(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 973 866**

(51) Int. Cl.:

C12P 1/00 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2013 E 19197489 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2023 EP 3613860**

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

(30) Prioridad:

09.11.2012 EP 12191957
02.07.2013 EP 13174656
11.07.2013 EP 13176083
15.07.2013 EP 13176500
17.09.2013 EP 13184702
17.09.2013 EP 13184701

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.06.2024

(73) Titular/es:

VERSALIS S.P.A. (100.0%)
Piazza Boldrini 1
20097 San Donato Milanese (MI), IT

(72) Inventor/es:

NOORDAM, BERTUS;
BERKHOUT, MICHAEL PETRUS JOZEF y
HISENI, AIDA

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para hidrólisis enzimática de material lignocelulósico y fermentación de azúcares

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

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

Puesto que la (hemi)-celulosa es cristalina y queda atrapada en una red de lignina, la conversión en azúcares reductores es en general lenta e incompleta. Típicamente, la hidrólisis enzimática de la materia prima no tratada produce azúcares en una cantidad < 20% de la teórica. Aplicando un pretratamiento químico y termo-físico, la (hemi)celulosa es más accesible para las enzimas (hemi)-celulolíticas, y, de esta manera, las conversiones son más rápidas y con mayores rendimientos.

Un rendimiento de etanol típico a partir de glucosa, derivada de rastrojo de maíz pretratado, es de 151,4 litros (40 galones) de etanol por 1000 kg de rastrojo de maíz seco (Badger, P, Ethanol from cellulose: a general review, Trends in new crops and new uses, 2002, J. Janick and A. Whipkey (eds.) ASHS Press, Alexandria, VA) o 0,3 g de etanol por g de materia prima. El rendimiento máximo de etanol en una base de celulosa es aproximadamente 90%.

Las enzimas celulolíticas -producidas en su mayor parte por especies como *Trichoderma*, *Humicola* y Aspergillus- se usan comercialmente para convertir la materia prima pretratada en un macerado que contiene (hemi)celulosa insoluble, azúcares reductores obtenidos a partir de la misma, y lignina. Las enzimas celulolíticas termoestables derivadas de *Rasamsonia* se han usado para degradar la materia prima lignocelulósica, y estas enzimas se conocen por su termoestabilidad, véase el documento WO2007091231. El macerado producido se usa en una fermentación durante la cual los azúcares reductores se convierten en biomasa de levadura (células), dióxido de carbono y etanol. El etanol producido de esta manera se llama bio-etanol.

La producción habitual de azúcares a partir de materia prima lignocelulósica pretratada, la hidrólisis denominada también licuefacción, la pre-sacarificación o sacarificación, tiene lugar típicamente durante un procedimiento que dura 6 a 168 horas (Kumar, S., Chem. Eng. Technol. 32 (2009) 517-526) a temperaturas elevadas de 45 a 50ºC y en condiciones no estériles. Durante esta hidrólisis, la celulosa presente se convierte parcialmente (tipicamente 30 a 95%, dependiendo de la actividad enzimática y de las condiciones de hidrólisis) en azúcares reductores. En el caso de inhibición de las enzimas por compuestos presentes en la materia prima pretratada y por azúcares liberados; y para 35 minimizar la inactivación térmica, este periodo de temperatura elevada se minimiza tanto como sea posible.

La fermentación que sigue a la hidrólisis tiene lugar en una etapa de procedimiento diferente, preferentemente anaerobia, ya sea en el mismo recipiente o en un recipiente diferente, en el que la temperatura se ajusta a 30 a 33ºC (procedimiento mesófilo) para adaptarse al crecimiento y producción de etanol por la biomasa microbiana, comúnmente levaduras. Durante este procedimiento de fermentación, el material (hemi)celulósico restante se convierte en azúcares reductores por las enzimas ya presentes de la etapa de hidrólisis, a la vez que se producen la biomasa microbiana y el etanol. La fermentación se termina una vez que el material (hemi)celulósico se convierte en azúcares fermentables, y todos los azúcares fermentables se convierten en etanol, dióxido de carbono y células microbianas. Esto puede tardar hasta 6 días. En general, el tiempo de procedimiento global de la hidrólisis y fermentación puede suponer hasta 13 días.

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

El documento WO2010080407 sugiere tratar material celulósico con una composición de celulasa en condiciones anaerobias. La retirada o exclusión de las especies de oxígeno reactivas puede mejorar el rendimiento de los sistemas enzimáticos hidrolizantes de celulosa. La hidrólisis de material celulósico, por ejemplo lignocelulosa, por una composición de enzima se puede reducir por daño oxidativo a los componentes de la composición de enzima y/u oxidación del material celulósico, por ejemplo por oxígeno molecular.

El documento WO2009046538 describe un método para tratar materiales vegetales como materia prima lignocelulósica para liberar azúcares fermentables usando un procedimiento de hidrólisis enzimática para tratar los materiales realizado a vacío y produciendo una corriente de procedimiento rica en azúcar que comprende cantidades reducidas de azúcar volátil/compuestos inhibidores de la fermentación, tales como furfural y ácido acético. Aparte de retirar los compuestos inhibidores volátiles, otros compuestos y/o moléculas que también se eliminan incluyen nitrógeno, oxígeno, argón y dióxido de carbono.

Con cada lote de materia prima, se añaden enzimas para maximizar el rendimiento y la velocidad de azúcares fermentables liberados de la materia prima lignocelulósica pretratada durante el tiempo de procedimiento dado. En general, los costes para la producción de enzimas, rendimientos de materia prima a etanol, e inversiones, son los factores de coste principales en los costes de producción globales (Kumar, S. Chem.

Eng. Technol. 32 (2009) 517-526). Hasta ahora, el coste por reducción del uso de enzimas se consigue aplicando productos enzimáticos procedentes de una única o de múltiples fuentes microbianas (documento WO 2008/008793) con actividad hidrolítica más amplia y/o mayor (específica) cuyo uso pretende reducir la necesidad de enzima, velocidades de conversión más rápidas y/o mayores rendimientos de conversión, y, de esta manera, a unos costes de producción de bioetanol menores globales. Esto requiere grandes inversiones en investigación y desarrollo de estos productos enzimáticos. En el caso de un producto enzimático compuesto de enzimas procedentes de múltiples fuentes microbianas, son necesarias grandes inversiones de capital para la producción de cada compuesto enzimático individual.

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

Sumario de la invención

Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar un procedimiento en el que la etapa de hidrólisis se realice en condiciones mejoradas. Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento que implique hidrólisis que tiene un tiempo de procedimiento reducido. Un objeto adicional de la invención es proporcionar un procedimiento en el que la dosificación de enzima se puede reducir y, al mismo tiempo, la producción de un producto de hidrólisis útil se mantiene al mismo nivel, o incluso aumenta. Otro objeto es proporcionar un procedimiento que implica hidrólisis, en el que las condiciones del procedimiento de la hidrólisis están optimizadas. Un objeto adicional más de la invención es proporcionar un procedimiento que implica hidrólisis, en el que la producción de un producto de hidrólisis útil aumenta usando la misma dosificación de enzima. Uno o más de estos objetos se consiguen de acuerdo con la invención.

La invención se establece en el conjunto de reivindicaciones anexas.

La parte del tiempo en la que no se añade oxígeno es 10 a 80%, preferiblemente 20 a 80%, más preferiblemente 30 a 80%, y lo más preferible, 40 a 80% del tiempo total de la hidrólisis enzimática.

La parte del tiempo en la que se añade más oxígeno es del 2 al 80 %, preferiblemente del 4 al 60%, más preferiblemente del 8 al 50% y lo más preferiblemente del 10 al 50% del tiempo total de hidrólisis enzimática, más preferiblemente la parte del tiempo en la que se añade más oxígeno es

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

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

De acuerdo con una modalidad preferida adicional de la invención, en la parte del tiempo en que se añade el oxígeno, la concentración de oxígeno en la fase líquida, en donde el material lignocelulósico está presente durante la hidrólisis enzimática, es, por ejemplo, más de 0,03 mol/m^3. En los reactores de menos de 1 m^3 se obtendrán valores de DO por debajo de 0,01 mol/m^3 o 0,02 mol/m^3 por agitación lenta. El mezclamiento o agitación vigorosa a tal escala introduce parte de la fase gaseosa del espacio de cabeza en el líquido de reacción. Por ejemplo, el mezclamiento o agitación pueden crear un remolino que arrastra el oxígeno hacia el líquido. En general, lavando el espacio de cabeza con oxígeno (por ejemplo en forma de aire) en combinación con mezclamiento o agitación (vigorosos) introducirá suficiente oxígeno en el material celulósico en el reactor de hidrólisis para reactores con un tamaño de 100 litros hasta 1 m^3. A una mayor escala, por ejemplo en un reactor de 50 m^3 o más, por ejemplo 100 m^3, se necesita tanta energía para la agitación vigorosa que desde un punto de vista económico esto no se aplicará en un procedimiento que funcione a nivel comercial. En general, en reactores más grandes, la agitación o mezclamiento sin introducción de aire u oxígeno dará como resultado valores de DO de menos de 0,01 mol/m^3.

Todavía otra realización preferida de la invención, durante la adición de oxígeno (en la parte del tiempo cuando se añade el oxígeno), la concentración de oxígeno en la fase líquida, en la que el material lignocelulósico está presente durante la hidrólisis enzimática, es preferiblemente como máximo 80% de la concentración de saturación de oxígeno en las condiciones de la reacción de hidrólisis, más preferiblemente como máximo 0,12 moles/m^3, aún más preferiblemente como máximo 0,09 moles/m^3, aún más preferiblemente como máximo 0,06 moles/m^3, aún más preferiblemente todavía como máximo 0,045 moles/m^3, y lo más preferible, como máximo 0,03 moles/m^3. La temperatura y presión influirán en la DO. Los valores preferidos y ejemplares en mol/m^3 dados anteriormente se refieren a presión atmosférica normal y una temperatura de aproximadamente 62ºC. El experto en la técnica apreciará valores de DO favorables en base a las presentes enseñanzas.

De acuerdo con otra modalidad preferida de la invención, el reactor para la hidrólisis enzimática tiene un volumen de 1 m^3 o más. El tiempo de hidrólisis enzimática del presente procedimiento es preferiblemente de 5 a 150 horas. De acuerdo con un aspecto preferido adicional de la invención, la composición de enzima deriva de un hongo, preferiblemente un microorganismo del género *Rasamsonia*, o la composición de enzima comprende una enzima fúngica, preferiblemente una enzima *Rasamsonia*. De acuerdo con todavía otro aspecto preferido de la invención, el contenido de materia seca en la etapa de hidrólisis es 10% en peso o más, preferiblemente es 14% en peso o más, y aún más preferiblemente es 14 a 33% en peso. La hidrólisis enzimática tiene lugar preferiblemente en un reactor de cultivo discontinuo, de alimentación por lotes y/o continuo. Preferiblemente, el oxígeno que se introduce en el presente procedimiento es un gas que contiene oxígeno, tal como aire. Por "menos oxígeno se añade a o está presente en el material lignocelulósico durante parte del tiempo de la hidrólisis enzimática" se quiere decir que se introduce o está presente al menos 50% menos, preferiblemente al menos 70% menos, lo más preferible al menos 90% menos de oxígeno (expresado en mol de oxígeno/m^3), por ejemplo en forma de burbujas, que el que se añade o está presente durante la otra parte del tiempo de la hidrólisis enzimática en la que se añade menos oxígeno.

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

Sorprendentemente, de acuerdo con la invención, mediante la adición de oxígeno es posible conseguir muchas ventajas de procedimiento, incluyendo condiciones de temperatura óptimas, tiempo de procedimiento reducido, dosificación reducida de enzima, reutilización de enzimas, mayores rendimientos y otras optimizaciones de procedimiento, que dan como resultando costes reducidos.

En una realización, la composición de enzima estable usada retiene actividad durante 30 horas o más. De acuerdo con una realización adicional, la hidrólisis se realiza preferiblemente a una temperatura de 40ºC o más, más preferiblemente a una temperatura de 50ºC o más, y lo más preferible, a una temperatura de 55ºC o más. El procedimiento de la invención se ilustrará con más detalle a continuación.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1: El efecto de burbujear nitrógeno o aire a través de una materia prima de aCS al 10% antes de la hidrólisis, sobre la cantidad total de glucosa (g/l) liberada por la mezcla TEC-210 (1), la mezcla 4E-GH61 (2) y la mezcla 4E-EG (3).
Fig. 2: La glucosa producida en el Ejemplo 2, 1 = Experimento 1: sin aireación, 2 = Experimento 2: aireación continua, 3 = Experimento 3: aireación que empieza a las 72 horas hasta el final.
Fig. 3: El efecto del tiempo de aireación sobre la glucosa producida durante la hidrólisis enzimática, - - = sin aireación, ••• = la aireación entre el tiempo de hidrólisis es 0 y 100 horas, - - - la aireación entre el tiempo de hidrólisis es 0 y 7 horas, y - - - = la aireación entre el tiempo de hidrólisis es 72 y 100 horas.
Fig. 4: El efecto del tiempo de aireación sobre la glucosa producida durante la hidrólisis enzimática en el experimento 1 (■ = la aireación entre el tiempo de hidrólisis es 0 y 100 horas) y 2 (□ = la aireación entre el tiempo de hidrólisis es 72 y 100 horas).
Fig. 5: El efecto del tiempo de aireación sobre la glucosa producida durante la hidrólisis enzimática, -■- la aireación entre el tiempo de hidrólisis es 72 y 100 horas, y -•- la aireación entre el tiempo de hidrólisis es 0 y 7 horas.

