa) como fuente de carbono, el medio de fermentación comprenderá además el componente apropiado requerido para el crecimiento de la célula hospedadora modificada. Se conocen bien en la técnica las composiciones de los medios de fermentación para el crecimiento de microorganismos tales como levaduras u hongos filamentosos.

10 El tiempo de fermentación puede ser más corto que en la fermentación convencional en las mismas condiciones, en donde parte de la hidrólisis enzimática todavía tiene que participar 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 material lignocelulósico (por ejemplo, 50 g/l de xilosa, 35 g/l de L-arabinosa y 10 g/l de galactosa. Para composiciones de azúcar más diluidas, el tiempo de fermentación se puede reducir correspondientemente.

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

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

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

30 En una realización de la invención, en la etapa (h), la fermentación se realiza con un microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar C5. En una realización, el proceso es un proceso para la producción de etanol, en donde

el proceso comprende la etapa de fermentar un medio que contiene azúcar(es) con un microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar C5. El microorganismo puede ser un organismo procarionta o eucarionta. El microorganismo usado en el proceso puede ser un microorganismo genéticamente manipulado. Los ejemplos de organismos adecuados son levaduras, por ejemplo *Saccharomyces*, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, por ejemplo *Issatchenkia orientalis*, *Pichia*, por ejemplo *Pichia stipitis*, o bacterias, por ejemplo *Lactobacillus*, por ejemplo *Lactobacillus lactis*, *Geobacillus*, *Zymomonas*, por ejemplo *Zymomonas mobilis*, *Clostridium*, por ejemplo *Clostridium phytofermentans*. En una realización el microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar C5 es una levadura. En una realización, la levadura pertenece al género *Saccharomyces*, preferentemente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, usada en la etapa (h) de los procesos según la presente invención es capaz de convertir azúcares de hexosa (C6) y azúcares de pentosa (C5). La levadura, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, usada en la etapa (h) de los procesos según la presente invención puede fermentar anaeróticamente al menos un azúcar C6 y al menos un azúcar C5. Por ejemplo, la levadura es capaz de usar L-arabinosa y xilosa, además de glucosa anaeróticamente. En una realización, la levadura es capaz de convertir L-arabinosa en 5-fosfato de L-ribulosa y/o xilulosa y/o en un producto de fermentación deseado, por ejemplo en etanol. Los organismos, por ejemplo las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, capaces de producir etanol a partir de L-arabinosa se pueden producir modificando una levadura hospedadora introduciendo los genes *araA* (L-arabinosa isomerasa), *araB* (L-ribuloglioxalato) y *araD* (L-ribulosa-5-P4-epimerasa) de una fuente adecuada. Dichos genes se pueden introducir en una célula hospedadora con el fin de que sea capaz de usar arabinosa. Dicho enfoque se da se describe en el documento de patente WO2003/095627. Se pueden usar los genes *araA*, *araB* y *araD* de *Lactobacillus plantarum* y se desvelan en el documento de patente WO2008/041840. Se pueden usar gen *araA* de *Bacillus subtilis* y los genes *araB* y *araD* de *Escherichia coli* y se desvelan en el documento de patente EP1499708. En otra realización, los genes *araA*, *araB* y *araD* pueden derivar de al menos uno de los géneros *Clavibacter*, *Arthrobacter* y/o *Gramella*, en particular uno de *Clavibacter michiganensis*, *Arthrobacter aureescens* y/o *Gramella forsetii*, como se desvela en documento de patente WO 2009011591. En una realización, la levadura también puede comprender una o más copias del gen de xilosa isomerasa y/o una o más copias de xilosa reductasa y/o xilitol deshidrogenasa.

La levadura puede comprender una o más modificaciones genéticas para permitir que la levadura fermente xilosa. Los ejemplos de modificaciones genéticas son la introducción de uno o más del gen *xyIA*, gen *XYL1* y gen *XYL2* y/o el gen *XKS1*; delección del gen de aldosa reductasa (*GRE3*); expresión en exceso de los genes de PPP *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* y *RK11* para permitir el aumento del flujo a través de la vía de fosfato de pentosa en la célula. Los ejemplos de levadura genéticamente manipulada se describen en los documentos de patente EP1468093 y/o WO2006/009434.

