

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 426**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/14** (2006.01)

**C12P 7/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2018 PCT/EP2018/077255**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2019 WO19072732**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2018 E 18782449 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2024 EP 3695001**

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

30 Prioridad:

**09.10.2017 EP 17195379**

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

**27.06.2024**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KROON, JOHANNES AUGUSTINUS y  
WOESTENBORGH, PIERRE LOUIS**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 974 426 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Proceso de hidrólisis enzimática de material lignocelulósico y fermentación de azúcares

5 Campo técnico de la invención

La solicitud se refiere a un proceso para preparar un producto del azúcar a partir de material lignocelulósico por hidrólisis enzimática y a un proceso para preparar un producto de fermentación por la fermentación de azúcares.

10 Antecedentes de la invención

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

15

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

20

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

25

Comúnmente, los microorganismos como la levadura convierten los azúcares en valiosos productos de fermentación, tal como el etanol. La fermentación tiene lugar en un paso de extracción separado, preferiblemente anaeróbico, en el mismo recipiente o en otro distinto. Durante la fermentación, la temperatura se ajusta entre 30 y 33 °C para favorecer el crecimiento y la producción de etanol por parte de los microorganismos, comúnmente levaduras. Durante el proceso de fermentación, el material celulósico restante es convertido en azúcares por las enzimas ya presentes desde el paso de hidrólisis, al tiempo que se produce biomasa microbiana y etanol. La fermentación finaliza cuando la materia celulósica se convierte en azúcares fermentables y todos los azúcares fermentables se convierten en etanol, dióxido de carbono y biomasa microbiana. Puede tardar hasta 6 días. En general, el tiempo total del proceso de hidrólisis y fermentación puede ascender hasta 13 días.

35

En general, el coste de la producción de enzimas es un factor de coste importante en el proceso global de producción de productos de fermentación a partir de material lignocelulósico (ver Kumar, S., *Chem. Eng. Technol.* 32 (2009), 517-526). Hasta ahora, la reducción de los costes de producción de enzimas se consigue al aplicar productos enzimáticos procedentes de una única o de múltiples fuentes microbianas (ver WO 2008/008793) con una actividad hidrolítica más amplia y/o más elevada (específicamente). Esto lleva a una necesidad de enzimas menor, tasas de conversión más rápidas y/o rendimientos de conversión mayores y, así, se reducen los costes globales de producción.

40

Junto a la optimización de las enzimas, la optimización del diseño del proceso es una herramienta crucial para reducir los costes globales de la producción de azúcares y productos de fermentación. Por ejemplo, la pérdida de azúcar por medio de productos de degradación del azúcar aumenta con la disminución del rendimiento. Dado que los productos de degradación del azúcar pueden inhibir la fermentación, el diseño del proceso se debe optimizar para disminuir la cantidad de estos productos de degradación del azúcar.

45

Ahi M. *et al.*, 2013 (*Chemical Engineering & Technology*, vol. 36(11): 1997-2005) reporta la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar optimizada para obtener concentraciones adecuadas de azúcares reductores e inhibidores (furfural y fenólicos) por pretratamiento de ácido diluido asistido por microondas y subsecuente tratamiento enzimático para la producción de bioetanol.

50

El documento de patente WO2016145350 A1 (15.09.2016) divulga un proceso de mejora de un rendimiento de glucosa o xilosa de sacarificación de un material lignocelulósico, que comprende el pretratamiento de dicho material lignocelulósico por explosión de vapor en presencia de ácido sulfúrico diluido a temperaturas de 180-200 °C por 4-5 minutos, seguido de (a) una primera etapa de sacarificación en un reactor continuo a ~ 20 % de materia seca, 50 °C y pH de 4,9-5,0 con una primera composición enzimática que comprende una xilanasa, una beta-xilosidasa y una endoglucanasa; y (b) una segunda etapa que comprende la combinación del material de la etapa (a) con una segunda composición enzimática que comprende una o más celulasas para formar un hidrolizado.

55

60

Por lo tanto, por razones económicas, es deseable incluir configuraciones de proceso nuevas e innovadoras destinadas a reducir los costes globales de producción en el proceso que involucra el pretratamiento, la hidrólisis y la fermentación del material lignocelulósico.

65

Breve descripción de la invención

Un objeto de la solicitud es proporcionar un proceso mejorado para la preparación de un producto de azúcar y/o un producto de fermentación a partir de material lignocelulósico. El proceso se mejora usando condiciones específicas de pretratamiento, hidrólisis y fermentación, como se indica en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada

A lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones que la acompañan, las palabras "comprende" e "incluye" y variaciones tales como "comprendido", "que comprende", "incluido" e "incluyendo" se deben interpretar de forma inclusiva. Es decir, estas palabras pretenden dar a entender la posible inclusión de otros elementos o números enteros no recitados específicamente, cuando el contexto lo permita. Los artículos "un" y "una" se usan en la presente para referirse a uno o más de uno (es decir, a uno o al menos a uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" puede significar un elemento o más de un elemento.

La presente solicitud se refiere a un proceso para la preparación de un producto del azúcar a partir de material lignocelulósico, que comprende los siguientes pasos: (a) pretratar el material lignocelulósico a una temperatura de 170 °C a 190 °C a un pH de 1,9 a 2,2, por 25 a 6 minutos; (b) hidrolizar enzimáticamente el material lignocelulósico pretratado con un peso de materia seca del 15 al 25 % (p/p) a una temperatura de 50 °C a 65 °C y un pH de 4 a 6 por 40 horas a 150 horas, usando un caldo de fermentación completo de un hongo filamentoso, dicho caldo comprende al menos una celobiohidrolasa, una endoglucanasa, una beta-glucosidasa, una xilanasa, una beta-xilosidasa y una oxigenasa lítica de monosacáridos; y (c) opcionalmente, recuperar el producto de azúcar. Los términos "producto del azúcar", "uno o más azúcares" o "azúcar" se usan indistintamente en la presente. Alternativamente, se puede usar el término "material lignocelulósico hidrolizado" en lugar de estos términos.

La presente solicitud también se refiere a un proceso para la preparación de un producto de fermentación a partir de material lignocelulósico, que comprende los pasos de (a) realizar un proceso para la preparación de un producto de azúcar a partir de material lignocelulósico como se describe en la presente, (b) fermentar el producto de azúcar para obtener el producto de fermentación, y (c) opcionalmente, recuperar el producto de fermentación. En una realización, la presente solicitud se refiere a un proceso para la preparación de un producto de fermentación a partir de material lignocelulósico, que comprende los siguientes pasos: (a) pretratar el material lignocelulósico a una temperatura de 170 °C a 190 °C a un pH de 1,9 a 2,2 por 25 a 6 minutos; (b) hidrolizar enzimáticamente el material lignocelulósico pretratado con un peso de materia seca del 15 al 25 % (p/p) a una temperatura de 50 °C a 65 °C y un pH de 4 a 6 por 40 horas a 150 horas usando un caldo de fermentación completo de un hongo filamentoso, dicho caldo comprende al menos una celobiohidrolasa, una endoglucanasa, una beta-glucosidasa, una xilanasa, una beta-xilosidasa y una oxigenasa lítica de monosacáridos, para obtener un material lignocelulósico hidrolizado; (c) fermentar el material lignocelulósico hidrolizado para obtener un producto de fermentación; y (d) opcionalmente, recuperar el producto de fermentación.