Descripción detallada

A lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones adjuntas, los términos "comprender" e "incluir", y variaciones tales como "comprende", "que comprende", "incluye" e "que incluye", deben interpretarse de manera inclusiva. Es decir, estos términos están destinados a transmitir la posible inclusión de otros elementos o números enteros no citados específicamente, cuando el contexto lo permita. Los artículos "un" y "una" se usan aquí para hacer referencia a uno o a más de uno (es decir, a uno o al menos uno) del objeto gramatical del articulo. A modo de ejemplo, "un elemento" puede significar un elemento o más de un elemento.

En el contexto de la presente invención, "mejorado", "aumentado", "reducido" se usan para indicar que la presente invención muestra una ventaja en comparación con la misma situación, procedimiento o condiciones de procedimiento, excepto que no se añade oxígeno extra. Dentro del contexto de la presente invención "medido en las mismas condiciones" o "analizado en las mismas condiciones", etc., significa que el procedimiento de la invención y el mismo procedimiento sin (o con menos) adición de oxígeno se realizan en las mismas condiciones (excepto por la adición de oxígeno), y que los resultados del presente procedimiento, si se compara con el procedimiento sin (o con menos) adición de oxígeno, se

miden usando las mismas condiciones, preferiblemente usando el mismo ensayo y/o metodología, más preferiblemente dentro del mismo experimento o de uno paralelo. Las condiciones de la hidrólisis 50 son un ejemplo de tales condiciones.

En la técnica anterior se sugiere mejorar la hidrólisis del material celulolítico usando condiciones anaerobias (documento WO2010/080407) o vacío (documento WO2009/046538) durante la hidrólisis enzimática. En los procedimientos de ambos documentos, el nivel de oxígeno se disminuyó. Se ha encontrado sorprendentemente que la hidrólisis de la presente invención muestra resultados en un producto de reacción mejorado que da mayores 55 cantidades de productos de azúcar (reducidos) y/o productos de fermentación deseados en la fermentación tras la hidrólisis en comparación con un procedimiento en el que no se añade oxígeno. En general, se observa un aumento de la conversión de glucosa de 5 a 15% p/p, o incluso hasta 25% p/p.

Puede añadirse oxígeno de varias maneras. Por ejemplo, puede añadirse oxígeno como gas de oxígeno, gas enriquecido con oxígeno, tal como aire enriquecido con oxígeno, o aire (un ejemplo de gas que contiene oxígeno). El oxígeno puede añadirse de forma continua o discontinua. Por la expresión “se añade oxígeno” se entiende que el oxígeno se añade a la fase líquida (que comprende el material lignocelulósico) en el reactor de hidrólisis, y no que el oxígeno está presente en el espacio de cabeza en el reactor por encima de la fase líquida (en combinación con una agitación lenta o inexistente), con lo que el oxígeno tiene que difundirse desde el espacio de cabeza hasta la fase líquida. Así, preferiblemente, el oxígeno se añade como burbujas, lo más preferible como pequeñas burbujas.

En el caso de que la enzima pueda dañarse por la presencia o adición de oxígeno, se puede usar un suministro de oxígeno más moderado. En ese caso, puede encontrarse un equilibrio entre la producción mejorada de glucosa y el comportamiento enzimático. La adición del oxígeno al material celulolítico puede realizarse durante la hidrólisis enzimática. En el caso de que se añada oxígeno en forma gaseosa, puede introducirse un gas que contiene oxígeno, por ejemplo, soplarse, en los contenidos líquidos del reactor de hidrólisis del material celulolítico. En otra realización de la invención, el gas que contiene oxígeno se introduce en la corriente líquida de material celulolítico que entrará en el reactor de hidrólisis. En otra realización más de la invención, el gas que contiene oxígeno se introduce junto con el material celulolítico que entra en el reactor de hidrólisis, o con parte de los contenidos líquidos del reactor que pasan por un bucle externo del reactor. En la mayoría de los casos, la adición de oxígeno antes de entrar en el reactor de hidrólisis no es suficiente, y la adición de oxígeno puede realizarse también durante la hidrólisis. En otra realización de la invención, la fase gaseosa presente en la parte superior del reactor (espacio de cabeza) se renueva continua o discontinuamente con el gas que contiene oxígeno. En el último caso, es necesaria un mezclamiento o agitación (vigorosa) para conseguir que el oxígeno en forma de burbujas y/o por difusión alcance los contenidos líquidos del reactor, preferiblemente en combinación con sobrepresión en el reactor. En general, el lavado del espacio de cabeza con aire, en combinación con mezclamiento o agitación (vigorosa), puede introducir oxígeno suficiente en el material celulósico en el reactor de hidrólisis para reactores hasta un tamaño de 100 litros a 1 m^3. A una mayor escala, por ejemplo en un reactor de 50 m^3 o más, por ejemplo 100 m^3, se necesita tanta energía para la agitación vigorosa que desde un punto de vista económico esto no se aplicará en un procedimiento que funcione a nivel comercial.

De acuerdo con la presente invención, el oxígeno puede añadirse durante parte de la etapa de hidrólisis. La adición de oxígeno durante solo parte de la hidrólisis puede realizarse, por ejemplo, en el caso de que ocurra daño por oxidación de la enzima o enzimas. En el caso de que el oxígeno presente en los contenidos del reactor de hidrólisis o el producto de azúcar o el hidrolizado formado en la etapa de hidrólisis pueda influir o alterar la etapa de fermentación posterior, la adición de oxígeno puede realizarse, excepto durante la última parte de la hidrólisis, y de esta manera (la mayor parte de) el oxígeno se consume antes de que la biomasa hidrolizada entre en el reactor de fermentación. Ventajosamente, el oxígeno, preferiblemente en forma de burbujas (gaseoso), se añade en la última parte de la etapa de hidrólisis.

Los inventores plantearon la hipótesis de que en la primera parte de la (etapa de) hidrólisis (enzimática) los polisacáridos amorfos se hidrolizan a azúcares, tales como glucosa, y que en la segunda parte de la etapa de hidrólisis los polisacáridos cristalinos restantes se convierten en azúcares. Los polisacáridos amorfos se convierten por ejemplo en oligosacáridos por endoglucanasas, tras lo cual los oligosacáridos pueden convertirse por celobiohidrolasa y beta-glucosidasa (BG) en azúcares. De acuerdo con la presente hipótesis, los polisacáridos amorfos están localizados en el exterior de los polisacáridos o complejos de polisacárido, mientras que los polisacáridos cristalinos están localizados relativamente más en el interior de los polisacáridos o complejos de polisacárido presentes en el material lignocelulósico. Así, la conversión de los polisacáridos cristalinos puede continuar incluso cuando la mayor parte de los polipéptidos amorfos se hidroliza. Especialmente, la adición de oxígeno es beneficiosa durante la hidrólisis de los polisacáridos cristalinos, por ejemplo en la degradación de los polisacáridos en oligosacáridos. De acuerdo con esta hipótesis, la adición de oxígeno es especialmente útil en la segunda parte de la etapa de hidrólisis. En general, es necesario un tiempo más corto de adición de oxígeno (o una segunda parte de hidrólisis más corta) en el caso de cantidades relativamente bajas de polisacáridos cristalinos en el material lignocelulósico en comparación con la hidrólisis de un material lignocelulósico en el que están presentes cantidades relativamente mayores de polisacáridos cristalinos. Los inventores han planteado también que la adición de oxígeno es beneficiosa para la hidrólisis de polisacáridos cristalinos. Por lo tanto, la adición de oxígeno es muy útil, especialmente en la fase en la que los polisacáridos cristalinos son atacados por las enzimas. Fuera de esta fase, la no adición de oxígeno podría ser más eficaz. Por lo tanto, el suministro de oxígeno puede comenzar solo en la segunda parte o segunda mitad de la hidrólisis. Al final de la hidrólisis, cuando la mayor parte de los polisacáridos cristalinos se han degradado, preferiblemente se detiene la adición de oxígeno. En la última parte de la segunda parte o segunda mitad de la hidrólisis, la mayor parte de los polisacáridos se convierte en oligosacáridos que, durante una ruptura adicional en

azúcares más pequeños, no necesitan oxígeno nunca más. Por lo tanto, al final del procedimiento de hidrólisis se añade preferiblemente menos oxígeno al material lignocelulósico, comparado con la adición de oxígeno durante la parte aireada del tiempo, o más preferiblemente, al final del procedimiento de hidrólisis no se añade oxígeno al material lignocelulósico. Esta hipótesis solo se da como posible explicación del efecto observado por los inventores, y la presente invención no confirma ni desmiente la exactitud de esta teoría.

Los inventores también han observado que la aireación durante un procedimiento de hidrólisis enzimática al comienzo del procedimiento de hidrólisis da como resultado una mayor producción de glucosa durante la hidrólisis.

En la Figura 3 se muestra el efecto de la aireación. En comparación con la hidrólisis no aireada (mostrada como curva "no aireada"), una aireación al comienzo del procedimiento de hidrólisis (mostrada como curva de "aireación 0-7 horas") dará como resultado un aumento inmediato en la producción de glucosa, y por ejemplo, ya después de 24 horas de hidrólisis se encontrará una producción de glucosa que corresponde a una producción de glucosa sin aireación de 60 horas de hidrólisis en condiciones idénticas (excepto por la aireación). En comparación con la hidrólisis no aireada, una aireación de la última parte del procedimiento de hidrólisis (mostrada como curva de "aireación 72-100 horas") dará como resultado un aumento inmediato en la producción de glucosa después de la aireación, y por ejemplo, ya después de 24 horas después del comienzo de la aireación (a las 72 horas) en el procedimiento de hidrólisis, se encontrará un aumento de la producción de glucosa del 30% en comparación con la producción de glucosa sin aireación en condiciones idénticas (excepto por la aireación). Los inventores creen que usando una aireación al principio, así como en la última parte, del procedimiento de hidrólisis (con un periodo sin aireación entre intervalos de aireación) podría aumentar la producción de glucosa, con lo que esto da como resultado un aumento de la producción de glucosa que es mayor que cada uno de los dos aumentos por separado. La presente explicación se da para guiar e instruir al experto en la técnica a seleccionar las condiciones apropiadas para el presente procedimiento de hidrólisis.

En los Ejemplos se dan varios ejemplos de aireación parcial durante el procedimiento de hidrólisis enzimática, para mostrar el efecto beneficioso de la presente invención. Este efecto beneficioso se encuentra para varios sustratos o materias primas, y por lo tanto, se cree que está presente para la hidrólisis de toda clase de sustratos o materias primas.

En los Ejemplos se dan varios ejemplos de composiciones de enzima para el procedimiento de hidrólisis enzimática, para mostrar el efecto beneficioso de la presente invención. Este efecto beneficioso se encuentra para varias composiciones de enzima y, por lo tanto, se cree que está presente para toda clase de composiciones de enzima de hidrólisis.

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

A una realización preferida adicional de la invención durante la parte del tiempo en la que la adición de oxígeno tiene lugar en la fase líquida (por aireación o adición de oxígeno), la concentración de oxígeno (DO) en la fase líquida en la que el material lignocelulósico está presente durante la hidrólisis enzimática, es por ejemplo más de 0,02 mol/m^3 o 0,03 mol/m^3. En los reactores de menos de 1 m^3 se obtendrán valores de DO por debajo de 0,01 mol/m^3 o 0,02 mol/m^3 por agitación lenta. El mezclamiento o agitación vigorosa a tal escala introduce parte de la fase gaseosa del espacio de cabeza en el líquido de reacción. Por ejemplo, el mezclamiento o agitación pueden crear un remolino que arrastra el oxígeno hacia el líquido. En general, el lavado del espacio de cabeza con aire, en combinación con mezclamiento o agitación (vigorosa), introducirá oxígeno suficiente en el material celulósico en el reactor de hidrólisis para reactores hasta un tamaño de 100 litros a 1 m^3. A una mayor escala, por ejemplo, en un reactor de 50 m^3 o más, por ejemplo 100 m^3, se necesita tanta energía para la agitación vigorosa que desde un punto de vista económico esto no se aplicará en un procedimiento que funcione a nivel comercial. En general, en reactores más grandes, la agitación o mezclamiento sin introducción de aire u oxígeno dará como resultado valores de DO de menos de 0,01 mol/m^3.

En otra realización preferida adicional de la invención, durante la generación o producción de oxígeno, la concentración de oxígeno en la fase líquida (aireación o adición de oxígeno), la concentración de oxígeno en la fase líquida en la que el material lignocelulósico está presente durante la hidrólisis enzimática es durante la parte del tiempo en la que el oxígeno se añade preferiblemente como máximo al 80% de la concentración de saturación del oxígeno en las condiciones de la reacción de hidrólisis, más preferiblemente como máximo 0,12 mol/m^3, aún más preferiblemente como máximo 0,09 mol/m^3, aún más preferiblemente como máximo 0,06 mol/m^3, aún más preferiblemente como máximo 0,045 mol/m^3, y lo más preferible como máximo 0,03 mol/m^3. La temperatura y presión influirán en la DO. Los valores preferidos y ejemplares en mol/m^3 dados anteriormente se refieren a presión atmosférica normal y una temperatura de aproximadamente 62ºC. El experto en la técnica apreciará valores de DO favorables en base a las presentes enseñanzas.

En una realización preferida adicional de la invención, la concentración de oxígeno en la fase líquida, en la que el material lignocelulósico está presente durante la hidrólisis enzimática, es durante la parte de tiempo en la que menos o nada de

oxígeno se añade menos de 0,02 mol/m^3, preferiblemente menos de 0,01 mol/m^3, más preferiblemente menos de 0,005 mol/m^3, y lo más preferible menos de 0,001 mol/m^3.