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

En una realización, el proceso de fermentación para la producción de etanol es anaerobio. Anaerobio ya se ha definido anteriormente en el presente documento. En otra realización preferida, el proceso de fermentación para la producción de etanol es aerobio. En otra realización preferida, el proceso de fermentación para la producción de etanol es en condiciones limitadas de oxígeno, más preferentemente aerobio y en condiciones limitadas de oxígeno. Las condiciones limitadas de oxígeno ya se han definido anteriormente en el presente documento.

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

En un aspecto, el proceso de fermentación que conduce a la producción de etanol tiene varias ventajas por comparación con procesos de fermentación del etanol conocidos: son posibles los procesos anaerobios; son posibles condiciones limitadas de oxígeno; se pueden obtener rendimientos de etanol y tasas de producción de etanol más altos; la cepa usada puede ser capaz de usar L-arabinosa y opcionalmente xilosa.

Alternativamente, para los procesos de fermentación descritos anteriormente, se pueden usar 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 ha descrito anteriormente también son realizaciones preferidas de este proceso de cofermentación: identidad del producto de fermentación, identidad de la fuente de L-arabinosa y fuente de xilosa, condiciones de fermentación (condiciones aerobias o anaerobias, condiciones limitadas de oxígeno, temperatura a la que se está llevando a cabo el proceso, productividad del etanol, rendimiento de etanol).

El proceso de fermentación se puede llevar a cabo sin ningún requisito para ajustar el pH durante el proceso. Es decir, el proceso es uno que se puede llevar a cabo sin la adición de ácido(s) o base(s). Sin embargo, esto excluye la etapa de pretratamiento, donde se puede añadir ácido. La cuestión es que la composición de enzima usada en los procesos de la invención es capaz de actuar a bajo pH y, por tanto, no existe necesidad de ajustar el pH del ácido de una materia prima pretratada con ácido con el fin de que pueda tener lugar la hidrólisis. Por consiguiente, los procesos de la invención pueden ser procesos de residuos cero usando solo productos orgánicos sin requisito de salida de productos químicos inorgánicos.

5 Se puede reducir el tiempo de reacción global (o el tiempo de reacción de la etapa de hidrólisis y la etapa de fermentación juntos). En una realización, el tiempo de reacción global es 300 horas o menos, 200 horas o menos, 150 horas o menos, 140 horas o menos, 130 o menos, 120 horas o menos, 110 horas o menos, 100 horas de menos, 90 horas o menos, 80 horas o menos, 75 horas o menos, o aproximadamente 72 horas con 90 % de rendimiento de glucosa. Correspondientemente, se pueden alcanzar tiempos de reacción globales más bajos con rendimiento de glucosa más bajo.

10 Los productos de fermentación que se pueden producir por los procesos de la invención incluyen aminoácidos, vitaminas, productos farmacéuticos, suplementos para piensos para animales, productos químicos de especialidad, materias primas químicas, plásticos, disolventes, combustibles u otros polímeros orgánicos, ácido láctico y etanol, que incluyen etanol combustible (entendiéndose que el término "etanol" incluye alcohol etílico o mezclas de alcohol etílico y agua).

15 Los productos de valor añadido específicos que se pueden producir por los procesos de la invención incluyen, pero no se limitan a, biocombustibles (incluyendo biogás, etanol y butanol); ácido láctico; ácido 3-hidroxipropiónico; ácido acrílico; ácido acético; 1,3-propanodiol; etileno; glicerol; un plástico; un producto químico de especialidad; un ácido orgánico, que incluye ácido cítrico, ácido succínico y ácido maleico; un disolvente; un suplemento para piensos para animales; un producto farmacéutico tal como un antibiótico  $\beta$ -lactámico o una cefalosporina; una vitamina; un aminoácido, tal como 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 oxidoreductasa, una transferasa o una xilanasas; una materia prima química; o un suplemento para piensos para animales.

20 Los procesos según la invención comprenden opcionalmente la recuperación del producto de fermentación. Un producto de fermentación se puede separar del caldo de fermentación de cualquier modo conocido por el experto en la técnica. Para cada producto de fermentación, el experto será así capaz de seleccionar una técnica de separación apropiada. Por ejemplo, se puede separar etanol de un caldo de fermentación de levadura mediante destilación, por ejemplo destilación con vapor de agua / destilación a vacío en la forma convencional.