En una realización, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo en un reactor. La hidrólisis enzimática también se puede realizar en dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o incluso más reactores. Así pues, el término "reactor" no se limita a un único reactor, sino que se puede referir a varios reactores.

En los procesos descritos en la presente, el material lignocelulósico pretratado se añade al reactor en el que tiene lugar la hidrólisis enzimática. Esto se puede hacer por lotes, por lotes alimentados o de forma continua. En una realización, se añade una composición enzimática al reactor en el que tiene lugar la hidrólisis enzimática. Esto se puede hacer por lotes, por lotes alimentados o de forma continua. La composición enzimática puede ser una composición acuosa. En algunos aspectos, el material lignocelulósico hidrolizado y/o el material lignocelulósico parcialmente hidrolizado se recicla de nuevo al reactor en el que tiene lugar la hidrólisis enzimática. El material lignocelulósico hidrolizado y/o el material lignocelulósico parcialmente hidrolizado se pueden enfriar antes de añadirlos al reactor en el que tiene lugar la hidrólisis enzimática. El material lignocelulósico hidrolizado y/o el material lignocelulósico parcialmente hidrolizado se pueden someter a una separación sólido/líquido antes de su adición al reactor en el que tiene lugar la hidrólisis enzimática. La separación sólido/líquido se puede realizar antes del paso de extracción. En algunas alternativas solamente se enfría la fracción líquida obtenida tras la separación sólido/líquido. En otras alternativas, tanto la fracción líquida como la sólida se añaden al reactor en el que tiene lugar la hidrólisis enzimática.

En algunos aspectos, el tiempo total de hidrólisis enzimática es de 10 horas o más, 12 horas o más, 14 horas o más, 16 horas o más, 18 horas o más, 20 horas o más, 30 horas o más, 40 horas o más, 50 horas o más, 60 horas o más, 70 horas o más, 80 horas o más, 90 horas o más, 100 horas o más, 110 horas o más, 120 horas o más, 130 horas o más, 140 horas o más, 150 horas o más, 160 horas o más, 170 horas o más, 180 horas o más, 190 horas o más, 200 horas o más. En una realización, el tiempo de hidrólisis enzimática es de 40 a 150 horas.

En una realización, se añade oxígeno al material lignocelulósico pretratado durante la hidrólisis enzimática. Se puede añadir oxígeno durante al menos una parte de la hidrólisis enzimática. El oxígeno se puede añadir de forma continua o discontinua durante la hidrólisis enzimática. Se puede añadir oxígeno una o más veces durante el proceso de preparación de un producto del azúcar a partir de material lignocelulósico, como se describe en la presente. En una realización, el oxígeno se puede añadir durante el pretratamiento, durante la adición de material lignocelulósico (pretratado) a un reactor, durante la adición de enzimas a un reactor, durante la adición de material lignocelulósico hidrolizado y/o material

lignocelulósico parcialmente hidrolizado a un reactor, durante el enfriamiento del material lignocelulósico hidrolizado y/o del material lignocelulósico parcialmente hidrolizado, durante la separación sólido/líquido del material lignocelulósico hidrolizado y/o del material lignocelulósico parcialmente hidrolizado o cualquier combinación de los mismos. Se puede añadir oxígeno a los reactores que se usan en la hidrólisis enzimática.

5

El oxígeno se puede añadir de varias formas. Por ejemplo, el oxígeno se puede añadir como gas oxígeno, gas enriquecido con oxígeno, tal como aire enriquecido con oxígeno, o aire. El oxígeno también se puede añadir por medio de la generación de oxígeno *in situ*.

10

Entre los ejemplos de cómo añadir oxígeno se incluyen, pero no se limitan a, la adición de oxígeno por medio de rociado, soplado, electrólisis, adición química de oxígeno, llenado de un reactor usado en la hidrólisis enzimática desde la parte superior (al sumergir el hidrolizado en el reactor y al introducir en consecuencia oxígeno en el hidrolizado) y adición de oxígeno al espacio de encabezamiento de un reactor. Cuando se añade oxígeno al espacio de encabezamiento del reactor, se puede suministrar el oxígeno suficiente necesario para la reacción de hidrólisis. En general, la cantidad de oxígeno añadida al reactor se puede controlar y/o variar. La restricción del oxígeno suministrado es posible al añadir solamente oxígeno durante parte del tiempo de hidrólisis en el reactor. Otra opción es añadir oxígeno a baja concentración, por ejemplo, usando una mezcla de aire y aire reciclado (aire que sale del reactor) o al "diluir" el aire con un gas inerte. El aumento de la cantidad de oxígeno añadido se puede lograr al añadir oxígeno por períodos más largos del tiempo de hidrólisis, al añadir el oxígeno a una concentración más alta o al añadir más aire. Otra forma de controlar la concentración de oxígeno es añadir un consumidor de oxígeno y/o un generador de oxígeno. Se puede introducir oxígeno en el material lignocelulósico (pretratado) presente en el reactor. También se puede introducir en el espacio de encabezamiento del reactor. Se puede insuflar oxígeno en el material lignocelulósico (pretratado) presente en el reactor. También se puede soplar en el espacio de encabezamiento del reactor.

15

20

25

Se puede añadir oxígeno al reactor usado en la hidrólisis enzimática antes y/o durante y/o después de añadir al reactor el material lignocelulósico pretratado. El oxígeno se puede introducir junto con el material lignocelulósico pretratado que entra en el reactor. El oxígeno se puede introducir en la corriente de material que entrará en el reactor o con parte del contenido del reactor que pasa por un bucle externo del reactor. Preferiblemente, el oxígeno se añade cuando el material lignocelulósico (pretratado) está presente en el reactor.

30

En una realización, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo en un reactor que tiene un volumen de 10-5000 m<sup>3</sup>, preferiblemente de 50-5000 m<sup>3</sup>. En caso de que se usen múltiples reactores en la hidrólisis enzimática de los procesos como se describe en la presente, pueden tener el mismo volumen, pero también pueden tener un volumen diferente.

35

En una realización, el reactor en el que se realiza la hidrólisis enzimática tiene una relación de altura/diámetro de 2:1 a 8:1.

40

En una realización, el pretratamiento se realiza en un reactor que tiene un volumen de 30-200 m<sup>3</sup>, preferiblemente de 100-150 m<sup>3</sup>. En caso de que se usen múltiples reactores en el pretratamiento de los procesos como se describe en la presente, pueden tener el mismo volumen, pero también pueden tener un volumen diferente.

En una realización, el reactor de pretratamiento usado en los procesos como se describe en la presente tiene una relación de altura/diámetro de 3:1 a 12:1.