La adición de oxígeno en forma de aire u otro gas que contiene oxígeno de acuerdo con el método de la invención puede usarse también para agitar o mezclar al menos parcialmente los contenidos del reactor de hidrólisis. El presente procedimiento de la invención muestra ventajas, especialmente a escala de planta piloto y escala industrial. Preferentemente, el reactor de hidrólisis tiene un volumen de 1 m^3 o más, preferiblemente de más de 10 m^3, y más preferiblemente de 50 m^3 o más. En general, el reactor de hidrólisis será más pequeño que 3000 m^3 o 5000 m^3. Los inventores plantean la teoría de que, especialmente a gran escala, no hay suficiente oxígeno disponible para la hidrólisis, lo que podría deberse a limitaciones de transferencia de oxígeno en el reactor, por ejemplo, en la biomasa celulolítica. En experimentos a escala de laboratorio, esta insuficiencia de oxígeno puede desempeñar un papel menos importante. La relación del área superficial (o área de contacto con oxígeno del contenido del reactor) al volumen del reactor es más favorable para experimentos a pequeña escala que en experimentos a gran escala. Además, el mezclamiento en experimentos a pequeña escala es relativamente más fácil que a gran escala. Durante estos experimentos a pequeña escala, también el transporte de oxígeno desde el espacio de cabeza del reactor de hidrólisis es más rápido que en comparación con la situación en los experimentos a mayor escala. Esta teoría solo da una posible explicación del efecto observado por los inventores, y la presente invención no confirma ni desmiente la exactitud de esta teoría. De acuerdo con una realización adicional de la invención, la adición de oxígeno puede usarse para controlar al menos parcialmente el procedimiento de hidrólisis.

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

Una enzima “termoestable” significa que la enzima tiene una temperatura óptima de 60ºC o mayor, por ejemplo, 70ºC o mayor, tal como 75ºC o mayor, por ejemplo 80ºC o mayor, tal como 85ºC o mayor. Por ejemplo, pueden aislarse a partir de microorganismos termófilos o pueden diseñarse por el experto en la técnica y sintetizarse artificialmente. En una realización, los polinucleótidos pueden aislarse u obtenerse a partir de hongos filamentosos termófilos o termotolerantes, o aislarse a partir de hongos no termófilos o no termotolerantes pero que se sabe que son termoestables.

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

Los ejemplos de cepas de hongos termófilos son *Rasamsonia* emersonii (anteriormente conocido como *Talaromyces* emersonii; *Talaromyces emersonii, Penicillium geosmithia emersonii* y Rasamsonia emersonii se usan de forma intercambiable en este documento).

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

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

Rasamsonia es un nuevo género que comprende las especies *Talaromyces* y *Geosmithia* termotolerantes y termófilas (J. Houbraken et al, véase más arriba). Basándose en datos fenotípicos, fisiológicos y moleculares, Houbraken et al.

propusieron transferir las especies *T. emersonii, T. byssochlamydoides, T. eburneus, G. argillacea* y *G.* cylindrospora a *Rasamsonia* gen. nov. *Talaromyces emersonii, Penicillium geosmithia emersonii* y *Rasamsonia emersonii* se usan de forma intercambiable aquí.

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

"Hongos filamentosos" incluye 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, UK). Los hongos filamentosos se caracterizan por una pared micelial compuesta de quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por elongación de las hifas, y el catabolismo de carbono es obligatoriamente aerobio. Las cepas fúngicas filamentosas incluyen, aunque sin limitación, las cepas de *Acremonium, Agaricus, Aspergillus, Aureobasidium, Chrysosporium, Coprinus, Cryptococcus, Filibasidium, Fusarium, Geosmithia, Humicola, Magnaporthe, Mucor, Myceliophthora, Neocallimastix, Neurospora, Paecilomyces, Penicillium, Piromyces, Panerochaete, Pleurotus, Rasamsonia, Schizophyllum, Talaromyces, Thermoascus, Thermomyces, Thielavia, Tolypocladium,* y *Trichoderma.*

Varias cepas de hongos filamentosos son fácilmente accesibles al público en un número de colecciones de cultivos, tales como American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL). Los ejemplos de tales cepas incluyen *Aspergillus niger* CBS 513.88, *Aspergillus oryzae* ATCC 20423, IFO 4177, ATCC 1011, ATCC 9576, ATCC14488-14491, ATCC 11601, ATCC12892, *P. chrysogenum* CBS 455.95, *Penicillium citrinum* ATCC 38065, *Penicillium chrysogenum* P2, *Talaromyces emersonii* CBS 393.64, *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225 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.*

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

De acuerdo con la invención, mediante la adición de oxígeno es posible conseguir muchas ventajas de procedimiento, incluyendo condiciones de temperatura óptimas, tiempo de procedimiento reducido, dosificación de enzima reducida, reutilización de enzimas y otras optimizaciones de procedimiento, que dan como resultado costes reducidos. Ventajosamente, la invención proporciona un procedimiento en el que la etapa de hidrólisis se realiza en condiciones mejoradas. La invención proporciona también un procedimiento que implica la hidrólisis que tiene un tiempo de procedimiento reducido. Adicionalmente, la invención proporciona un procedimiento, en el que la dosificación de enzima puede reducirse y al mismo tiempo la producción de un producto de hidrólisis útil se mantiene al mismo nivel. Otra ventaja de la invención es que el presente procedimiento que implica hidrólisis puede dar como resultado condiciones de procedimiento que están optimizadas. Una ventaja adicional de la invención es que la producción de un producto de hidrólisis útil del procedimiento que implica la hidrólisis aumenta usando la misma dosificación de enzima.

Composición de enzima estable

Composición de enzima estable significa aquí que la composición de enzima retiene su actividad después de 30 horas de tiempo de reacción de hidrólisis, preferiblemente al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de su actividad inicial después de 30 horas de tiempo de reacción de hidrólisis. Preferiblemente, la composición 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.

La composición de enzima puede prepararse por fermentación de un sustrato adecuado con un microorganismo adecuado, por ejemplo *Rasamsonia emersonii* o *Aspergillus niger*, en el que el microorganismo produce la composición de enzima. El microorganismo puede alterarse para mejorar o crear la composición de celulasa. Por ejemplo, el microorganismo puede mutar por procedimientos de mejora de cepa clásicos o por técnicas de ADN recombinante. Por lo tanto, los microorganismos mencionados aquí pueden usarse como tales para producir la composición de celulasa, o pueden alterarse para aumentar la producción o producir una composición de celulasa alterada que podría incluir celulasas heterólogas, y por tanto enzimas que no se producen originalmente por ese microorganismo. Preferiblemente, se usa un hongo, más preferiblemente un hongo filamentoso, para producir la composición de celulasa. Ventajosamente, se usa un microorganismo termófilo o termotolerante. Opcionalmente, se usa un sustrato que induce la expresión de las enzimas en la composición de enzima durante la producción de la composición de enzima.

La composición de enzima se usa para liberar azúcares a partir de lignocelulosa, que comprende polisacáridos. Los polisacáridos principales son celulosa (glucanos), hemicelulosas (xilanos, heteroxilanos y xiloglucanos). Además, algo de hemicelulosa puede estar presente en forma de glucomananos, por ejemplo en materias primas derivadas de la madera. La hidrólisis enzimática de estos polisacáridos a azúcares solubles, incluyendo tanto monómeros como multímeros, por

ejemplo glucosa, celobiosa, xilosa, arabinosa, galactosa, fructosa, manosa, ramnosa, ribosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico y otras hexosas y pentosas ocurre bajo la acción de diferentes enzimas que actúan de forma concertada. Por producto de azúcar se entiende el producto de hidrólisis enzimática de la materia prima o material lignocelulósico. El producto de azúcar comprenderá azúcares solubles, incluyendo tanto monómeros como multímeros, preferiblemente comprenderá 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 puede usarse como tal o puede procesarse adicionalmente, por ejemplo purificarse.

Además, las pectinas y otras sustancias pécticas tales como arabinanos pueden constituir una proporción considerable de la materia seca de típicamente paredes celulares a partir de tejidos vegetales distintos de madera (aproximadamente de un cuarto a la mitad de materia seca pueden ser pectinas).

La celulosa es un polisacárido lineal compuesto de restos de glucosa unidos mediante enlaces β-1,4. La naturaleza lineal de las fibras de celulosa, así como la estequiometría de la glucosa unida mediante β (respecto a α), genera estructuras más susceptibles a entremezclarse con enlaces de hidrógeno que las estructuras unidas mediante α altamente ramificadas del almidón. De esta manera, los polímeros de celulosa son generalmente menos solubles, y forman fibras unidas más fuertemente que las fibras encontradas en el almidón.

Las enzimas que pueden incluirse en la composición de enzima estable usada en la invención se describen ahora con más detalle: GH61, endoglucanasas (EG) y exo-celobiohidrolasas (CBH) catalizan la hidrólisis de celulosa insoluble a productos tales como celooligosacáridos (celobiosa como producto principal), mientras que las β-glucosidasas (BG) convierten los oligosacáridos, principalmente celobiosa y celotriosa, en glucosa.

La hemicelulosa es un polímero complejo, y su composición a menudo varía ampliamente de un organismo a otro y de un tipo de tejido a otro. En general, un componente principal de la hemicelulosa es la xilosa con uniones β-1,4, un azúcar de cinco carbonos. Sin embargo, esta xilosa a menudo está ramificada en 0 a 3 y/o 0 a 2 átomos de xilosa, y puede estar sustituida con uniones a arabinosa, galactosa, manosa, ácido glucurónico, ácido galacturónico, o por esterificación a ácido acético (y esterificación de ácido ferúlico a arabinosa). La hemicelulosa puede contener también glucano, que es un término general para los azúcares de seis carbonos con unión β (tal como los glucanos β-(1,3)(1,4) y heteroglucanos mencionados anteriormente), y adicionalmente glucomananos (en los que están presentes tanto glucosa como manosa en la cadena principal lineal, unidas entre sí mediante uniones β).

Las xilanasas, junto con otras enzimas añadidas, por ejemplo α-L-arabinofuranosidasas, feruloil y acetilxilan esterasas, glucuronidasas y β-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 de la planta. Se acumulan alrededor de una cadena central de unidades de ácido D-galacturónico unidas α(1,4) entremezcladas en algún grado con L-ramnosa. En cualquier pared celular, hay un número de unidades estructurales que se ajustan a esta descripción, y generalmente se ha considerado que, en una única molécula péctica, las cadenas centrales de diferentes unidades estructurales son continuas entre sí.

Los principales tipos de unidad estructural son: galacturonano (homogalacturonano), que puede estar sustituido 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 portan cadenas laterales de galactano unido (1,4) y arabinano unido (1,5). Las cadenas laterales de arabinano pueden fijarse directa o indirectamente a ramnosa a través de las cadenas de galactano; xilogalacturonano, con unidades de xilosilo individuales en O-3 del ácido galacturónico (muy relacionado con RGI); y ramnogalacturonano II (RGII), una unidad minoritaria particularmente compleja que contiene azúcares poco habituales, por ejemplo apiosa. Una unidad de RGII puede contener dos restos apiosilo que, en las condiciones iónicas adecuadas, pueden formar reversiblemente ésteres con borato.

Una composición para uso en un método de la invención comprende al menos dos actividades y comprende al menos GH61, aunque típicamente una composición comprenderá más de dos actividades, por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más. Habitualmente, una composición para uso en el método de la invención comprende al menos dos celulasas diferentes, siendo una de las cuales una GH61, y, puede comprender al menos una hemicelulasa.

Una composición para uso en el método de la invención no puede comprender xilanasas. Además, una composición para uso en el método de la invención puede comprender actividad enzimática auxiliar, es decir, actividad adicional que, ya sea directa o indirectamente, conduce a la degradación de la lignocelulosa. Los ejemplos de tales actividades auxiliares se mencionan aquí.

De esta manera, una composición para uso en la invención comprende GH61, y puede comprender actividad de endoglucanasa y/o actividad de celobiohidrolasa y/o actividad de β-glucosidasa. Una composición para uso en la invención puede comprender más de una actividad enzimática en una o más de esas clases. Por ejemplo, una composición para uso en la invención puede comprender dos actividades de endoglucanasa, por ejemplo actividad de endo-1,3(1,4)-β glucanasa y actividad de endo-β-1,4-glucanasa. Tal composición puede comprender también una o más actividades de xilanasa. Tal composición puede comprender una actividad enzimática auxiliar.

Una composición para uso en el método de la invención se puede derivar de *Rasamsonia* emersonii. En la invención, se anticipa que un conjunto central de actividades enzimáticas (degradantes de lignocelulosa) puede derivarse de *Rasamsonia* emersonii. *Rasamsonia* emersonii puede proporcionar un conjunto muy eficaz de actividades como se demuestra aquí para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica. Esta actividad puede complementarse entonces con actividades enzimáticas adicionales de otras fuentes. Tales actividades adicionales pueden derivarse de fuentes clásicas y/o producirse por un organismo modificado genéticamente.

Las actividades en una composición para uso en la invención pueden ser termoestables. Aquí, esto significa que la actividad tiene un óptimo de temperatura de aproximadamente 60ºC o mayor, por ejemplo aproximadamente 70ºC o mayor, tal como aproximadamente 75ºC o mayor, por ejemplo aproximadamente 80ºC o mayor, tal como 85ºC o mayor. Las actividades en una composición para uso en la invención típicamente no tendrán los mismos óptimos de temperatura, sino que preferiblemente no obstante serán termoestables.

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

Las actividades en una composición para uso en la invención pueden definirse por una combinación de cualquiera de los valores anteriores de óptimos de temperatura y pH.

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

Una composición para uso en la invención comprende al menos dos celulasas; puede comprender una, dos, tres, cuatro clases o más de celulasa, por ejemplo una, dos, tres o cuatro o todas de una GH61, una endoglucanasa (EG), una o dos exo-celobiohidrolasa (CBH) y una β-glucosidasa (BG). Una composición para uso en la invención puede comprender dos o más de cualquiera de estas clases de celulasa.