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

## EJEMPLOS

### 30 Ejemplo 1

#### ***El efecto en la licuefacción del orden de adición del material lignocelulósico y la composición de enzima al recipiente de hidrólisis***

Para mostrar el efecto del orden de adición del material lignocelulósico y la composición de enzima al recipiente de hidrólisis en el proceso de licuefacción, se realizaron los siguientes experimentos.

35 En dos recipientes A y B con agitación, se realizó una hidrólisis con material lignocelulósico pretratado (paja de caña de azúcar 37 % (p/p) de materia seca) y una composición de enzima (100 mg de eWB-CE enriquecida en BG/g de MS) a una temperatura de 62 °C y pH 4,5 durante 8,4 horas.

40 Se produjo la composición que contiene celulasa TEC-210 como se describe en el documento de patente WO 2011/000949. El caldo completo de la composición que contiene celulasa TEC-210 (eWB-CE) comprendió 44 mg de proteína/g de caldo completo.

45 El recipiente A se cargó con 349 g de ácido cítrico 50 mM y luego se añadió material lignocelulósico pretratado (denominado biomasa en la Tabla 1). A continuación, la composición de enzima se añadió al material lignocelulósico en el recipiente. A partir de aquí, la composición de enzima y el material lignocelulósico se añadieron al recipiente en un modo de lotes alimentados como se describe en la Tabla 1 (a t=0, se añadieron 1,8 g de composición de enzima a 31 g de material lignocelulósico pretratado presente en el recipiente).

El recipiente B se cargó con 349 g de ácido cítrico 50 mM y se añadió la cantidad total (24,2 g) de la composición de enzima y luego material lignocelulósico pretratado en un modo de lotes alimentados como se describe en la Tabla 1 (a t=0, se añadió 31 g de material lignocelulósico pretratado a la composición de enzima total presente en el recipiente).

50 Se siguió la viscosidad de la mezcla de hidrólisis durante la hidrólisis y se determinó con un reómetro Brookfield DV III a 1 rpm y a una temperatura de 62 °C.

Las porciones finales se añadieron 8,4 horas después del inicio de la hidrólisis enzimática. En ese momento de tiempo, el recipiente A y el recipiente B contuvieron un total de 430 g de material lignocelulósico pretratado y 24,2 g de composición de enzima, que corresponde a 0,056 g de composición de enzima por g de material lignocelulósico pretratado. El contenido de materia seca después de 8,4 horas fue del 20 % (p/p).

Los resultados de las mediciones de viscosidad se muestran en la Tabla 2. Los resultados muestran que en el recipiente B, en donde el material lignocelulósico se añade al recipiente que ya comprende composición de enzima, la viscosidad es inferior a cuando la composición de enzima se añade al material lignocelulósico presente en el recipiente. En otras palabras, cuando todas las enzimas ya están presentes en el recipiente de hidrólisis al comienzo de la fase de alimentación de biomasa de la hidrólisis enzimática, la viscosidad es inferior a cuando las enzimas se añaden a la biomasa. Una menor viscosidad reduce los requisitos de entrada de corriente para la mezcla, que son especialmente significativos a gran escala y facilita el muestreo reproducible debido a la elevada homogeneidad del material lignocelulósico licuado durante la fase de alimentación. El tener la composición de enzima presente en el recipiente al comienzo de la hidrólisis enzimática, como en el recipiente B, también simplifica el procesamiento, ya que solo se tiene que añadir una corriente al recipiente (en el recipiente B solo se tiene que añadir material lignocelulósico, mientras que en el recipiente A solo se necesita añadir material lignocelulósico y composición de enzima). Esta simplificación reduce los riesgos de fallos del proceso.

**Ejemplo 2**

**El efecto en la licuefacción de la adición por lotes alimentados y la adición de lotes de material lignocelulósico a un recipiente de hidrólisis que comprende composición de enzima**

Para demostrar que la adición por lotes alimentados de material lignocelulósico (denominado biomasa en la Tabla 3) a un recipiente que contiene composición de enzima tiene ventajas con respecto a la adición en lotes de material lignocelulósico a un recipiente que contiene composición de enzima, se realizó el siguiente experimento.