45

La composición enzimática usada en el paso de licuefacción y/o en el paso de sacarificación de los procesos como se usa en la presente puede ser de un hongo, preferiblemente un hongo filamentoso. En algunos aspectos, las enzimas de la composición enzimática se derivan de un hongo, preferiblemente un hongo filamentoso, o las enzimas comprenden una enzima fúngica, preferiblemente una enzima fúngica filamentosa. Las enzimas usadas en la hidrólisis enzimática de los procesos como se describe en la presente se derivan de un hongo o las enzimas usadas en la hidrólisis enzimática de los procesos como se describe en la presente comprenden una enzima fúngica. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de las subdivisiones Eumycota y Oomycota (como se definen en Hawksworth *et al.*, In, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido). Los hongos filamentosos incluyen, pero no se limitan a *Acremonium*, *Agaricus*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Beauveria*, *Cephalosporium*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomium*, *Paecilomyces*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochiobolus*, *Coprinus*, *Cryptococcus*, *Cyathus*, *Emericella*, *Endothia*, *Endothia*, *Mucor*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Geosmithia*, *Gilocladium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Myrothecium*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pirromyces*, *Panerochaete*, *Pleurotus*, *Podospora*, *Pyricularia*, *Rasamsonia*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Scytladium*, *Schizophyllum*, *Stagonospora*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thermomyces*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes*, *Pleurotus*, *Trichoderma* y *Trichophyton*. En una realización preferida, el hongo es *Rasamsonia*, siendo el más preferido *Rasamsonia emersonii*. Por lo tanto, los procesos como se describen en la presente se aplican ventajosamente en combinación con enzimas derivadas de un microorganismo del género *Rasamsonia* o las enzimas usadas en los procesos como se usan en la presente comprenden una enzima de *Rasamsonia*.

50

55

60

65

Varias cepas de hongos filamentosos son fácilmente accesibles al público en una serie de colecciones de cultivos, tales como la American Type Culture Collection (ATCC, por sus siglas en inglés), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, por sus siglas en alemán), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS, por sus siglas en

neerlandés), y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL, por sus siglas en inglés).

5 Preferiblemente, los procesos descritos en la presente se realizan con enzimas termoestables. Una enzima "termoestable" como se usa en la presente significa que la enzima tiene una temperatura óptima de 50 °C o más, 60 °C o más, 70 °C o más, 75 °C o más, 80 °C o más, o incluso 85 °C o más. Se pueden, por ejemplo, aislar de microorganismos termófilos o diseñar por el experto y sintetizar artificialmente. En una realización, los polinucleótidos que codifican las enzimas termoestables se pueden aislar u obtener a partir de hongos filamentosos termófilos o termotolerantes o aislar a partir de hongos no termófilos o no termotolerantes, pero que resultan ser termoestables. Por "hongo termófilo" se entiende un hongo que crece a una temperatura de 50 °C o mayor. Por hongo "termotolerante" se entiende un hongo que crece a una temperatura de 45 °C o mayor, con un máximo cercano a los 50 °C.

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

25 *Rasamsonia* es un nuevo género que comprende especies termotolerantes y termófilas de *Talaromyces* y *Geosmithia*. Basados en datos fenotípicos, fisiológicos y moleculares, las especies *Talaromyces emersonii*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Talaromyces eburneus*, *Geosmithia argillacea* y *Geosmithia cylindrospora* se transfirieron al nuevo género *Rasamsonia*. *Talaromyces emersonii*, *Penicillium geosmithia emersonii* y *Rasamsonia emersonii* se usan indistintamente en la presente.

30 En los procesos como se describe en la presente se usan composiciones enzimáticas. En una realización, las composiciones son estables. Las "composiciones enzimáticas estables" como se usa en la presente significan que las composiciones enzimáticas retienen actividad después de 30 horas de tiempo de reacción de hidrólisis, preferiblemente al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de su actividad inicial después de 30 horas de tiempo de reacción de hidrólisis. En una realización, la composición enzimática conserva 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.

35 Las enzimas se pueden preparar por fermentación de un sustrato adecuado con un microorganismo adecuado, por ejemplo, *Rasamsonia emersonii* o *Aspergillus niger*, en donde las enzimas son producidas por el microorganismo. El microorganismo se puede alterar para mejorar o fabricar las enzimas. Por ejemplo, el microorganismo se puede mutar por procedimientos clásicos de mejora de cepas o por técnicas de ADN recombinante. Por lo tanto, los microorganismos mencionados en la presente se pueden usar tal como son para producir las enzimas o se pueden alterar para aumentar la producción o para producir enzimas alteradas que podrían incluir enzimas heterólogas, por ejemplo, celulasas, así como enzimas que no son producidas originalmente por ese microorganismo. Preferiblemente, se usa un hongo, más preferiblemente un hongo filamentosos, para producir las enzimas. Ventajosamente, se usa un microorganismo termófilo o termotolerante. Opcionalmente, se usa un sustrato que induce la expresión de las enzimas por el microorganismo productor de enzimas.

50 Las enzimas se usan para licuar el material lignocelulósico y/o liberar azúcares del material lignocelulósico que contiene polisacáridos. Los principales polisacáridos son las celulosas (glucanos) y las hemicelulosas (xilanos, heteroxilanos y xiloglucanos). Además, parte de la hemicelulosa puede estar presente en forma de glucomananos, por ejemplo, en el material lignocelulósico derivado de la madera. La hidrólisis enzimática de estos polisacáridos a azúcares solubles, incluidos tanto en monómeros como multímeros, por ejemplo, glucosa, celobiosa, xilosa, arabinosa, galactosa, fructosa, manosa, ramnosa, ribosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico y otras hexosas y pentosas, se produce bajo la acción de diferentes enzimas que actúan de forma concertada. Un producto del azúcar comprende azúcares solubles, incluidos tanto en monómeros como multímeros. En una realización, el producto de azúcar y/o el material lignocelulósico hidrolizado comprende glucosa, galactosa y arabinosa. Los ejemplos de otros azúcares son la celobiosa, la xilosa, la arabinosa, la galactosa, la fructosa, la manosa, la ramnosa, la ribosa, el ácido galacturónico, el ácido glucurónico y otras hexosas y pentosas. El producto del azúcar se puede usar tal como es o se puede someter a un proceso adicional, por ejemplo, de recuperación y/o purificación.

60 Además, las pectinas y otras sustancias pécticas tales como los arabinanos pueden constituir una proporción considerable de la masa seca de las paredes celulares típicas de los tejidos vegetales no leñosos (entre una cuarta parte y la mitad de la masa seca pueden ser pectinas). Asimismo, el material lignocelulósico puede contener lignina.

65 A continuación se describen con más detalle las enzimas que se pueden usar en los procesos como se usa en la presente.

Las monooxigenasas líticas de polisacáridos, endoglucanasas (EG) y exocelobiohidrolasas (CBH) catalizan la hidrólisis

de la celulosa insoluble en productos tales como celooligosacáridos (celobiosa como producto principal), mientras que las  $\beta$ -glucosidasas (BG) convierten los oligosacáridos, principalmente celobiosa y celotriosa, en glucosa (por sus siglas en inglés, respectivamente).

- 5 Las xilanasas, junto con otras enzimas accesorias, como las  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas, las feruloilo y acetilxilano esterases, las glucuronidasas y las  $\beta$ -xilosidasas, catalizan la hidrólisis de la hemicelulosa.

Una composición enzimática para usar en los procesos como se describe en la presente puede comprender al menos dos actividades, aunque típicamente una composición comprenderá más de dos actividades, por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o incluso más actividades. Típicamente, una composición enzimática para usar en los procesos como se usa en la presente comprende al menos dos celulasas. Las al menos dos celulasas pueden tener actividades iguales o diferentes. La composición enzimática para usar en los procesos como se usa en la presente también puede comprender al menos una enzima distinta de una celulasa. Preferiblemente, la al menos otra enzima tiene una actividad enzimática auxiliar, es decir, una actividad adicional que, directa o indirectamente, lleva a la degradación de la lignocelulosa. Los ejemplos de tales actividades auxiliares se mencionan en la presente e incluyen, pero no se limitan a, las hemicelulasas. Una composición enzimática para usar en los procesos como se describe en la presente comprende al menos una monooxigenasa lítica de polisacáridos (LPMO, por sus siglas en inglés), una endoglucanasa (EG), una celobiohidrolasa (CBH), una xilanasas, una beta-xilosidasa (BX, por sus siglas en inglés) y una beta-glucosidasa (BG). Una composición enzimática puede comprender más de una actividad enzimática por clase de actividad. Por ejemplo, una composición puede comprender dos endoglucanasas, por ejemplo, una endoglucanasa con actividad endo-1,3(1,4)- $\beta$ -glucanasa y una endoglucanasa con actividad endo- $\beta$ -1,4-glucanasa.