Una composición para uso en el método de la invención puede comprender una actividad que tiene un tipo diferente de actividad de celulasa y/o actividad de hemicelulasa y/o actividad de pectinasa que la proporcionada por la composición para uso en un método de la invención. Por ejemplo, una composición para uso en el método en la invención puede comprender un tipo de actividad de celulasa y/o de hemicelulasa y/o actividad de pectinasa proporcionada por una composición como se describe aquí, y un segundo tipo de actividad de celulasa y/o de hemicelulasa y/o actividad de pectinasa proporcionada por una celulasa/hemicelulasa/pectinasa adicional.

Aquí, una celulasa es cualquier polipéptido que es capaz de degradar o modificar la celulosa. Un polipéptido que es capaz de degradar la celulosa es aquel que es capaz de catalizar el procedimiento de degradar la celulosa en unidades más pequeñas ya sea parcialmente, por ejemplo en celodextrinas, o completamente en monómeros de glucosa. Una celulasa puede dar lugar a una población mixta de celodextrinas y monómeros de glucosa cuando se pone en contacto con la celulasa. Tal degradación tendrá lugar típicamente mediante una reacción de hidrólisis.

Las proteínas GH61 (familia 61 de glucósido hidrolasas, o en ocasiones denominada EGIV) son polisacárido monooxigenasas (PMO) dependientes de oxígeno de acuerdo con la bibliografía más reciente. A menudo, en la bibliografía se menciona que estas proteínas potencian la acción de las celulasas sobre los sustratos de lignocelulosa. GH61 originalmente se clasificó como una endoglucanasa basándose en la medida de una actividad de endo-1,4-β-d-glucanasa muy débil en un miembro de la familia. El término “GH61”, como se usa aquí, debe entenderse como una familia de enzimas que comparten porciones de secuencia conservada y pliegues comunes para poder clasificarlas en la familia 61 del sistema de clasificación bien establecido CAZY GH (http://www.cazy.org/GH61.html). La familia 61 de glucósido hidrolasas es un miembro de la familia de las glucósido hidrolasas EC 3.2.1. GH61 se usa aquí como parte de las celulasas.

Aquí, una hemicelulasa es cualquier polipéptido que es capaz de degradar o modificar hemicelulosa. Es decir, una hemicelulasa puede ser capaz de degradar o modificar uno o más de xilano, glucuronoxilano, arabinoxilano, glucomanano y xiloglucano. Un polipéptido que es capaz de degradar una hemicelulosa es aquel que es capaz de catalizar el procedimiento de ruptura de la hemicelulosa en polisacáridos más pequeños, ya sea parcialmente, por ejemplo en oligosacáridos, o completamente, en monómeros de azúcar, por ejemplo monómeros de azúcar hexosa o pentosa. Una hemicelulasa puede dar lugar a una población mixta de oligosacáridos y monómeros de azúcar cuando se pone en contacto con la hemicelulasa. Tal degradación tendrá lugar típicamente mediante una reacción de hidrólisis.

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

Por consiguiente, una composición para uso en la invención puede comprender cualquier celulasa, pero al menos una GH61, una celobiohidrolasa, una endo-β-1,4-glucanasa, una β-glucosidasa o una β(1,3)(1,4)-glucanasa.

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

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

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

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

Una composición para uso en el método en la invención puede comprender cualquier hemicelulasa, por ejemplo una endoxilanasa, 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.

Aquí, una endoxilanasa (EC 3.2.1.8) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la endohidrólisis de las uniones 1,4-β-D-xilosídicas en xilanos. Esta enzima puede denominarse también endo-1,4-β-xilanasa o 1,4-β-D-xilano xilanohidrolasa. Una alternativa es EC 3.2.1.136, una glucuronoarabinoxilano endoxilanasa, una enzima que es capaz de hidrolizar las uniones 1,4 xilosídicas en los glucuronoarabinoxilanos.

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

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

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

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

Aquí, una feruloil esterasa (EC 3.1.1.73) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar una reacción de la forma: feruloil-sacárido + H2O = ferulato + sacárido. El sacárido puede ser, por ejemplo, un oligosacárido o un polisacárido. Típicamente puede catalizar la hidrólisis del grupo 4-hidroxi-3-metoxicinamoílo (feruloílo) a partir de un azúcar esterificado, que normalmente es arabinosa en sustratos "naturales". El acetato de p-nitrofenol y ferulato de metilo típicamente son sustratos más pobres. Esta enzima también puede denominarse cinamoil éster hidrolasa, esterasa de ácido ferúlico o hidroxicinamoil esterasa. Puede denominarse también enzima auxiliar de hemicelulasa, puesto que puede ayudar a las xilanasas y pectinasas a romper hemicelulosa y pectina de la pared celular vegetal.

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

Aquí, una α-galactosidasa (EC 3.2.1.22) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de restos de α-D-galactosa no reductores, terminales, en α-D-galactósidos, incluyendo oligosacáridos de galactosa, galactomananos, galactanos y arabinogalactanos. Tal polipéptido puede ser capaz también de hidrolizar α-D-fucósidos. Esta enzima puede denominarse también melibiasa.

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

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

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

Una composición para uso en el método de la invención puede comprender cualquier pectinasa, por ejemplo una endo poligalacturonasa, una pectina metil esterasa, una endo-galactanasa, una beta galactosidasa, una peptina acetil esterasa, una endo-pectina liasa, pectato liasa, alfa ramnosidasa, una exo-galacturonasa, una expoligalacturonato liasa, una ramnogalacturonano hidrolasa, una ramnogalacturonano liasa, una ramnogalacturonano acetil esterasa, una ramnogalacturonano galacturonohidrolasa, una xilogalacturonasa.

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

Aquí, una pectina metil esterasa (EC 3.1.1.11) es cualquier enzima que es capaz de catalizar la reacción: pectina + n H2O = n metanol + pectato. La enzima puede conocerse también como pectinesterasa, pectina desmetoxilasa, pectina metoxilasa, pectina metilesterasa, pectasa, pectinoesterasa o pectina pectilhidrolasa.

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

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

Aquí, una endo-pectina liasa (EC 4.2.2.10) es cualquier enzima capaz de catalizar la escisión eliminativa de (1→4)-α-D-galacturonano metil éster para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi-6-O-metil-α-D-galact-4-enuronosílicos en sus extremos no reductores. La enzima puede conocerse también como pectina liasa, pectina trans-eliminasa; endo-pectina liasa, polimetilgalacturónico transeliminasa, pectina metiltranseliminasa, pectoliasa, PL, PNL o PMGL o (1→4)-6-O-metil-α-D-galacturonano liasa.

Aquí, una pectato liasa (EC 4.2.2.2) es cualquier enzima capaz de catalizar la escisión eliminativa de (1→4)-α-D-galacturonano para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi-α-D-galact-4-enuronosílicos en sus extremos no reductores. La enzima puede conocerse también como poligalacturónico transeliminasa, transeliminasa de ácido péctico, poligalacturonato liasa, endopectina metiltranseliminasa, pectato transeliminasa, endogalacturonato transeliminasa, liasa de ácido péctico, liasa péctica, liasa de ácido α-1,4-D-endopoligalacturónico, PGA liasa, PPasa-N, liasa del ácido endo-α-1,4-poligalacturónico, liasa del ácido poligalacturónico, pectina trans-eliminasa, *trans*-eliminasa del ácido poligalacturónico o (1→4)-α-D-galacturonano liasa.

Aquí, una alfa-ramnosidasa (EC 3.2.1.40) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de restos de α-L-ramnosa no reductores terminales en α-L-ramnósidos o, como alternativa, en ramnogalacturonanos. Esta enzima puede conocerse también como α-L-ramnosidasa T, α-L-ramnosidasa N o α-L-ramnósido ramnohidrolasa.

Aquí, la exo-galacturonasa (EC 3.2.1.82) es cualquier polipéptido capaz de hidrolizar ácido péctico a partir del extremo no reductor, liberando digalacturonato. La enzima puede conocerse también como exo-poli-α-galacturonosidasa, exopoligalacturonosidasa o exopoligalacturanosidasa.

Aquí, la exo-galacturonasa (EC 3.2.1.67) es cualquier polipéptido capaz de catalizar: (1,4-α-D-galacturónido)$_n$ + H_2O = (1,4-α-D-galacturónido)n-1 + D-galacturonato. La enzima puede conocerse también como galacturano 1,4-α-galacturonidasa, exopoligalacturonasa, poli(galacturonato) hidrolasa, exo-D-galacturonasa, exo-D-galacturonanasa, exopoli-D-galacturonasa o poli(1,4-α-D-galacturónido) galacturonohidrolasa.

Aquí, la exopoligalacturonato liasa (EC 4.2.2.9) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la escisión eliminativa de 4-(4-desoxi-α-D-galact-4-enuronosil)-D-galacturonato del extremo reductor de pectato, es decir, pectina desesterificada. Esta enzima puede conocerse como pectato disacárido-liasa, pectato exo-liasa, transeliminasa de ácido exopéctico, exopectato liasa, *trans*-eliminasa del ácido exopoligalacturónico, PATE, exo-PATE, exo-PGL o disacárido-liasa del extremo reductor de (1→4)-α-D-galacturonano.

Aquí, la ramnogalacturonano hidrolasa es cualquier polipéptido que es capaz de hidrolizar la unión entre ácido galactosilurónico y ramnopiranosilo de una manera endo en estructuras de ramnogalacturonano estrictamente alternas, que consiste en disacárido [ácido (1,2-alfa-L-ramnoil-(1,4)-alfa-galactosilurónico].

Aquí, ramnogalacturonano liasa es cualquier polipéptido que es cualquier polipéptido que es capaz de escindir las uniones α-L-Rha*p*-(1→4)-α-D-Gal*p*A de una manera endo en ramnogalacturonano por beta-eliminación.

Aquí, la ramnogalacturonano acetil esterasa es cualquier polipéptido que cataliza la desacetilación de la cadena principal de restos alternos de ramnosa y ácido galacturónico en ramnogalacturonano.

Aquí, la ramnogalacturonano galacturonohidrolasa es cualquier polipéptido que es capaz de hidrolizar el ácido galacturónico del extremo no reductor de estructuras de ramnogalacturonano estrictamente alternas de una manera exo.

Aquí, la xilogalacturonasa es cualquier polipéptido que actúa sobre xilogalacturonano por escisión de la cadena principal del ácido galacturónico sustituido con β-xilosa de una manera *endo*. Esta enzima también puede conocerse como xilogalacturonano hidrolasa.

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

Aquí, la endo-arabinanasa (EC 3.2.1.99) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la endohidrólisis de las uniones 1,5-α-arabinofuranosídicas en 1,5-arabinanos. La enzima puede conocerse también como endo-arabinasa, arabinano endo-1,5-α-L-arabinosidasa, endo-1,5-α-L-arabinanasa, endo-α-1,5-arabanasa; endo-arabanasa o 1,5-α-L-arabinano 1,5-α-L-arabinanohidrolasa.

Una composición para uso en el método de la invención comprende al menos dos celulasas, una de las cuales es una GH61, y puede comprender adicionalmente al menos una hemicelulasa y/o al menos una pectinasa. Una composición para uso en el método de la invención comprende un GH61 y puede comprender una celobiohidrolasa, una endoglucanasa y/o una p-glucosidasa. Tal composición puede comprender también una o más hemicelulasas y/o una o más pectinasas.

Además, una o más (por ejemplo dos, tres, cuatro o todas) de una amilasa, una proteasa, una lipasa, una ligninasa, una hexosiltransferasa, una glucuronidasa o una expansina o una proteína inducida por celulosa o una proteína que integra celulosa o una proteína similar pueden estar presentes en una composición para uso en el método de la invención (éstas se han denominado actividades auxiliares anteriormente).

Una “proteasa” incluye enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos (peptidasas), así como enzimas que hidrolizan enlaces entre péptidos y otros restos tales como azúcares (glucopeptidasas). Muchas proteasas se caracterizan según EC 3.4, y son adecuadas para uso en el método de la invención. Algunos tipos específicos de proteasas incluyen cisteína proteasas, que incluyen pepsina, papaína, y serina proteasas, que incluyen quimiotripsinas, carboxipeptidasas y metaloendopeptidasas.

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

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

Una “hexosiltransferasa” (2.4.1-) incluye enzimas que son capaces de catalizar una reacción de transferasa, pero que pueden catalizar también una reacción de hidrólisis, por ejemplo de celulosa y/o productos de degradación de celulosa. Un ejemplo de una hexosiltransferasa que puede usarse en la invención es una β-glucanosiltransferasa. Tal enzima puede ser capaz de catalizar la degradación de (1,3)(1,4)glucano y/o celulosa y/o un producto de degradación de celulosa.

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

Una composición para uso en la invención puede comprender una expansina o proteína similar a expansina, tal como swollenina (véase Salheimo et al., Eur. J. Biohem. 269, 4202-4211, 2002) o una proteína similar a swollenina.

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

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

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

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

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

En los usos y métodos descritos aquí, los componentes de las composiciones descritas anteriormente pueden proporcionarse simultáneamente (es decir, como una única composición per se) o por separado o secuencialmente.