Se calentaron hasta 62 °C ocho recipientes similares que contenían las cantidades de ácido cítrico (50 mM, pH 4,5) y la composición de enzima como se da en la Tabla 3. Se añadió en lotes material lignocelulósico pretratado (paja de caña de 37 % (p/p) de materia seca) a los recipientes 1 a 7 en las cantidades dadas en la Tabla 3, de manera que se obtuvieron diferentes contenidos de materia seca al comienzo de la hidrólisis enzimática.

La viscosidad se midió usando un reómetro Brookfield DV III a una temperatura de 62 °C después de que se mezclaran material lignocelulósico y composición de enzima. La viscosidad medida es representativa para la viscosidad al comienzo de la hidrólisis enzimática de material lignocelulósico a diferentes contenidos de materia seca.

El material lignocelulósico se añadió en un modo de lotes alimentados al recipiente 8. La cantidad de tampón ácido cítrico (2169 g) y la composición de enzima (101 g) indicada en la Tabla 3 estuvo presente al comienzo de la hidrólisis enzimática. A continuación, se añadió material lignocelulósico en porciones (lotes alimentados) alcanzando los niveles de biomasa dados en la Tabla 3. El tiempo entre cada adición fue 1 hora. Es decir, los primeros 176 g de biomasa se añadieron al recipiente para dar una cantidad total de biomasa de 176 g, después de una hora se añadieron 594 g de biomasa al recipiente para dar una cantidad total de biomasa de 770 g, después de otra hora se añadieron 392 g de biomasa al recipiente para dar una cantidad total de biomasa de 1162 g, etc. Al final de la adición de lotes alimentados de material lignocelulósico, se obtuvo 20 % (p/p) de materia seca con una dosis de enzima de 0,1 g de enzima por g de MS de biomasa. La viscosidad se midió usando un reómetro Brookfield DV III a una temperatura de 62 °C después de que se mezclaran el material lignocelulósico y la composición de enzima.

La Tabla 3 muestra claramente que la adición por lotes alimentados de material lignocelulósico a un recipiente que comprende composición de enzima conduce a una viscosidad inferior a cuando el material lignocelulósico se añade en lotes a un recipiente que comprende la composición de enzima. Esto es el caso para contenidos de materia seca por encima y por debajo del 10 % (p/p).

Tabla 1: Adición de material lignocelulósico y composición de enzima durante la licuefacción en los recipientes A y B.

Tiempo (h)	Recipiente A			Recipiente B		
	Biomasa (g)	Enzima (g)	Enzima/ biomasa (g/g)	Biomasa (g)	Enzima (g)	Enzima/ biomasa (g/g)
0	31	1,8	0,056	31	24,2	0,779
1,0	57	3,2	0,056	57		0,275
2,1	57	3,2	0,056	57		0,167
3,0	57	3,2	0,056	57		0,120
4,3	57	3,2	0,056	57		0,093
5,6	57	3,2	0,056	57		0,077
7,4	57	3,2	0,056	57		0,065

## ES 2 906 153 T3

8,4	57	3,2	0,056	57		0,056
Total añadido (g)	430	24,2		430	24,2	

Tabla 2: Medición de viscosidad.

	Recipiente A	Recipiente B
Tiempo (h)	Viscosidad (cP)	
0	0	0
1,0	0	0
2,1	0	0
3,0	2000	2000
4,3	8000	3000
5,6	24000	13000
7,4	39000	26000
8,4	74000	59000

Tabla 3: Contenido de los recipientes 1 a 8 en los que se realizó la hidrólisis enzimática en diferentes niveles de materia seca.