Una composición para usar en los procesos como se describe en la presente se puede derivar de un hongo, tal como un hongo filamentoso, tal como de *Rasamsonia*, tal como de *Rasamsonia emersonii*. En un aspecto, al menos una de las enzimas se puede derivar de *Rasamsonia emersonii*. En un aspecto, la monooxigenasa polisacárida lítica y/o la beta-xilosidasa se derivan de *Rasamsonia emersonii*. Si es necesario, la enzima se puede complementar con enzimas adicionales de otras fuentes. Tales enzimas adicionales pueden proceder de fuentes clásicas y/o ser producidas por organismos modificados genéticamente.

Además, las enzimas de las composiciones enzimáticas para usar en los procesos como se usa en la presente pueden ser capaces de trabajar a un pH bajo. A efectos de la presente invención, un pH bajo indica un pH de 5,5 o menor, 5 o menor, 4,9 o menor, 4,8 o menor, 4,7 o menor, 4,6 o menor, 4,5 o menor, 4,4 o menor, 4,3 o menor, 4,2 o menor, 4,1 o menor, 4,0 o menor, 3,9 o menor, 3,8 o menor, 3,7 o menor, 3,6 o menor, 3,5 o menor.

La composición enzimática para usar en los procesos como se describe en la presente puede comprender una celulasa y/o una hemicelulasa y/o una pectinasa de *Rasamsonia*. También pueden comprender una celulasa y/o una hemicelulasa y/o una pectinasa de una fuente distinta de *Rasamsonia*. Se pueden usar junto con una o más enzimas de *Rasamsonia* o se pueden usar sin que haya enzimas de *Rasamsonia* adicionales.

Una composición enzimática para usar en los procesos como se describe en la presente comprende una monooxigenasa lítica de polisacáridos, una endoglucanasa, una celobiohidrolasa I (CBHI), una celobiohidrolasa II (CBHII), una beta-glucosidasa, una endoxilanasas (EX) y una beta-xilosidasa (por sus siglas en inglés, respectivamente).

Una composición enzimática para usar en los procesos como se describe en la presente puede comprender un tipo de actividad celulasa y/o actividad hemicelulasa y/o actividad pectinasa proporcionada por una composición como se describe en la presente, y un segundo tipo de actividad celulasa y/o actividad hemicelulasa y/o actividad pectinasa proporcionada por una celulasa/hemicelulasa/pectinasa adicional.

Como se usa en la presente, una celulasa es cualquier polipéptido capaz de degradar o modificar la celulosa. Un polipéptido capaz de degradar la celulosa es aquel capaz de catalizar el proceso de descomposición de la celulosa en unidades más pequeñas, ya sea parcialmente, por ejemplo, en celodextrinas, o completamente en monómeros de glucosa. Una celulasa como la descrita en la presente puede dar lugar a una población mixta de celodextrinas y monómeros de glucosa. Tal degradación típicamente tiene lugar por medio de una reacción de hidrólisis.

Como se usa en la presente, una hemicelulasa es cualquier polipéptido capaz de degradar o modificar la hemicelulosa. Es decir, una hemicelulasa puede ser capaz de degradar o modificar uno o más de los xilanos, glucuronoxilanos, arabinoxilanos, glucomanos y xiloglucanos. Un polipéptido capaz de degradar una hemicelulosa es aquel capaz de catalizar el proceso de descomposición 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 como la descrita en la presente puede dar lugar a una población mixta de oligosacáridos y monómeros de azúcar. Tal degradación típicamente tiene lugar por medio de una reacción de hidrólisis.

Como se usa en la presente, una pectinasa es cualquier polipéptido capaz de degradar o modificar la pectina. Un polipéptido capaz de degradar la pectina es aquel capaz de catalizar el proceso de descomposición de la pectina en unidades más pequeñas, ya sea parcialmente, por ejemplo, en oligosacáridos, o completamente en monómeros de azúcar. Una pectinasa como la descrita en la presente puede dar lugar a una población mixta de oligosacáridos y

monómeros de azúcar. Tal degradación típicamente tiene lugar por medio de una reacción de hidrólisis.

Por consiguiente, una composición enzimática para usar en los procesos descritos en la presente puede comprender una o más de las siguientes enzimas, una monooxigenasa lítica de polisacáridos (por ejemplo, GH61), una celobiohidrolasa, una endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, una beta-glucosidasa y una  $\beta$ -(1,3)(1,4)-glucanasa. Una composición para usar en los procesos como se describe en la presente también puede comprender una o más hemicelulasas, por ejemplo, una endoxilanasas, una  $\beta$ -xitosidasa, una  $\alpha$ -L-arabionofuranosidasa, una  $\alpha$ -D-glucuronidasa, una acetilxilano esterasa, una feruloilo esterasa, una cumaroilo esterasa, una  $\alpha$ -galactosidasa, una  $\beta$ -gatactosidasa, una  $\beta$ -mananasa y/o una  $\beta$ -mannosidasa. Una composición para usar en los procesos como se describe en la presente también puede comprender una o más pectinasas, por ejemplo, una endopoligalacturonasa, una pectina-metilo esterasa, una endogalactanasa, una beta-galactosidasa, una pectina-acetilo esterasa, una endopectina liasa, pectato liasa, alfa-ramnosidasa, una exogalacturonasa, una expoligalacturonato liasa, una ramnogalacturonano hidrolasa, una ramnogalacturonano liasa, una ramnogalacturonano-acetilo esterasa, una ramnogalacturonano-galacturono hidrolasa y/o una xilogalacturonasa. Además, una o más de las siguientes enzimas, una amilasa, una proteasa, una lipasa, una ligninasa, una hexosiltransferasa, una glucuronidasa, una expansina, una proteína inducida por celulosa o una proteína integradora de celulosa o proteína similar pueden estar presentes en una composición para usar en los procesos como se describe en la presente (éstas son referidas como actividades auxiliares anteriormente).

Como se usa en la presente, las monooxigenasas líticas de polisacáridos son enzimas que han sido clasificadas recientemente por el CAZy en la familia AA9 (familia de actividad auxiliar 9) o en la familia AA10 (familia de actividad auxiliar 10), (por sus siglas en inglés, respectivamente). Por lo tanto, existen AA9 monooxigenasas líticas de polisacáridos y AA10 monooxigenasas líticas de polisacáridos. Las monooxigenasas líticas de polisacáridos son capaces de abrir una estructura cristalina de glucano y potenciar la acción de las celulasas sobre sustratos de lignocelulosa. Son enzimas que potencian la actividad celulolítica. Las monooxigenasas líticas de polisacáridos también pueden afectar a los celooligosacáridos. De acuerdo con la literatura más reciente, (ver Isaksen *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 5, p. 2632-2642), las proteínas denominadas GH61 (familia de las glucósido hidrolasas 61 o a veces EGIV, por sus siglas en inglés, respectivamente) son monooxigenasas líticas de polisacáridos. GH61 fue clasificada originalmente como endoglucanasa basada en la medición de una actividad endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa muy débil en un miembro de la familia, pero recientemente ha sido reclasificada por CAZy en la familia AA9. El CBM33 (módulo de unión a carbohidratos de la familia 33, por sus siglas en inglés) también es una monooxigenasa lítica de polisacáridos (ver Isaksen *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 5, pp. 2632-2642). CAZy ha reclasificado recientemente el CBM33 en la familia AA10.