Material lignocelulósico

El material lignocelulósico aquí incluye material lignocelulósico y/o hemicelulósico. El material lignocelulósico adecuado para uso como materia prima en la invención incluye biomasa, por ejemplo biomasa virgen y/o biomasa no virgen tal como biomasa agrícola, materia orgánica comercial, restos de construcción y demolición, restos sólidos urbanos, papel residual y restos de jardín. Las formas habituales de biomasa incluyen árboles, arbustos y céspedes, trigo, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, pasto varilla, miscanto, maíz, rastrojo de maíz, cascarillas de maíz, mazorcas de maíz, tallos de cánola, tallos de semilla de soja, sorgo dulce, granos de maíz, incluyendo fibras de los granos, productos y subproductos de molienda de granos tales como maíz, trigo y cebada (incluyendo molienda en húmedo y molienda en seco) a menudo denominados "salvado o fibra", así como restos sólidos urbanos, papel residual y restos de jardín. La biomasa puede ser también, aunque sin limitación, material herbáceo, restos agrícolas, restos forestales, restos sólidos urbanos, papel residual, y restos de pasta papelera y molienda de papel. La "biomasa agrícola" incluye ramas, arbustos, cañas, maíz y cascarillas de maíz, cultivos energéticos, arbolados, frutas, flores, granos, pastos, cultivos herbáceos, hojas, corteza, agujas, troncos, raíces, árboles jóvenes, cultivos madereros de rotación corta, arbustos, pasto varilla, árboles, hortalizas, mondaduras de frutas, vides, pasta de remolacha azucarera, 20 afrechillo de trigo, cascarillas de avena, y maderas duras y blandas (sin incluir maderas con materiales perjudiciales). Además, la biomasa agrícola incluye materiales residuales orgánicos generados a partir de procedimientos agrícolas incluyendo actividades agrícolas y forestales, incluyendo específicamente restos de madera forestal. La biomasa agrícola puede ser cualquiera de los mencionados anteriormente de forma individual o cualquier combinación o mezcla de los mismos.

Pretratamiento

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

Etapa de lavado

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

Hidrólisis enzimática

La composición de enzima usada en el procedimiento de la invención puede hidrolizar de forma extremadamente eficaz el material lignocelulolítico, por ejemplo rastrojo de maíz o paja de trigo, que después puede convertirse adicionalmente en un producto útil, tal como etanol, biogás, butanol, ácido láctico, un plástico, un ácido orgánico, un disolvente, un complemento para pienso animal, un producto farmacéutico, una vitamina, un aminoácido, una enzima o una materia prima química. Adicionalmente, los productos intermedios a partir de un procedimiento después de la hidrólisis, por ejemplo ácido láctico como intermedio en la producción de biogás, pueden usarse como bloque constructor para otros materiales. La presente invención se ejemplifica con la producción de etanol, pero esto se hace como ejemplificación y no como limitación de los otros productos útiles mencionados que pueden producirse igualmente bien.

El procedimiento de acuerdo con la invención comprende una etapa de hidrólisis enzimática. La hidrólisis enzimática incluye, aunque sin limitación, hidrólisis con el fin de licuar la materia prima, e hidrólisis con el fin de liberar el azúcar de la materia prima, o ambos. En esta etapa, el material lignocelulósico opcionalmente pretratado y opcionalmente lavado se pone en contacto con la composición enzimática para uso en el método de la invención. Dependiendo del material lignocelulósico y del pretratamiento, las diferentes condiciones de reacción, por ejemplo temperatura, dosificación de enzima, tiempo de reacción de hidrólisis y concentración de materia seca, pueden adaptarse por los expertos para conseguir la conversión deseada de lignocelulosa a azúcar. Se dan algunas indicaciones más adelante.

En un aspecto de la invención, la hidrólisis se realiza a una temperatura de 45ºC o más, 50ºC o más, 55ºC o más, 60ºC o más, 65ºC o más o 70ºC o más. La alta temperatura durante la 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, menor cantidad requerida de agua de enfriamiento, uso de agua de enfriamiento con una mayor temperatura, reutilización de las enzimas, y más.

En un aspecto adicional de la invención, la cantidad de composición de enzima añadida (denominada también aquí dosificación de enzima o carga de enzima) es baja. En una realización, la cantidad de enzima es 6 mg de proteína/g de materia seca en peso o menor, 5 mg de proteína/g de materia seca o menor, 4 mg de proteína/g de materia seca o menor, 3 mg de proteína/g de materia seca o menor, 2 mg de proteína/g de materia seca o menor o 1 mg de proteína/g de materia seca o menor (expresada como proteína en mg de proteína/g de materia seca). En una realización, la cantidad de enzima es 0,5 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,4 mg de composición de enzima/g de peso de materia seca

o menor, 0,3 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,25 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,20 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,18 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor, 0,15 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor o 0,10 mg de enzima/g de peso de materia seca o menor (expresada como el total de enzimas de celulasa en mg de enzima/g de materia seca). Es posible una baja dosificación enzimática, puesto que debido a la actividad y estabilidad de las enzimas, es posible aumentar el tiempo de reacción de hidrólisis.

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

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

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

Significativamente, un procedimiento de la invención puede realizarse usando altos niveles de materia seca (del material lignocelulósico) en la reacción de hidrólisis. De esta manera, la invención se puede realizar con un contenido de materia seca de aproximadamente 5% en peso o mayor, aproximadamente 8% en peso o mayor, aproximadamente 10% en peso o mayor, aproximadamente 11% en peso o mayor, aproximadamente 12% en peso o mayor, aproximadamente 13% en peso o mayor, aproximadamente 14% en peso o mayor, aproximadamente 15% en peso o mayor, aproximadamente 20% en peso o mayor, aproximadamente 25% en peso o mayor, aproximadamente 30% en peso o mayor, aproximadamente 35% en peso o mayor, o aproximadamente 40% en peso o mayor. En una realización adicional, el contenido de materia seca en la etapa de hidrólisis es 14% en peso, 15% en peso, 16% en peso, 17% en peso, 18% en peso, 19% en peso, 20% en peso, 21% en peso, 22% en peso, 23% en peso, 24% en peso, 25% en peso, 26% en peso, 27% en peso, 28% en peso, 29% en peso, 30% en peso, 31% en peso, 32% en peso, 33% en peso o más, o 14 a 33% en peso.

Fermentación

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

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

El procedimiento de fermentación puede ser un procedimiento de fermentación aerobio o anaerobio. Un procedimiento de fermentación anaerobio se define aquí como un procedimiento de fermentación realizado en ausencia de oxígeno o en el que no se consume sustancialmente oxígeno, preferiblemente se consume menos de 5, 2,5 o 1 mmol/l/h, más preferiblemente 0 mmol/l/h (es decir, el consumo de oxígeno no es detectable), y en el que las moléculas orgánicas sirven tanto como dadores de electrones y como aceptores de electrones. En ausencia de oxígeno, el NADH producido en la glucólisis y formación de biomasa, no puede oxidarse por fosforilación oxidativa. Para resolver este problema, muchos

microorganismos usan piruvato o uno de sus derivados como un aceptor de electrones e hidrógeno, regenerando de esta manera el NAD^+. De esta manera, en un procedimiento de fermentación anaerobio preferido, se usa piruvato como un aceptor de electrones (y de hidrógeno), y se reduce a productos de fermentación tales como etanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico, un aminoácido, 1-propano-diol, etileno, glicerol, butanol, antibióticos de β-lactama y una cefalosporina. En una realización preferida, el procedimiento de fermentación es anaerobio. Un procedimiento anaerobio es ventajoso puesto que es más barato que los procedimientos aerobios: se necesita un equipo menos especial. Adicionalmente, se espera que los procedimientos anaerobios den un mayor rendimiento de producto que los procedimientos aerobios. En condiciones aerobias, normalmente el rendimiento de biomasa es mayor que en condiciones anaerobias. En consecuencia, normalmente en condiciones aerobias, el rendimiento de producto esperado es menor que en condiciones anaerobias.

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

El procedimiento de fermentación preferiblemente se realiza a una temperatura que es óptima para la célula modificada. De esta manera, para la mayoría de levaduras o células fúngicas, el procedimiento de fermentación se realiza a una temperatura que es menor que 42ºC, preferiblemente menor que 38ºC. Para levaduras o células hospedantes fúngicas filamentosas, el procedimiento de fermentación preferiblemente se realiza a una temperatura que es menor que 35, 33, 30 o 28ºC, y a una temperatura que es mayor que 20, 22, o 25ºC.

En una realización de la invención, en la etapa la fermentación se realiza con un microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar de C5. En una realización, el procedimiento es un procedimiento para la producción de etanol, con lo que el procedimiento comprende la etapa de fermentar un medio que contiene un azúcar o azúcares con un microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar de C5, con lo que la célula hospedante es capaz de fermentar glucosa, L-arabinosa y xilosa a etanol. En una realización de la misma, el microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar de C5 es una levadura. En una realización, la levadura pertenece al género *Saccharomyces*, preferiblemente de la especie *Saccharomyces* cerevisiae, en la que se han realizado modificaciones genéticas. Un ejemplo de este microorganismo y su preparación se describe en más detalle en WO 2008/041840 y en la solicitud de patente europea EP10160622.6, presentada el 21 de abril de 2010. En una realización, el procedimiento de fermentación para la producción de etanol es anaerobio. El término anaerobio ya se ha definido anteriormente aquí. En otra realización preferida, el procedimiento de fermentación para la producción de etanol es aerobio. En otra realización preferida, el procedimiento de fermentación para la producción de etanol es en condiciones limitadas de oxígeno, más preferiblemente condiciones aerobias y limitadas de oxígeno. Las condiciones limitadas de oxígeno ya se han definido anteriormente aquí.

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

En un aspecto, el procedimiento de fermentación que conduce a la producción de etanol tiene varias ventajas en comparación con los procedimientos de fermentación de etanol conocidos:

son posibles procedimientos anaerobios;
también son posibles condiciones limitadas de oxígeno;
pueden obtenerse mayores rendimientos de etanol y velocidades de producción de etanol;
la cepa usada puede ser capaz de usar L-arabinosa y opcionalmente xilosa.

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

El procedimiento de fermentación puede realizarse sin ningún requisito para ajustar el pH durante el procedimiento. Es decir, el procedimiento es aquel que puede realizarse sin adición de ningún ácido o base. Sin embargo, esto excluye una etapa de pretratamiento, en la que puede añadirse ácido. El caso es que la composición para uso en el método de la invención sea capaz de actuar a un pH bajo y, por lo tanto, no haya necesidad de ajustar el pH de ácido de una materia prima pretratada con ácido para que la sacarificación o hidrólisis pueda tener lugar. Por consiguiente, un método de la

invención puede ser un método con cero desechos que usa solo productos orgánicos que no requieran un aporte químico inorgánico.

Tiempo de reacción global

De acuerdo con la invención, el tiempo de reacción global (o tiempo de reacción de la etapa de hidrólisis y la etapa de fermentación juntas) puede reducirse. En una realización, el tiempo de reacción global es 300 horas o menos, 200 horas o menos, 150 horas o menos, 140 horas o menos, 130 o menos, 120 horas o menos, 110 horas o menos, 100 horas o menos, 90 horas o menos, 80 horas o menos, 75 horas o menos, o aproximadamente 72 horas a un rendimiento de glucosa de 90%. Pueden alcanzarse tiempos globales correspondientemente menores a un rendimiento de glucosa más bajo.

Productos de fermentación

Los productos de fermentación que pueden producirse de acuerdo con la invención incluyen aminoácidos, vitaminas, productos farmacéuticos, complementos para piensos de animales, productos químicos de especialidad, materias primas químicas, plásticos, disolventes, combustibles u otros polímeros orgánicos, ácido láctico y etanol, incluyendo etanol como combustible (entendiéndose que el término “etanol” incluye alcohol etílico o mezclas de alcohol etílico y agua).

Algunos productos de valor añadido específicos que pueden producirse por los métodos de la invención incluyen, aunque sin limitación, biocombustibles (incluyendo biogás, etanol y butanol); ácido láctico; ácido 3-hidroxi-propiónico; ácido acrílico; ácido acético; 1,3-propano-diol; etileno; glicerol; un plástico; un producto químico de especialidad; un ácido orgánico, incluyendo ácido cítrico, ácido succínico y ácido maleico; un disolvente; un complemento para piensos de animales; un producto farmacéutico tal como un antibiótico de β-lactama 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 oxidorreductasa, una transferasa o una xilanasa; una materia prima química; o un complemento para piensos para animales.

Separación del producto de fermentación

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

Ciertas modalidades de la invención se describirán a continuación en más detalle, pero de ninguna manera limitan el alcance de la presente invención.

Uso de enzimas termoestables en condiciones óptimas de temperatura

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

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

El rendimiento máximo teórico (Yps máx en g de producto por gramo de glucosa) de un producto de fermentación puede obtenerse de un libro de texto de bioquímica. Para el etanol, 1 mol de glucosa (180 g) produce, de acuerdo con la ruta de fermentación de glucólisis normal en levadura, 2 moles de etanol (= 2x46 = 92 g de etanol. El rendimiento máximo teórico de etanol sobre glucosa es por tanto 92/180 = 0,511 g de etanol/g de glucosa.

Para el butanol (PM 74 g/mol) o iso butanol, el rendimiento máximo teórico es 1 mol de butanol por mol de glucosa. Por lo que 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 fermentación homoláctica es 2 moles de ácido láctico (PM = 90 g/mol) por mol de glucosa. De acuerdo con esta estequiometría, el Yps máx = 1 g de ácido láctico/g de glucosa.

Para otros productos de fermentación, puede realizarse un cálculo similar.

La reducción de coste conseguida con la aplicación de enzimas celulolíticas de *Rasamsonia* será el resultado de una reducción global en el tiempo de procedimiento.

Compensación de una menor dosificación de enzima con un tiempo de hidrólisis prolongado usando enzimas de Rasamsonia

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

La reducción de coste conseguido usando enzimas celulolíticas estables, tales como de *Rasamsonia*, resulta de requerir menos dosificación de enzima, que da como resultado rendimientos de conversión de hidrólisis similares.