Recipiente	Ácido cítrico (g)	Enzima (g)	Biomasa (g)	Enzima/ MS de biomasa (g/g)	Contenido de materia seca (% (p/p))	Viscosidad (cP)
1	4341	23,5	635	0,10	4,7	98
2	4075	33,0	892	0,10	6,6	200
3	3809	42,5	1149	0,10	8,5	323
4	3669	47,5	1283	0,10	9,5	716
5	3542	52,0	1405	0,10	10,4	2345
6	3402	57,0	1541	0,10	11,4	5600
7	3276	61,5	1662	0,10	12,3	9829
8	2169	101	176	1,55	2,7	69
			770	0,35	9,4	61
			1162	0,23	12,5	194
			1473	0,19	14,6	813
			1746	0,16	16,1	1586
			1989	0,13	17,3	2257
			2205	0,12	18,2	2478
			2395	0,11	19,0	3142
			2565	0,11	19,6	3202
			2732	0,10	20,2	4108

**REIVINDICACIONES**

1. 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;

5 b) opcionalmente, lavado del material lignocelulósico opcionalmente pretratado;

c) adición por lotes alimentados del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado a un primer recipiente que comprende una composición de enzima que comprende al menos dos celulasas;

10 d) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado en el primer recipiente usando la composición de enzima que comprende al menos dos celulasas para licuar el material lignocelulósico;

e) adición del material lignocelulósico licuado a un segundo recipiente;

f) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico licuado en el segundo recipiente usando una composición de enzima que comprende al menos dos celulasas para obtener un producto de azúcar; y

g) opcionalmente, recuperación del producto de azúcar,

15 en donde se añade oxígeno al primer recipiente y/o segundo recipiente y en donde la etapa de alimentación empieza añadiendo material lignocelulósico a un recipiente en donde una composición de enzima está presente y en donde las enzimas usadas en el proceso de hidrólisis están presentes al comienzo de la etapa de alimentación.

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) adición por lotes alimentados del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado a un primer recipiente que comprende una composición de enzima que comprende al menos dos celulasas;

25 d) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado en el primer recipiente usando la composición de enzima que comprende al menos dos celulasas para licuar el material lignocelulósico;

e) adición del material lignocelulósico licuado a un segundo recipiente;

f) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico licuado en el segundo recipiente usando una composición de enzima que comprende al menos dos celulasas para obtener un material lignocelulósico hidrolizado;

30 g) opcionalmente, recuperación del material lignocelulósico hidrolizado;

h) fermentación del material lignocelulósico hidrolizado para producir un producto de fermentación; y

i) opcionalmente, recuperación del producto de fermentación,

35 en donde se añade oxígeno al primer recipiente y/o segundo recipiente y en donde la etapa de alimentación empieza añadiendo material lignocelulósico a un recipiente en donde una composición de enzima está presente y en donde enzimas usadas en el proceso de hidrólisis están presentes al comienzo de la etapa de alimentación.

3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, en donde se añaden enzimas adicionales durante la etapa (d) y/o la etapa (f).

40 4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la viscosidad del material lignocelulósico en el primer recipiente durante la etapa (d) se controla ajustando la tasa de adición del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado.

5. Proceso según la reivindicación 4, en donde la viscosidad del material lignocelulósico en el primer recipiente durante la etapa (d) se mantiene por debajo de 1 Pa·s (1000 cP).

6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde una composición acuosa, opcionalmente una composición de enzima acuosa que comprende al menos dos celulasas, se añade al primer recipiente.

## ES 2 906 153 T3

7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el oxígeno se añade al espacio de cabeza del recipiente.
8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el primer recipiente y/o segundo recipiente tienen un volumen de al menos 1 m<sup>3</sup>.
- 5 9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el tiempo de hidrólisis enzimática en la etapa (d) es 3 a 24 horas.
- 10 10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el tiempo de hidrólisis enzimática en la etapa (f) es 3 a 120 horas.
11. Proceso según la reivindicación cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la hidrólisis enzimática en la etapa (d) y/o la etapa (f) se realiza a una temperatura de 45 °C o más, preferentemente 50 °C o más y más preferentemente a una temperatura de 55 °C o más.
12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la composición de enzima deriva de un hongo, preferentemente un microorganismo del género *Rasamsonia*, o la composición de enzima comprende una enzima fúngica, preferentemente una enzima *Rasamsonia*.
- 15 13. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en donde la fermentación en la etapa (h) se realiza en el segundo recipiente.
14. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el contenido de materia seca al final de la hidrólisis de la etapa (f) es 5 % en peso o superior.
- 20 15. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la composición de enzima es un caldo de fermentación completo.
16. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 15, en donde la fermentación en la etapa (h) se realiza con un microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar C5.