La monooxigenasa lítica de polisacáridos puede comprender una monooxigenasa lítica de polisacáridos AA9. Esto significa que al menos una de las monooxigenasas líticas de polisacáridos de la composición enzimática es una monooxigenasa lítica de polisacáridos AA9. En una realización, todas las monooxigenasas líticas de polisacáridos de la composición enzimática son monooxigenasas líticas de polisacáridos AA9.

La composición enzimática puede comprender una monooxigenasa lítica de polisacáridos de *Thermoascus*, tal como de *Thermoascus aurantiacus*, como se describe en WO 2005/074656 como SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 1 en WO2014/130812 y en WO 2010/065830; o de *Thielavia*, tal como de *Thielavia terrestris*, como se describe en WO 2005/074647 como SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 4 en WO2014/130812 y en WO 2008/148131, y WO 2011/035027; o de *Aspergillus*, tal como de *Aspergillus fumigatus*, como se describe en WO 2010/138754 como SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 en WO2014/130812; o de *Penicillium*, tal como de *Penicillium emersonii*, como se divulga como SEQ ID NO: 2 en WO 2011/041397 o SEQ ID NO: 2 en WO2014/130812. Otras monooxigenasas líticas de polisacáridos adecuadas incluyen, pero no se limitan a, *Trichoderma reesei* (ver WO 2007/089290), *Myceliophthora thermophila* (ver WO 2009/085935, WO 2009/085859, WO 2009/085864, WO 2009/085868), *Penicillium pinophilum* (ver WO 2011/005867), *Thermoascus sp.* (ver WO 2011/039319) y *Thermoascus crustaceus* (ver WO 2011/041504). Otras enzimas celulolíticas que se pueden incluir en la composición enzimática se describen en WO 98/13465, WO 98/015619, WO 98/015633, WO 99/06574, WO 99/10481, WO 99/025847, WO 99/031255, WO 2002/101078, WO 2003/027306, WO 2003/052054, WO 2003/052055, WO 2003/052056, WO 2003/052057, WO 2003/052118, WO 2004/016760, WO 2004/043980, WO 2004/048592, WO 2005/001065, WO 2005/028636, WO 2005/093050, WO 2005/093073, WO 2006/074005, WO 2006/117432, WO 2007/071818, WO 2007/071820, WO 2008/008070, WO 2008/008793, US 5,457,046, US 5,648,263 y US 5,686,593, por citar solamente algunos. Preferiblemente, la monooxigenasa lítica de polisacáridos es de *Rasamsonia*, por ejemplo, *Rasamsonia emersonii* (ver WO 2012/000892).

Como se usa en la presente, las endoglucanasas son enzimas capaces de catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,4- $\beta$ -D-glucosídicos en celulosa, liquenina o  $\beta$ -D-glucanos de cereales. Pertenecen a la EC 3.2.1.4 (por sus siglas en inglés) y también pueden ser capaces de hidrolizar enlaces 1,4 en  $\beta$ -D-glucanos que también contienen enlaces 1,3. Las endoglucanasas también se pueden referir como celulasas, avicelasas,  $\beta$ -1,4-endoglucano hidrolasas,  $\beta$ -1,4-glucanasas, carboximetilcelulasas, celudextrinasas, endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasas, endo-1,4- $\beta$ -D-glucano hidrolasas o endo-1,4- $\beta$ -glucanasas.

La endoglucanasa comprende una endoglucanasa GH5 y/o una endoglucanasa GH7. Esto significa que al menos una de las endoglucanasas de la composición enzimática es una endoglucanasa GH5 o una endoglucanasa GH7. En caso de que haya más endoglucanasas en la composición enzimática, estas endoglucanasas pueden ser endoglucanasas GH5, endoglucanasas GH7 o una combinación de endoglucanasas GH5 y endoglucanasas GH7. En una realización preferida,

la endoglucanasa comprende una endoglucanasa GH5.

La composición enzimática puede comprender una endoglucanasa de *Trichoderma*, tal como de *Trichoderma reesei*; de *Humicola*, tal como una cepa de *Humicola insolens*; de *Aspergillus*, tal como de *Aspergillus aculeatus* o *Aspergillus kawachii*; de *Erwinia*, tal como de *Erwinia carotovora*; de *Fusarium*, tal como de *Fusarium oxysporum*; de *Thielavia*, tal como de *Thielavia terrestris*; de *Humicola*, tal como de *Humicola grisea* var. *thermoidea* o *Humicola insolens*; de *Melanocarpus*, tal como de *Melanocarpus albomyces*; de *Neurospora*, tal como de *Neurospora crassa*; de *Myceliophthora*, tal como de *Myceliophthora thermophila*; de *Cladorrhinum*, tal como de *Cladorrhinum foecundissimum*; y/o de *Chrysosporium*, tal como una cepa de *Chrysosporium lucknowense*. Preferiblemente, la endoglucanasa procede de *Rasamsonia*, tal como una cepa de *Rasamsonia emersonii* (ver WO 01/70998). En una realización incluso una endoglucanasa bacteriana puede ser usada que incluye, pero no se limita a, endoglucanasa de *Acidothermus cellulolyticus* (ver WO 91/05039; WO 93/15186; US 5,275,944; WO 96/02551; US 5,536,655, WO 00/70031, WO 05/093050); endoglucanasa III de *Thermobifida fusca* (ver WO 05/093050); y endoglucanasa V de *Thermobifida fusca* (ver WO 05/093050).

Como se usa en la presente, las beta-xilosidasas (EC 3.2.1.37) son polipéptidos capaces de catalizar la hidrólisis de 1,4-β-D-xilanos, para eliminar los residuos sucesivos de D-xilosa de los terminales no reductores. Las beta-xilosidasas también pueden hidrolizar la xilobiosa. La beta-xilosidasa también se puede referir como xilano-1,4-β-xilosidasa, 1,4-β-D-xilano-xilohidrolasa, exo-1,4-β-xilosidasa o xilobiasa.

La beta-xilosidasa puede comprender una beta-xilosidasa GH3. Esto significa que al menos una de las beta-xilosidasas de la composición enzimática es una beta-xilosidasa GH3. En algunos aspectos, todas las beta-xilosidasas de la composición enzimática son beta-xilosidasas GH3.

La composición enzimática puede comprender una beta-xilosidasa de *Neurospora crassa*, *Aspergillus fumigatus* o *Trichoderma reesei*. En una realización preferida, la composición enzimática comprende una beta-xilosidasa de *Rasamsonia*, tal como de *Rasamsonia emersonii* (ver WO 2014/118360).

Como se usa en la presente, una endoxilanasas (EC 3.2.1.8) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,4-β-D-xilosídicos en xilanos. Esta enzima también se puede referir como endo-1,4-β-xilanasas o 1,4-β-D-xilano-hidrolasa. Una alternativa es la EC 3.2.1.136, una endoxilanasas de glucuronoarabinoxilano, una enzima capaz de hidrolizar enlaces 1,4-xilosídicos en glucuronoarabinoxilanos.