Reducción del riesgo sobre la contaminación con enzimas estables

En un procedimiento común para convertir el material lignocelulósico en etanol, las etapas de procedimiento se realizan preferiblemente en condiciones sépticas para reducir los costes operativos. Por lo tanto, puede ocurrir la contaminación y crecimiento de microorganismos contaminantes y da como resultado efectos secundarios indeseables, tales como producción de ácido láctico, ácido fórmico y ácido acético, pérdidas de rendimiento de etanol sobre el sustrato, producción de toxinas y polisacáridos extracelulares, que pueden afectar a los costes de producción significativamente. Una temperatura de procedimiento alta y/o un tiempo de procedimiento corto limitarán el riesgo sobre la contaminación durante la hidrólisis y fermentación. Las enzimas termoestables, como las de *Rasamsonia*, son capaces de hidrolizar una materia prima lignocelulósica a temperaturas mayores que 60ºC. A estas temperaturas, el riesgo de que un microorganismo contaminante provoque efectos secundarios indeseados será de muy pequeño a casi cero.

Durante la etapa de fermentación, en la que se produce etanol, las temperaturas típicamente están entre 30 y 37ºC, y preferiblemente no subirán debido a las pérdidas de producción. Aplicando tiempos de procedimiento de fermentación tan cortos como sea posible, los riesgos y efectos de contaminación y/o crecimiento de contaminantes se reducirán tanto como sea posible. Con enzimas estables, como las de *Rasamsonia*, pueden aplicarse tiempos de fermentación tan cortos como sea posible (véase la descripción anterior), y de esta manera se reducirán los riesgos sobre la contaminación y/o el crecimiento de contaminantes tanto como sea posible. De esta manera, la reducción de costes La reducción de costos conseguida con la aplicación de enzimas celulolíticas termoestables de *Rasamsonia* dará como resultado un menor riesgo de fallos en el procedimiento debido a contaminación.

Las enzimas estables reducen los costes de enfriamiento y aumentan la productividad de las plantas de etanol

La primera etapa después del pretratamiento térmico será enfriar la materia prima pretratada a temperaturas en las que las enzimas son óptimamente activas. A gran escala, esto se realiza típicamente añadiendo agua (enfriada), que, aparte de disminuir la temperatura, reducirá el contenido de materia seca. Usando enzimas termoestables, como las de *Rasamsonia*, puede conseguirse una reducción de costes por el hecho de que (i) se requiere menos enfriamiento de la materia prima pretratada puesto que se permiten mayores temperaturas durante la hidrólisis, y (ii) se añadirá menos agua, lo que aumentará el contenido de materia seca durante la hidrólisis y fermentación y, de esta manera, aumentará la capacidad de producción de etanol (cantidad producida por unidad de tiempo por volumen) de una planta de etanol. Asimismo, usando enzimas termoestables, como las de *Rasamsonia*, la reducción de costes puede conseguirse también usando agua de enfriamiento que tenga una mayor temperatura que el agua que se usa en un procedimiento con una enzima no termoestable.

Reciclado de enzimas después de la hidrólisis con enzimas estables

Al final de la hidrólisis, las actividades de las enzimas parecen ser bajas puesto que se liberan pocos azúcares reductores una vez que se ha convertido casi toda la celulosa. Sin embargo, la cantidad de actividad enzimática presente ha disminuido solo un poco, presumiblemente debido principalmente a la absorción de las enzimas en el sustrato. Aplicando separación sólido-líquido después de la hidrólisis, tal como centrifugación, filtración, sedimentación-decantación, etcétera, puede recuperarse un 60% o más, por ejemplo un 70% de la actividad enzimática en disolución, y reutilizarse para la hidrólisis de una nueva materia prima lignocelulósica pretratada durante la siguiente hidrólisis.

Además, después de la separación sólido-líquido, la enzima en disolución puede separarse de la disolución que contiene azúcares reductores y otros productos de hidrólisis de las acciones enzimáticas. Esta separación puede realizarse mediante, aunque sin limitación (ultra y micro)filtración, centrifugación, sedimentación-decantación, sedimentación, con o sin primera adsorción de la enzima a un soporte de cualquier tipo.

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

Reciclado de enzimas después de la hidrólisis en combinación con producción de enzimas y reciclado de células de levadura con enzimas estables

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

Reciclado de enzimas después de destilación a vacío con enzimas estables

La termoestabilidad de las enzimas como las de *Rasamsonia*, provoca actividad celulolítica remanente después de la hidrólisis, fermentación y destilación a vacío en los restos de elaboración finos. La actividad total de la enzima se reduce durante las tres etapas de procedimiento sucesivas. Por lo tanto, los restos de elaboración finos obtenidos después de la destilación a vacío pueden reutilizarse como una fuente de enzima para un ciclo de procedimiento de hidrólisis-fermentación-destilación recién iniciado de conversión de paja de trigo pretratada en etanol. Los restos de elaboración finos pueden usarse como una forma concentrada o (no) diluida y/o purificados y con o sin complementos enzimáticos adicionales.

Reciclado de enzima en combinación con complementación de enzimas después de destilación a vacío con enzimas termoestables

En un procedimiento óptimo, se complementa una cantidad de enzima en los restos de elaboración finos, antes de su reutilización en un nuevo ciclo de procedimiento, igual a la cantidad de actividad perdida durante las tres etapas de procedimiento sucesivas del ciclo de procedimiento previo. De esta manera, se evita la sobredosificación de enzima y se obtiene por tanto un uso más eficiente de la enzima.

Además, proporcionando una alta dosificación de enzima en el primer ciclo de procedimiento, y complementando enzima en una cantidad igual a la de la actividad perdida durante las tres etapas de procedimiento sucesivas en los siguientes ciclos de procedimiento, pueden obtenerse posibles velocidades de hidrólisis más altas en cada ciclo de procedimiento, dando como resultado tiempos de hidrólisis cortos de menos de 48 h en combinación con un uso más eficaz de las enzimas.

Uso de enzimas estables en sistemas mixtos

Aplicando mezclamiento durante la hidrólisis, las enzimas entran más a menudo en contacto con los sustratos, lo que da como resultado un uso más eficaz de la actividad catalítica. Esto dará como resultado menores dosificaciones de enzimas y, de esta manera, menores costes, a menos que el mezclamiento tenga un efecto negativo sobre las enzimas. Las enzimas estables, tales como las enzimas termoestables de *Rasamsonia*, son robustas y pueden resistir las circunstancias (localmente) de alta cizalla y temperaturas, que es el caso durante el mezclamiento intensivo de las suspensiones. El uso de ésta en sistemas mixtos es por tanto beneficioso y conducirá a la dosificación y por tanto a la 50 reducción de costes.

La invención se describe adicionalmente por los siguientes ejemplos, que no se deben interpretar como que limitan el alcance de la invención.

EJEMPLOS

Información experimental

Cepas

La cepa de *Rasamsonia* (Talaromyces) emersonii se depositó en CENTRAAL BUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES, Uppsalalaan 8, P.O. Box 85167, NL-3508 AD Utrecht, Países Bajos en diciembre de 1964, con el Número de Acceso CBS 393.64.

Pueden usarse igualmente otras cepas adecuadas en los presentes ejemplos para mostrar el efecto y las ventajas de la invención. Por ejemplo TEC-101, TEC-147, TEC-192, TEC-201 o TEC-210 son cepas de *Rasamsonia* adecuadas que se describen en el documento WO2011/000949.

Preparación de un sustrato de rastrojo de maíz pretratado con ácido

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

Ensayos de medida de proteína

1. Proteína total

Biuret de TCA

El método era una combinación de precipitación de proteína usando ácido tricloroacético (TCA) para eliminar las sustancias molestas y permitir la determinación de la concentración de proteínas con la reacción colorimétrica de Biuret. En la reacción de Biuret, un ion de cobre (II) se reduce a cobre (I), que forma un complejo con los nitrógenos y carbonos de los enlaces peptídicos en una disolución alcalina. Un color violeta indica la presencia de proteínas. La intensidad del color y, por tanto, la absorción a 546 nm es directamente proporcional a la concentración de proteína, de acuerdo con la ley de Beer-Lambert. La normalización se realizó usando BSA (Albúmina de Suero Bovina), y el contenido de proteína se expresó en g de proteína como equivalentes de BSA/l o mg de proteína como equivalentes de BSA/ml. El contenido de proteína se calculó usando protocolos de cálculo convencionales conocidos en la técnica, por representación de OD_{546} frente a la concentración de las muestras con concentración conocida, seguido del cálculo de la concentración de las muestras desconocidas usando la ecuación generada a partir de la recta de calibración.

2. Proteínas individuales usando PAGE

Pretratamiento de muestras por SDS-PAGE

Basándose en la concentración de proteína estimada de las muestras, se realizó la siguiente preparación de muestras. A 10 µl de muestra se le añadieron 40 µl de agua MilliQ y 50 µl de TCA (20%) para diluir la muestra cinco veces (~ 1 mg/ml) y precipitar las proteínas. Después de 1 hora en hielo, la muestra se centrifugó (10 minutos, 14000 rpm). El pelete se lavó con 500 µl de acetona y se centrifugó (10 minutos, 14000 rpm). El pelete se trató como se describe más adelante.

SDS-PAGE

El pelete se disolvió en 65 µl de agua MilliQ, 25 µl de amortiguador de muestra NuPAGE™ LDS (4x) de Invitrogen y 10 µl de agente reductor de muestra NuPAGE™ (10x) de Invitrogen. Antes de la etapa de desnaturalización, la muestra se diluyó 5 veces usando una mezcla de MilliQ; amortiguador de muestra NuPAGE™ LDS y 10 µl de reductor de muestra NuPAGE™ en la proporción 65:25:10. Después del mezclamiento, las muestras se incubaron en una mezcladora térmica durante 10 minutos a 70ºC. Las disoluciones de muestra se aplicaron en un gel de Bis-Tris al 4-12% (NuPAGE™ BisTris, Invitrogen). Se aplicó también una muestra (10 µl) de marcador M12 (Invitrogen) sobre el gel. El gel se usó a 200 V durante 50 minutos, usando XCELL Surelock, con 600 ml de amortiguador de SDS diluido 20 x en la cámara de amortiguador externa y 200 ml de amortiguador de SDS diluido 20 x, que contenía 0,5 ml de antioxidante (NuPAGE™ Invitrogen) en la cámara de amortiguador interna. Después del uso, el gel se enjuagó dos veces con agua desmineralizada, y los geles se fijaron con disolución de 50% de metanol/7% de ácido acético durante una hora y se tiñeron con Sypro Ruby (50 ml por gel) durante una noche. Se formó una imagen usando Typhoon 9200 (610 BP 30, Verde (532 nm), PMT 600V, 100 micrómetros) después de lavar el gel con el agua MilliQ.

Análisis cuantitativo de la proteína

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

Cálculo de conversión de glucano:

% de conversión de glucano (%) = (glucosa (g/l) x 100%)/(glucano (fracción en DM) x dm (g/kg) x 1,1)

en la que:

glucosa (g/l) = concentración de glucosa en el sobrenadante después de la hidrólisis.

glucano (fracción en dm) = contenido de glucano del sustrato antes del pretratamiento.
dm (g/kg) = materia seca de la hidrólisis (f.i. 20% dm = 200 g/kg).
1,1 = aumento de peso debido a la incorporación de agua durante la hidrólisis.

Ejemplo de cálculo:

glucosa = 60 g/l
fracción de glucano = 0,40 (es un 40% en materia seca)
dm = 200 g/kg

ejemplo de conversión de glucano = (60*100)/(0,4 x 200 x 1,1) = 68% de conversión

Ejemplo 1

Evaluación del efecto de la ausencia de oxígeno durante la hidrólisis en la actividad celulolítica de cócteles de enzima celulasa

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

La hidrólisis de las disoluciones de materia prima de aCS al 10% p/p agotadas en oxígeno (rociadas con nitrógeno) y saturadas en oxígeno (rociadas con aire) se realizaron en frascos de centrífuga de 30 ml herméticos al aire (Nalgene Oakridge) en un volumen de reacción total de 10 ml. Los frascos, que ya contenían la disolución de celulasa, usados para el experimento agotado en oxígeno se rociaron con nitrógeno antes de y durante el llenado de los mismos con la materia prima. Cada hidrólisis se realizó por duplicado con 7,5 mg/g de DM de cóctel de enzima celulasa añadidos en un volumen total no mayor que 375 µl. Los tres cócteles de enzima celulasa ensayados incluían: una mezcla TEC-210 (mezcla de celulasas), una mezcla 4E-GH61 (que consiste en 9% p/p de proteína total BG, 30% p/p de proteína total CBHI, 25% p/p de proteína total CBHII y 36% p/p de proteína total GH61) y una mezcla 4E-EG (que consiste en 9% p/p de proteína total BG, 30% p/p de proteína total CBHI, 25% p/p de proteína total CBHII y 36% p/p de proteína total EG). La TEC-210 se fermentó de acuerdo con los procedimientos de inoculación y fermentación descritos en el documento WO2011/000949. Se usó la mezcla 4E (como se describe en el documento WO2011/098577).

Los frascos de centrífuga que contenían la materia prima y la disolución de enzima se colocaron en una incubadora de horno (horno de hibridación Techne HB-1D) y se incubaron durante 72 horas a 65ºC mientras se hacían girar en el punto de ajuste 3 (12 rpm por minuto). Después de la hidrólisis, las muestras se enfriaron en hielo e inmediatamente 50 µl de cada sobrenadante se diluyeron en 1450 µl de agua de grado I. El sobrenadante diluido posteriormente se filtró (filtro de 0,45 µm, Pall PN 454), y los filtrados se analizaron para determinar el contenido de azúcar como se describe más adelante.

Las concentraciones de azúcar de las muestras diluidas se midieron usando un equipo de HPLC equipado con una columna Aminex HPX-87P (Biorad nº 1250098) por elución con agua a 85ºC a un caudal de 0,6 ml por minuto, y se cuantificaron por integración de las señales de glucosa a partir de la detección del índice de refracción (R.I.) calibrado con disoluciones patrón de glucosa.