En algunos aspectos, la endoxilanasas puede comprender una xilanasas GH10. Esto significa que al menos una de las endoxilanasas de la composición enzimática es una xilanasas GH10. En una realización, todas las endoxilanasas de la composición enzimática son xilanasas GH10.

La composición enzimática puede comprender una endoxilanasas de *Aspergillus aculeatus* (ver WO 94/21785), *Aspergillus fumigatus* (ver WO 2006/078256), *Penicillium pinophilum* (ver WO 2011/041405), *Penicillium sp.* (ver WO 2010/126772), *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (ver WO 2009/079210), *Talaromyces leycettanus*, *Thermobifida fusca* o *Trichophaea saccata* GH10 (ver WO 2011/057083). En una realización preferida, la composición enzimática comprende una endoxilanasas de *Rasamsonia*, tal como de *Rasamsonia emersonii* (ver WO 02/24926).

Como se usa en la presente, una beta-glucosidasas (EC 3.2.1.21) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la hidrólisis de residuos β-D-glucosa terminales, no reductores, con liberación de β-D-glucosa. Tal polipéptido puede tener una amplia especificidad para β-D-glucósidos y también puede hidrolizar uno o más de los siguientes: un β-D-galactósido, un α-L-arabinósido, un β-D-xilósido o un β-D-fucósido. Esta enzima también se puede referir como amigdalasa, β-D-glucósido glucohidrolasa, celobiasa o gentobiasa.

En algunos aspectos, la composición enzimática comprende una beta-glucosidasas de *Aspergillus*, tal como de *Aspergillus oryzae*, como se divulga en WO 02/095014 o la proteína de fusión con actividad beta-glucosidasas divulgada en WO 2008/057637, o *Aspergillus fumigatus*, tal como la divulgada como SEQ ID NO:2 en WO 2005/047499 o SEQ ID NO:5 en WO 2014/130812 o una variante de beta-glucosidasas de *Aspergillus fumigatus*, como se divulga en WO 2012/044915, tal como una con las siguientes sustituciones: F100D, S283G, N456E, F512Y (usando SEQ ID NO: 5 en WO 2014/130812 para la numeración), o *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus kawachii*. En otra realización, la beta-glucosidasas se deriva de *Penicillium*, tal como de *Penicillium brasilianum* divulgada como SEQ ID NO:2 en WO 2007/019442, o de *Trichoderma*, tal como de *Trichoderma reesei*, como se describe en US 6,022,725, US 6,982,159, US 7,045,332, US 7,005,289, US 2006/0258554 US 2004/0102619. Incluso se puede usar una beta-glucosidasas bacteriana. La beta-glucosidasas se puede derivar de *Thielavia terrestris* (WO 2011/035029) o de *Trichophaea saccata* (WO 2007/019442). Preferiblemente, la composición enzimática comprende una beta-glucosidasas de *Rasamsonia*, tal como de *Rasamsonia emersonii* (ver WO 2012/000886).

Como se usa en la presente, una celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la hidrólisis de enlaces 1,4-β-D-glucosídicos en celulosa o celotetraosa, liberando celobiasa de los extremos de las cadenas. Esta enzima también se puede referir como celulasa 1,4-β-celobiosidasas, 1,4-β-celobiohidrolasa, 1,4-β-D-glucano celobiohidrolasa, avicelasa, exo-1,4-β-D-glucanasas, exocelobiohidrolasa o exoglucanasas.

La composición enzimática puede comprender una celobiohidrolasa I de *Aspergillus*, tal como de *Aspergillus fumigatus*, tal como la Cel7A CBH I divulgada como SEQ ID NO: 6 en WO 2011/057140 o SEQ ID NO: 6 en WO 2014/130812; de *Trichoderma*, tal como de *Trichoderma reesei*; de *Chaetomium*, tal como de *Chaetomium thermophilum*; de *Talaromyces*, tal como de *Talaromyces leycettanus* o de *Penicillium*, tal como de *Penicillium emersonii*. En una realización preferida, la composición enzimática comprende una celobiohidrolasa I de *Rasamsonia*, tal como de *Rasamsonia emersonii* (ver WO 2010/122141).

En algunos aspectos, la composición enzimática comprende una celobiohidrolasa II de *Aspergillus*, tal como de *Aspergillus fumigatus*, tal como la de SEQ ID NO: 7 en WO 2014/130812 o de *Trichoderma*, tal como de *Trichoderma reesei*, o de *Talaromyces*, tal como de *Talaromyces leycettanus*, o de *Thielavia*, tal como de *Thielavia terrestris*, tal como la celobiohidrolasa II CEL6A de *Thielavia terrestris*. En una realización preferida, la composición enzimática comprende una celobiohidrolasa II de *Rasamsonia*, tal como de *Rasamsonia emersonii* (ver WO 2011/098580).

La composición enzimática también puede comprender II una o más de las enzimas mencionadas a continuación.

Como se usa en la presente, una  $\beta$ -(1,3)(1,4)-glucanasa (EC 3.2.1.73) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la hidrólisis de uniones 1,4- $\beta$ -D-glucosídicas en  $\beta$ -D-glucanos con enlaces 1,3 y 1,4. Tal polipéptido puede actuar sobre la liquenina y los  $\beta$ -D-glucanos de los cereales, pero no sobre los  $\beta$ -D-glucanos que contienen solamente enlaces 1,3 o 1,4. Esta enzima también se puede referir como liqueninasa, 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucano 4-glucanohidrolasa,  $\beta$ -glucanasa, endo- $\beta$ -1,3-1,4 glucanasa, liquenasa o  $\beta$ -glucanasa de enlace mixto. Una alternativa para este tipo de enzima es la EC 3.2.1.6, que se describe como endo-1,3(4)-beta-glucanasa. Este tipo de enzima hidroliza los enlaces 1,3 o 1,4 de la beta-D-glucanosa cuando el residuo de glucosa cuyo grupo reductor está involucrado en el enlace que se va a hidrolizar está a su vez sustituido en C3. Los nombres alternativos son: endo-1,3-beta-glucanasa, laminarinasa, 1,3-(1,3;1,4)-beta-D-glucano 3(4) glucanohidrolasa. Entre los sustratos se encuentran la laminarina, la liquenina y los beta-D-glucanos de cereales.

Como se usa en la presente, una  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) es cualquier polipéptido capaz de actuar sobre  $\alpha$ -L-arabinofuranosidos,  $\alpha$ -L-arabinanos con enlaces (1,2) y/o (1,3) y/o (1,5), arabinoxilanos y arabinogalactanos. Esta enzima también se puede referir como  $\alpha$ -N-arabinofuranosidasa, arabinofuranosidasa o arabinosidasa. Los ejemplos de arabinofuranosidasas que pueden estar incluidas en la composición enzimática incluyen, pero no se limitan a, arabinofuranosidasas de *Aspergillus niger*, *Humicola insolens* DSM 1800 (ver WO 2006/114094 y WO 2009/073383) y *M. giganteus* (ver WO 2006/114094).

Como se usa en la presente, una  $\alpha$ -D-glucuronidasa (EC 3.2.1.139) es cualquier polipéptido capaz de catalizar una reacción de la siguiente forma:  $\alpha$ -D-glucuronósido + H<sub>2</sub>O = un alcohol + D-glucuronato. Esta enzima también se puede referir como  $\alpha$ -D-glucuronidasa o  $\alpha$ -D-glucosiduronasa. Estas enzimas también pueden hidrolizar el ácido glucurónico 4-O-metilado, que también puede estar presente como sustituyente en los xilanos. Una alternativa es la EC 3.2.1.131: xilano  $\alpha$ -1,2-glucuronosidasa, que cataliza la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -1,2-(4-O-metil)glucuronosilo. Los ejemplos de  $\alpha$ -D-glucuronidasas que pueden estar incluidas en la composición enzimática incluyen, pero no se limitan a,  $\alpha$ -D-glucuronidasas de *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Humicola insolens* (ver WO 2010/014706), *Penicillium aurantiogriseum* (ver WO 2009/068565) y *Trichoderma reesei*.

Como se usa en la presente, una acetil-xilano esterasa (EC 3.1.1.72) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la desacetilación de xilanos y xilooligosacáridos. Tal polipéptido puede catalizar la hidrólisis de grupos acetilo a partir de xilano polimérico, xilosa acetilada, glucosa acetilada, acetato de  $\alpha$ -naptilo o acetato de *p*-nitrofenilo pero, típicamente, no a partir de triacetilglicerol. Tal polipéptido típicamente no actúa sobre el manano acetilado o la pectina. Los ejemplos de acetilxilano esterasas que pueden estar incluidas en la composición enzimática incluyen, pero no se limitan a, acetilxilano esterasas de *Aspergillus aculeatus* (ver WO 2010/108918), *Chaetomium globosum*, *Chaetomium gracile*, *Humicola insolens* DSM 1800 (ver WO 2009/073709), *Hypocrea jecorina* (ver WO 2005/001036), *Myceliophthora thermophila* (ver WO 2010/014880), *Neurospora crassa*, *Phaeosphaeria nodorum* y *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (ver WO 2009/042846). Preferiblemente, la composición enzimática comprende una acetil-xilano esterasa de *Rasamsonia*, tal como de *Rasamsonia emersonii* (ver WO 2010/000888).

Como se usa en la presente, una feruloilo esterasa (EC 3.1.1.73) es cualquier polipéptido capaz de catalizar una reacción de la forma: feruloilo-sacárido + H<sub>2</sub>O = ferulato + sacárido. El sacárido puede ser, por ejemplo, un oligosacárido o un polisacárido. Típicamente puede catalizar la hidrólisis del grupo 4-hidroxi-3-metoxicinamoilo (feruloilo) de un azúcar esterificado, que usualmente es la arabinosa en sustratos "naturales". El acetato de *p*-nitrofenol y el ferulato de metilo típicamente son sustratos más pobres. Esta enzima también se puede referir como cinamoilo éster hidrolasa, ácido ferúlico esterasa o hidroxicinamoilo esterasa. También se puede referir como enzima accesorio de la hemicelulasa, ya que puede ayudar a las xilanasas y pectinasas a descomponer la hemicelulosa y la pectina de la pared celular vegetal. Los ejemplos de feruloilo esterasas (esterasas de ácido ferúlico) que pueden estar incluidas en la composición enzimática incluyen, pero no se limitan a, feruloilo esterasas de *Humicola insolens* DSM 1800 (ver WO 2009/076122), *Neosartorya fischeri*, *Neurospora crassa*, *Penicillium aurantiogriseum* (ver WO 2009/127729), y *Thielavia terrestris* (ver WO 2010/053838 y WO 2010/065448).

- 5 Como se usa en la presente, una cumaroilo esterasa (EC 3.1.1.73) es cualquier polipéptido capaz de catalizar una reacción de la forma: cumaroilo-sacárido + H<sub>2</sub>O = cumarato + sacárido. El sacárido puede ser, por ejemplo, un oligosacárido o un polisacárido. Esta enzima también se puede referir como *trans*-4-cumaroilo esterasa, *trans-p*-cumaroilo esterasa, *p*-cumaroilo esterasa o *p*-ácido cumárico esterasa. Esta enzima también pertenece a la EC 3.1.1.73, por lo que también se puede referir como feruloilo esterasa.
- 10 Como se usa en la presente, una α-galactosidasa (EC 3.2.1.22) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la hidrólisis de residuos α-D-galactosa terminales, no reductores, en α-D-galactósidos, incluidos oligosacáridos de galactosa, galactomananos, galactanos y arabinogalactanos. Tal polipéptido también puede ser capaz de hidrolizar α-D-fucósidos. Esta enzima también se puede referir como melibiasa.
- 15 Como se usa en la presente, una β-galactosidasa (EC 3.2.1.23) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la hidrólisis de residuos β-D-galactosa terminales no reductores en β-D-galactósidos. Tal polipéptido también puede ser capaz de hidrolizar α-L-arabinósidos. Esta enzima también se puede referir como exo-(1→4)-β-D-galactanasa o lactasa.
- 20 Como se usa en la presente, una β-mananasa (EC 3.2.1.78) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la hidrólisis aleatoria de enlaces 1,4-β-D-manosídicos en mananos, galactomananos y glucomananos. Esta enzima también se puede referir como manano endo-1,4-P-mannosidasa o endo-1,4-mananasa.
- 25 Como se usa en la presente, una β-manosidasa (EC 3.2.1.25) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la hidrólisis de residuos β-D-manosa terminales no reductores en β-D-manósidos. Esta enzima también se puede referir como mananasa o manasa.
- 30 Como se usa en la presente, una endopoligalacturonasa (EC 3.2.1.15) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la hidrólisis aleatoria de enlaces 1,4-α-D-galactosidurónicos en pectato y otros galacturonanos. Esta enzima también se puede referir como poligalacturonasa pectina despolimerasa, pectinasa, endopoligalacturonasa, pectolasa, pectina hidrolasa, pectina poligalacturonasa, poli-α-1,4-galacturónido glicanohidrolasa, endogalacturonasa, endo-D-galacturonasa o poli(1,4-α-D-galacturónido) glicanohidrolasa.
- 35 Como se usa en la presente, una pectina-metilo esterasa (EC 3.1.1.11) es cualquier enzima capaz de catalizar la reacción: pectina + n H<sub>2</sub>O = n metanol + pectato. La enzima también puede ser conocida como pectinesterasa, pectina demetoxilasa, pectina metoxilasa, pectina metilesterasa, pectasa, pectinoesterasa o pectina pectilhidrolasa.
- 40 Como se usa en la presente, una endogalactanasa (EC 3.2.1.89) es cualquier enzima capaz de catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,4-β-D-galactosídicos en arabinogalactanos. La enzima también puede ser conocida como arabinogalactano endo-1,4-β-galactosidasa, endo-1,4-β-galactanasa, galactanasa, arabinogalactanasa o arabinogalactano 4-β-D-galactano hidrolasa.
- 45 Como se usa en la presente, una pectina-acetilo esterasa se define como cualquier enzima que tiene una actividad acetilo esterasa que cataliza la desacetilación de los grupos acetilo en los grupos hidroxilo de los residuos GalUA de la pectina.
- 50 Como se usa en la presente, una endopectina liasa (EC 4.2.2.10) es cualquier enzima capaz de catalizar el escindido eliminativo del (1→4)-α-D-galacturonano metil éster para dar oligosacáridos con grupos 4-deoxi-6-O-metil-α-D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. La enzima también puede ser conocida como pectina liasa, pectina transeliminasa; endopectina liasa, polimetilgalacturónico transeliminasa, pectina metiltranseliminasa, pectoliasa, PL, PNL o PMGL o (1→4)-6-O-metil-α-D-galacturonano liasa (por sus siglas en inglés, respectivamente).
- 55 Como se usa en la presente, una pectato liasa (EC 4.2.2.2) es cualquier enzima capaz de catalizar el escindido eliminativo de (1→4)-α-D-galacturonano para dar oligosacáridos con grupos 4-deoxi-α-D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. La enzima también puede ser conocida como poligalacturónico transeliminasa, ácido péctico transeliminasa, poligalacturonato liasa, endopectina metiltranseliminasa, pectato transeliminasa, endogalacturonato transeliminasa, ácido péctico liasa, liasa péctica, α-1,4-D-endopoligalacturónico liasa, PGA liasa, PPasa-N, endo-α-1,4-poligalacturónico liasa, poligalacturónico liasa, pectina transeliminasa, poligalacturónico transeliminasa o (1→4)-α-D-galacturonano liasa (por sus siglas en inglés, respectivamente).
- 60 Como se usa en la presente, una alfa-ramnosidasa (EC 3.2.1.40) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la hidrólisis de residuos α-L-ramnosa terminales no reductores en α-L-ramnósidos o alternativamente en ramnogalacturonano. Esta enzima también puede ser conocida como α-L-ramnosidasa T, α-L-ramnosidasa N o α-L-ramnósido ramnoidrolasa.
- 65 Como se usa en la presente, la exogalacturonasa (EC 3.2.1.82) es cualquier polipéptido capaz de hidrolizar el ácido péctico desde el extremo no reductor, liberando digalacturonato. La enzima también puede ser conocida como exopoli-α-galacturonosidasa, exopoligalacturonosidasa o exopoligalacturanosidasa.
- Como se usa en la presente, la exogalacturonasa (EC 3.2.1.67) es cualquier polipéptido capaz de catalizar: (1,4-α-D-galacturónido)<sub>n</sub> + H<sub>2</sub>O = (1,4-α-D-galacturónido)<sub>n-1</sub> + D-galacturonato. La enzima también puede ser conocida como galacturano 1,4-α-galacturonidasa, exopoligalacturonasa, poli(galacturonato) hidrolasa, exo-D-galacturonasa, exo-D-