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

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

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

Cócktel de celulasa	Rociada con aire. glucosa promedio (g/l)	Desv. est.	Rociada con N_2 glucosa promedio (g/l)	Desv. est.
TEC-210	34,5	0,8	31,9	1,1

Mezcla 4E-GH61	31,7	1,4	27,4	0,1
Mezcla 4E-EG	22,7	0,1	23,3	1,7

Ejemplo 2

El efecto del oxígeno sobre la actividad celulolítica de cócteles de enzima celulasa durante la hidrólisis de materias primas lignocelulósicas

El efecto del oxígeno en la actividad celulolítica del cóctel enzimático durante la hidrólisis de la materia prima lignocelulósica se muestra en este ejemplo. Las reacciones de hidrólisis se realizan con una materia prima de rastrojo de maíz pretratado con ácido (aCS) a una concentración final de 20% p/p de DM. Esta disolución de materia prima se prepara por dilución de una disolución de materia prima concentrada con agua. El pH se ajusta a pH 4,5 con una disolución de NH_4OH al 10% (p/p).

La hidrólisis se realiza en un reactor agitado, de pH controlado y de temperatura controlada con un volumen de trabajo de 1 l. Cada hidrólisis se realiza por duplicado con 2.5 mg/g de cóctel de enzima celulasa DM TEC-210. La TEC-210 se produjo de acuerdo con los procedimientos de inoculación y fermentación descritos en el documento WO2011/000949.

Se realizan los siguientes experimentos:

1. 1 l de aCS al 20%, pH 4,5, temperatura 62ºC, velocidad del agitador 60 rpm (esto corresponde a un nivel de DO de < 0,002 moles de oxígeno por m^3), 2,5 mg/g de dm del cóctel celulasa TEC-210, tiempo de incubación 120 horas (experimento de referencia).
2. Como el experimento 1, pero al comienzo de la hidrólisis, el rociado de aire en la disolución empezó a un nivel de oxígeno disuelto del 20% (esto corresponde a 0,03 moles de oxígeno por m3, medido usando un electrodo de DO (oxígeno disuelto)). Este nivel de oxígeno disuelto se mantiene durante el resto del procedimiento de hidrólisis.
3. Como el experimento 1, pero a las 72 horas se rocía aire en la disolución que empieza a un nivel de oxígeno disuelto del 20% (esto corresponde a 0,03 moles de oxígeno por m3, medido usando un electrodo de DO (oxígeno disuelto)). Este nivel de oxígeno disuelto se mantiene durante el resto del procedimiento de hidrólisis.

Después de la hidrólisis, las muestras se enfrían en hielo e inmediatamente 50 µl de cada sobrenadante se diluyen en 1450 µl de agua de grado l. El sobrenadante diluido posteriormente se filtra (filtro de 0,45 µm, Pall PN 454), y los filtrados se analizan para determinar el contenido de azúcar como se describe más adelante.

Las concentraciones de azúcar de las muestras diluidas se miden usando un equipo de HPLC equipado con una columna Aminex HPX-87P (Biorad nº 1250098) por elución con agua a 85ºC a un caudal de 0,6 ml por minuto, y se cuantificaron por integración de las señales de glucosa a partir de la detección del índice de refracción (R.I.) calibrado con disoluciones patrón de glucosa.

Los resultados, visibles en la Figura 2, muestran claramente una producción de glucosa aumentada en el caso de que se añada aire. Además, el aire añadido a la reacción de hidrólisis en la segunda parte del tiempo demuestra una producción de glucosa superior en comparación con la no adición de aire o una adición de aire durante toda la etapa de hidrólisis.

Ejemplo 3

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

En este ejemplo se muestra el efecto de la concentración de oxígeno disuelto sobre la actividad celulolítica del cóctel o composición de enzima durante la hidrólisis de materia prima lignocelulósica a escala piloto. Las reacciones de hidrólisis se realizan con una materia prima de rastrojo de maíz pretratado con ácido (aCS) a una concentración final del 17,1% p/p de DM. La disolución de materia prima se prepara mediante la dilución de una suspensión de materia prima concentrada con agua. El pH se ajusta a pH 4,5 con una disolución de NH_4OH al 25% (p/p).

La hidrólisis enzimática se realiza en un reactor a escala piloto de 270 litros que tiene pH y temperatura controlados, con un volumen de trabajo de 150 litros. El oxígeno disuelto durante el procedimiento se controla ajustando la velocidad del impulsor a un flujo de aire y sobrepresión dados. La hidrólisis enzimática se realiza a una dosificación de 2,5 mg (proteína TCA)/g de dm de cóctel de enzima celulasa TEC-210. La TEC-210 se produjo de acuerdo con los procedimientos de inoculación y fermentación descritos en el documento WO2011/000949.

Se realizan los siguientes experimentos:

Experimento 1

Aireación de 0 a 120 horas: 150 l de pCS al 17,1%, pH 4,5, temperatura 62ºC, 1 bar de sobrepresión, caudal de aire 10 kg/h en el espacio de cabeza, 2,5 mg de TCA/g de dm de cóctel de celulasa TEC-210, tiempo de incubación 120 horas

en un reactor a escala piloto de 270 litros. La concentración de oxígeno disuelto (DO) de la mezcla de reacción se midió constantemente usando un electrodo de DO. El DO se controló a un nivel de 15 0,15-0,22 moles/m^3 ajustando la velocidad del impulsor.

Experimento 2

Aireación entre 72 y 120 horas: 150 l de pCS al 17,1%, pH 4,5, temperatura 62ºC, una dosificación de enzima de 2,5 mg de TCA/g de dm de cóctel de celulasa TEC-210 y un tiempo de incubación total de 120 horas en un reactor a escala piloto de 270 litros. La concentración de oxígeno disuelto (DO) de la mezcla de reacción se midió constantemente usando un electrodo de DO. Durante las primeras 72 horas del procedimiento, se aplicaron los siguientes ajustes: sin sobrepresión, sin caudal de aire en el espacio de cabeza, y el DO se controla a un nivel de [0,02-0,05] moles/m3 ajustando la velocidad del impulsor. Durante las últimas 48 horas del procedimiento, se aplicaron los siguientes ajustes: una sobrepresión de 1 bar, un caudal de aire de 10 kg/h en el espacio de cabeza, y el DO se controló a un nivel de 0,15-0,22 moles/m^3 ajustando la velocidad del impulsor.

Durante la hidrólisis enzimática, se tomaron muestras diariamente para análisis de hidratos de carbono (glucosa, celobiosa) por RMN y medida de viscosidad y pH.
El análisis de composición del rastrojo de maíz pretratado se realizó por hidrólisis química de la muestra y determinación de los monosacáridos por RMN.
Las muestras tomadas durante la hidrólisis enzimática se analizaron para (oligo)azúcares, ácidos orgánicos e inhibidores por RMN de flujo.
Los resultados se presentan en la Figura 4, y muestran que, durante la hidrólisis enzimática, en el experimento 2 con la aireación parcial (□ = aireación entre tiempo de hidrólisis es 72 y 120 horas), se produce más glucosa que durante la hidrólisis enzimática en el experimento 1 (■ = aireación entre tiempo de hidrólisis es 0 y 120 horas).

Ejemplo 4

El efecto de la sincronización del suministro de oxígeno disuelto en la hidrólisis enzimática de la materia prima lignocelulósica

En este ejemplo se muestra el efecto de la temporización del suministro de oxígeno disuelto sobre la hidrólisis enzimática de la materia prima lignocelulósica. Las reacciones de hidrólisis se realizan con una materia prima de rastrojo de maíz pretratado con ácido (aCS) a una concentración final de 20% p/p de DM. La disolución de materia prima se prepara mediante la dilución de una suspensión de materia prima concentrada con agua. El pH se ajusta a pH 4,5 con una disolución de NH_4OH al 25% (p/p).

La hidrólisis enzimática se realiza en un reactor de 2 litros que tiene pH y temperatura controlados, con un volumen de trabajo de 1 litro. El oxígeno disuelto durante el procedimiento se controla ajustando la velocidad del impulsor y el refrescado continuo del espacio de cabeza con aire reciente en el caso de una concentración de oxígeno disuelto aumentada. La hidrólisis enzimática se realiza a una dosificación de 1,5 mg (proteína TCA)/g de dm de cóctel de enzima celulasa TEC-210. La TEC-210 se produjo de acuerdo con los procedimientos de inoculación y fermentación descritos en el documento WO2011/000949.

Se realizan los siguientes experimentos:

Experimento 1. Aireación de 0 a 7 horas: 1 l de pCS al 20%, pH 4,5, temperatura 62ºC, 1,5 mg de TCA/g de dm de cóctel de celulasa TEC-210, tiempo de incubación 120 horas. La concentración de oxígeno disuelto (DO) de la mezcla de reacción se midió constantemente usando un electrodo de DO. El DO se controló a un nivel de > 0,05 moles/m^3 durante las 7 primeras horas del procedimiento de hidrólisis. Entre las 7 y 120 horas del tiempo de hidrólisis, el DO se mantuvo a un nivel < 0,02 moles/m^3.

Experimento 2. Aireación entre 72 y 120 horas: 1 l de pCS al 20%, pH 4,5, temperatura 62ºC, 1,5 mg de TCA/g de dm de cóctel de celulasa TEC-210, tiempo de incubación 120 horas. La concentración de oxígeno disuelto (DO) de la mezcla de reacción se midió constantemente usando un electrodo de DO. El DO se controló a un nivel de < 0,01 moles/m^3 durante las primeras 72 horas del procedimiento de hidrólisis. Entre 72 y 120 horas del 5 tiempo de hidrólisis, el DO se mantuvo a un nivel > 0,05 moles/m^3.

Durante la hidrólisis enzimática, se tomaron muestras diariamente para el análisis de hidrato de carbono (glucosa, celobiosa) por RMN y medida de viscosidad y pH.

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

Los resultados se presentan en la Figura 5 y demuestran claramente un aumento en la velocidad de formación de glucosa cuando se airea la mezcla de reacción. El experimento 1, que se aireó entre las 0 y 7 horas, claramente muestra una velocidad de formación de glucosa aumentada durante las 7 primeras horas del procedimiento en comparación con la

situación no aireada durante esa fase del procedimiento del Experimento 2. Además, el Experimento 2 demuestra un aumento en la velocidad de formación de glucosa entre 72 y 120 horas en comparación con la situación no aireada durante ese período en el Experimento 1.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de un producto de fermentación a partir de material lignocelulósico, que comprende la siguiente etapa:

hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado usando una composición de enzima que comprende al menos dos celulasas y con lo que la composición de enzima comprende al menos GH61 (familia 61 de glucósido hidrolasas), y
en donde durante parte del tiempo de la hidrólisis enzimática se añade oxígeno al material lignocelulósico y durante parte del tiempo de la hidrólisis enzimática no se añade oxígeno al material lignocelulósico en comparación con la otra parte del tiempo de la hidrólisis enzimática,
en donde en la parte del tiempo en que se añade el oxígeno, la concentración de oxígeno en la fase líquida, en donde el material lignocelulósico está presente durante la hidrólisis enzimática, es más de 0,02 mol/m^3 y en donde
los valores de mol/m^3 se relacionan con la presión atmosférica normal y una temperatura de 62 °C, y
en donde la parte del tiempo en donde se añade oxígeno es de 2 a 80 % del tiempo de hidrólisis enzimática total; y en donde la parte del tiempo en donde no se añade oxígeno es de 10 a 80 % del tiempo de hidrólisis enzimática total.

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

hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado usando una composición de enzima que comprende al menos dos celulasas y con lo que la composición de enzima comprende al menos GH61, y
fermentar el material lignocelulósico hidrolizado, para producir un producto de fermentación; y
en donde durante parte del tiempo de la hidrólisis enzimática se añade oxígeno al material lignocelulósico y durante parte del tiempo de la hidrólisis enzimática no se añade oxígeno al material lignocelulósico en comparación con la otra parte del tiempo de la hidrólisis enzimática,
en donde en la parte del tiempo en que se añade el oxígeno, la concentración de oxígeno en la fase líquida, en donde el material lignocelulósico está presente durante la hidrólisis enzimática, es más de 0,02 mol/m^3 y en donde los valores de mol/m^3 se relacionan con la presión atmosférica normal y una temperatura de 62 °C, y
en donde la parte del tiempo en donde se añade oxígeno es de 2 a 80 % del tiempo de hidrólisis enzimática total; y en donde la parte del tiempo en donde no se añade oxígeno es de 10 a 80 % del tiempo de hidrólisis enzimática total.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el material lignocelulósico se pretrata.

4. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la concentración de oxígeno en la fase líquida de la hidrólisis durante la parte del tiempo en donde se añade oxígeno es al menos 2 veces la concentración de oxígeno en la fase líquida durante la parte del tiempo en donde se añade menos o nada de oxígeno.

5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la parte del tiempo cuando se añade el oxígeno, la concentración de oxígeno en la fase líquida, en la que el material lignocelulósico está presente durante la hidrólisis enzimática, es como máximo 0,12 moles/m^3.

6. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el oxígeno se en forma de burbujas.

7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el reactor para la hidrólisis enzimática tiene un volumen de 1 m^3 o más.

8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el tiempo de hidrólisis enzimática es 5 a 150 horas.

9. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la composición de enzima usada retiene actividad durante 30 horas o más.

10. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la hidrólisis se realiza a una temperatura de 45ºC o más.

11. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la composición de enzima deriva de un hongo, o la composición de enzima comprende una enzima fúngica.

12. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el contenido de materia seca en la etapa de hidrólisis es 10% en peso o más.

13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el contenido de materia seca en la etapa de hidrólisis es de 14 a 33% en peso.

14. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la hidrólisis enzimática tiene lugar en un reactor de cultivo discontinuo, de alimentación por lotes y/o continuo.

15. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que se introduce oxígeno como un gas que contiene oxígeno.

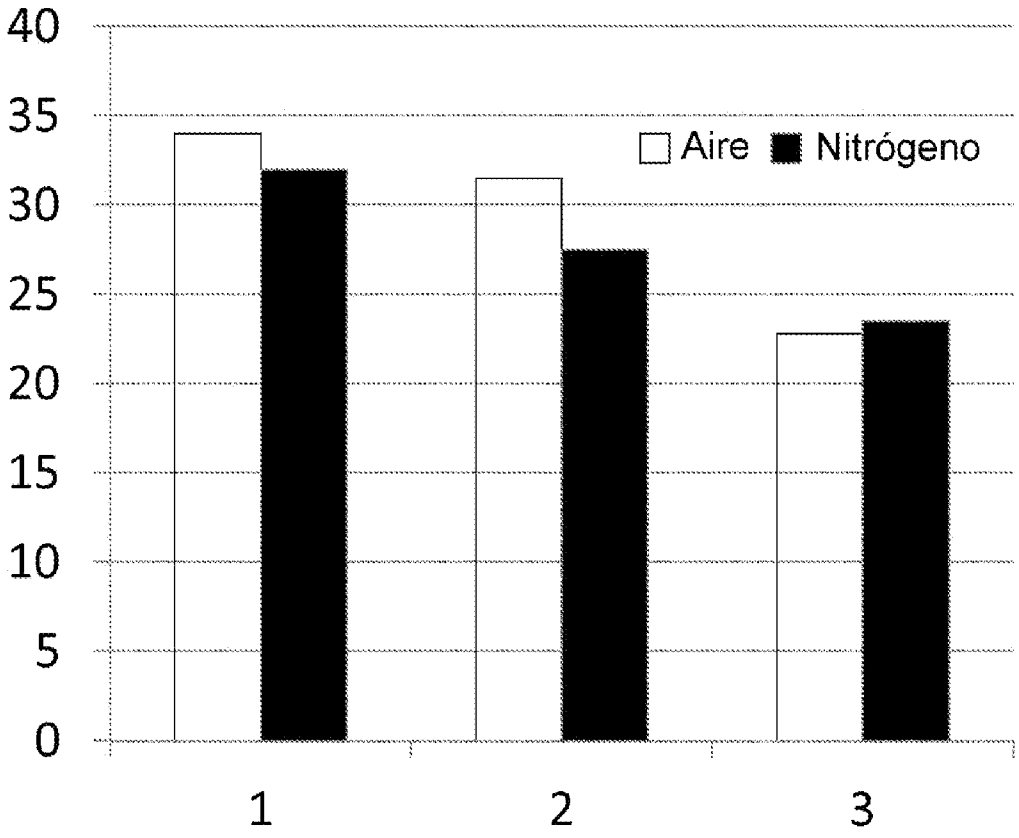

Fig.1

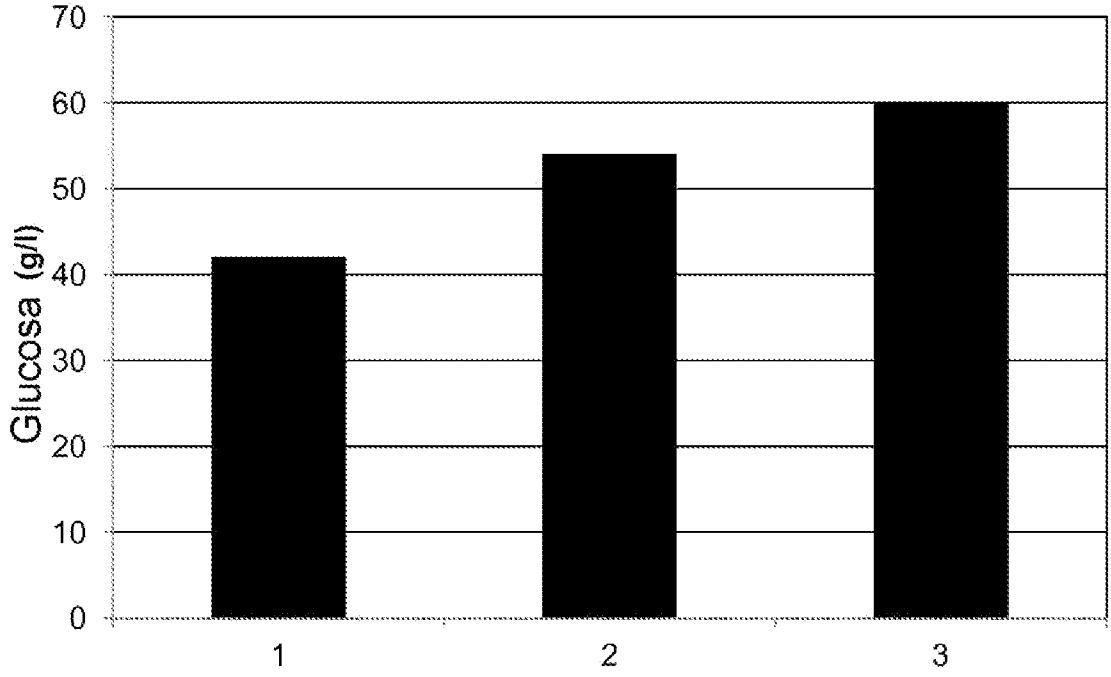

Fig.2

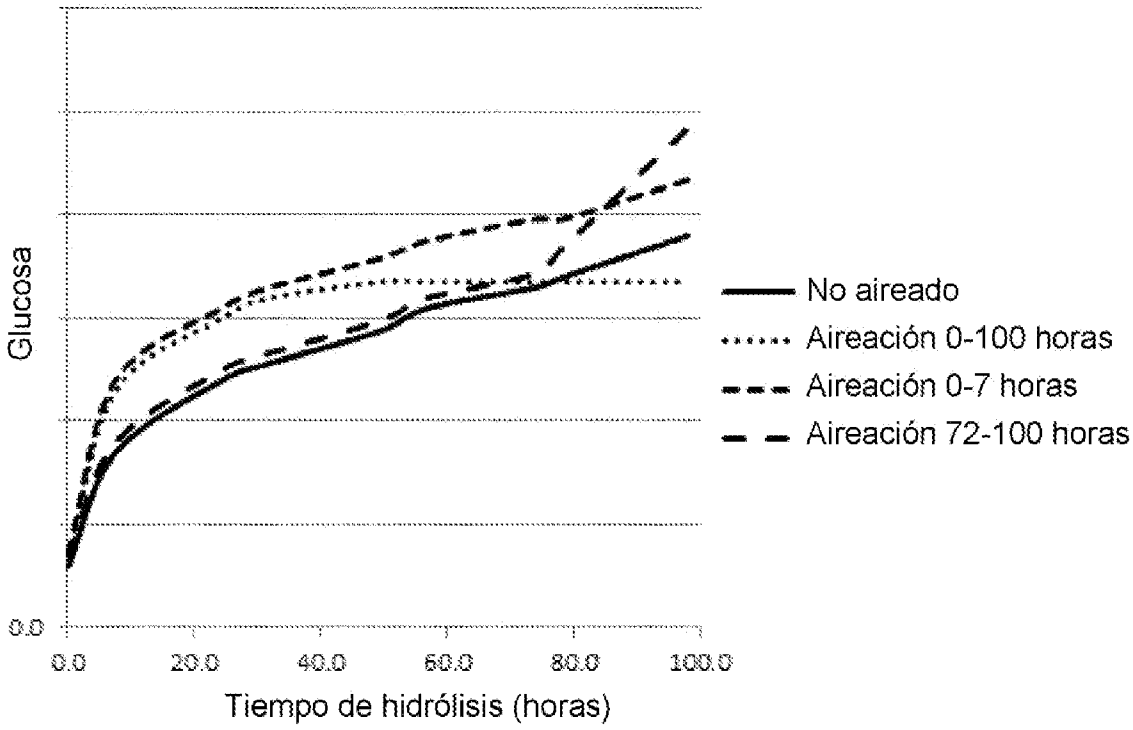
Glucosa
0.0
0.0
20.0
40.0
60.0
80.0
100.0
Tiempo de hidrólisis (horas)
No aireado
Aireación 0-100 horas
Aireación 0-7 horas
Aireación 72-100 horas

Fig. 3

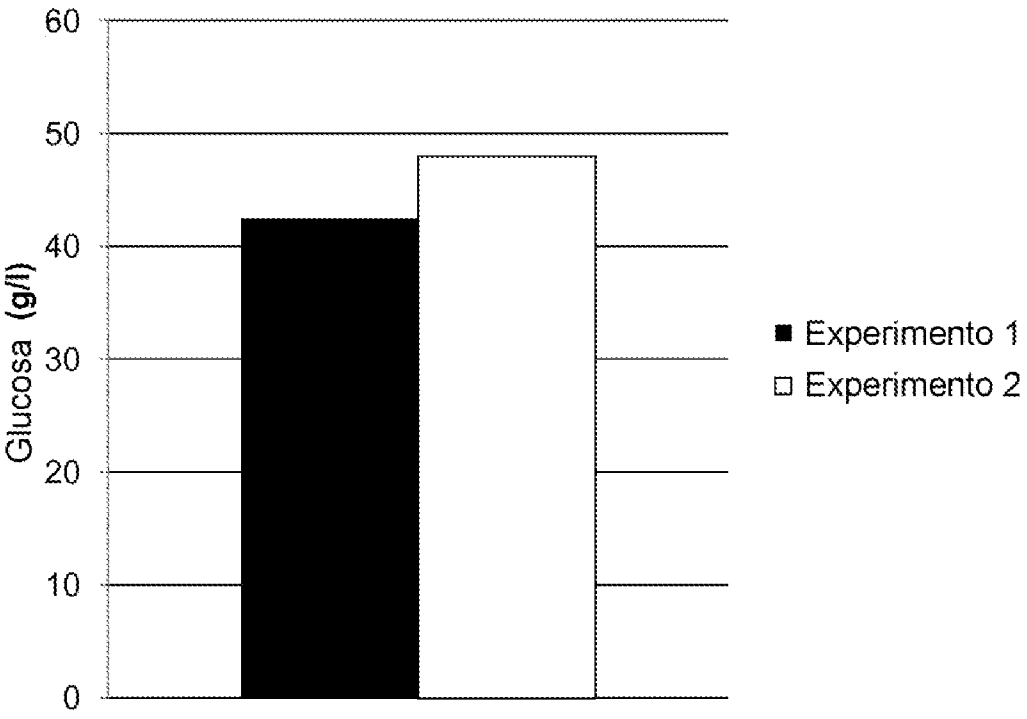

Fig. 4

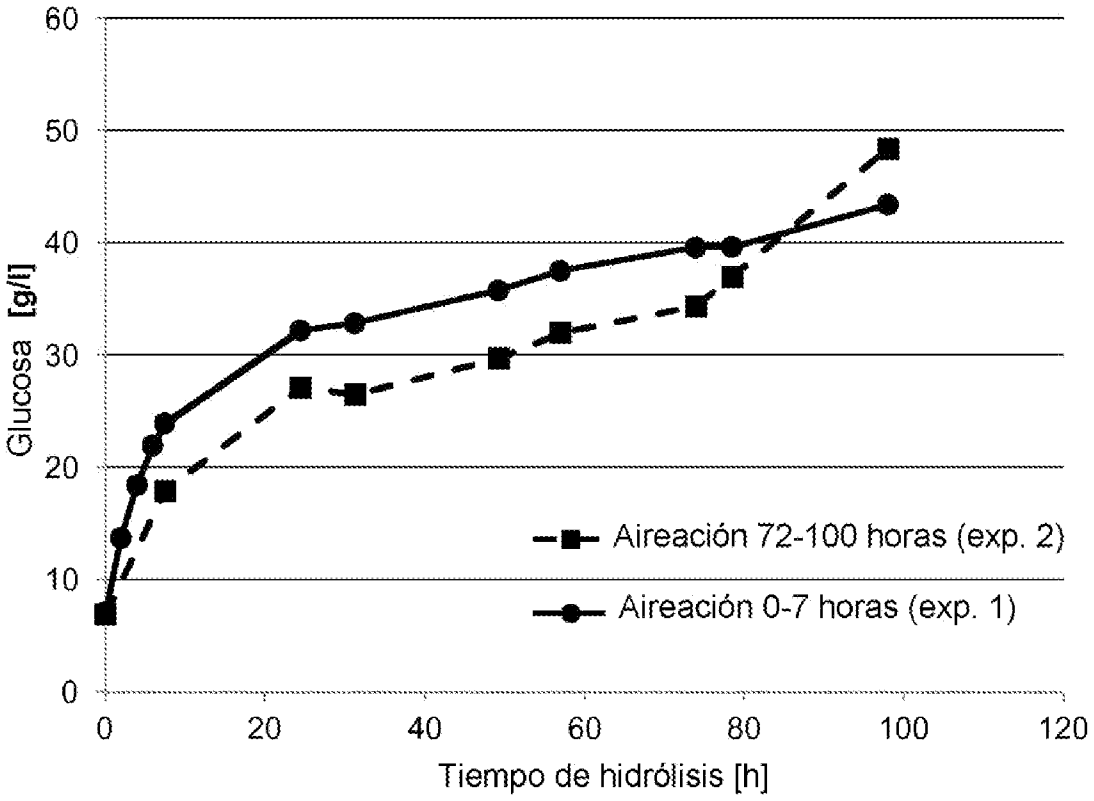
60
50
40
30
20
10
0
Glucosa [g/l]
0
20
40
60
80
100
120
Tiempo de hidrólisis [h]
Aireación 72-100 horas (exp. 2)
Aireación 0-7 horas (exp. 1)

Fig. 5