galacturonanasa, exopoli-D-galacturonasa o poli(1,4- $\alpha$ -D-galacturónido) galacturonohidrolasa.

Como se usa en la presente, la exopoligalacturonato liasa (EC 4.2.2.9) es cualquier polipéptido capaz de catalizar el escindido eliminativo del 4-(4-deoxi- $\alpha$ -D-galact-4-enuronosil)-D-galacturonato del extremo reductor del pectato, es decir, de la pectina desesterificada. Esta enzima puede ser conocida como pectato disacárido liasa, pectato exoliasa, ácido exopéctico transeeliminasa, exopectato liasa, ácido exopoligalacturónico-*trans*-eliminasa, PATE, exo-PATE, exo-PGL o (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-galacturonano reductor del extremo disacárido-liasa (por sus siglas en inglés, respectivamente).

Como se usa en la presente, la ramnogalacturonano hidrolasa es cualquier polipéptido capaz de hidrolizar el enlace entre el ácido galactosilurónico y el ramnopiranosilo de forma endo en estructuras de ramnogalacturonano estrictamente alternantes, consistentes en el disacárido [(1,2- $\alpha$ -L-ramnoil-(1,4)- $\alpha$ -galactosilurónico)].

Como se usa en la presente, la ramnogalacturonano liasa es cualquier polipéptido capaz de escindir enlaces  $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GalpA de forma endo en ramnogalacturonano por beta-eliminación (por sus siglas en inglés, respectivamente).

Como se usa en la presente, la ramnogalacturonano acetilo esterasa es cualquier polipéptido que cataliza la desacetilación de la cadena principal de residuos alternos de ramnosa y ácido galacturónico en el ramnogalacturonano.

Como se usa en la presente, la ramnogalacturonano galacturonohidrolasa es cualquier polipéptido capaz de hidrolizar ácido galacturónico desde el extremo no reductor de estructuras de ramnogalacturonano estrictamente alternantes de forma exo.

Como se usa en la presente, la xilogalacturonasa es cualquier polipéptido que actúa sobre el xilogalacturonano escindiendo la cadena principal del ácido galacturónico sustituido por  $\beta$ -xilosa de forma endo. Esta enzima también puede ser conocida como xilogalacturonano hidrolasa.

Como se usa en la presente, una  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) es cualquier polipéptido capaz de actuar sobre  $\alpha$ -L-arabinofuranosidos,  $\alpha$ -L-arabinanos con enlaces (1,2) y/o (1,3) y/o (1,5), arabinoxilanos y arabinogalactanos. Esta enzima también se puede referir como  $\alpha$ -N-arabinofuranosidasa, arabinofuranosidasa o arabinosidasa.

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

Una "proteasa" incluye enzimas que hidrolizan uniones peptídicas (peptidasas), así como enzimas que hidrolizan uniones entre péptidos y otros restos, tales como azúcares (glicopéptidasas). Muchas proteasas se caracterizan como EC 3.4 y son adecuadas para usar en los procesos como se describe en la presente. Algunos tipos específicos de proteasas son las proteasas de cisteína, que incluyen la pepsina y la papaína, y las proteasas de serina, que incluyen las quimotripsinas, las carboxipeptidasas y las metaloendopeptidasas.

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

Una "ligninasa" incluye enzimas que pueden hidrolizar o descomponer la estructura de los polímeros de lignina. Las enzimas que pueden descomponer la lignina incluyen lignina peroxidadas, manganeso peroxidadas, lacasas y feruloilo estererasas, y otras enzimas descritas en la técnica conocidas por despolimerizar o romper de otro modo los polímeros de lignina. También se incluyen las enzimas capaces de hidrolizar las uniones formadas entre los azúcares hemicelulósicos (especialmente la arabinosa) y la lignina. Las ligninasas incluyen, pero no se limitan a, el siguiente grupo de enzimas: lignina peroxidadas (EC 1.11.1.14), manganeso peroxidadas (EC 1.11.1.13), lacasas (EC 1.10.3.2) y feruloilo estererasas (EC 3.1.1.73).

Una "hexosiltransferasa" (2.4.1-) incluye las enzimas capaces de catalizar una reacción de transferasa, pero que también pueden catalizar una reacción de hidrólisis, por ejemplo, de celulosa y/o de productos de degradación de la celulosa. Un ejemplo de hexosiltransferasa que se puede usar es una  $\beta$ -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 la celulosa.

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

Las expansinas están implicadas en el desprendimiento de la estructura de la pared celular durante el crecimiento de las células vegetales. Se ha propuesto que las expansinas interrumpen la unión de hidrógeno entre la celulosa y otros polisacáridos de la pared celular sin tener actividad hidrolítica. De este modo, se cree que permiten el deslizamiento de

5 las fibras de celulosa y el agrandamiento de la pared celular. La swollenina, una proteína similar a la expansina, contiene un dominio N-terminal de la familia de módulos de unión a carbohidratos 1 (CBD, por sus siglas en inglés) y un dominio C-terminal similar a la expansina. Como se describe en la presente, una proteína similar a la expansina o una proteína similar a la 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.

10 Una proteína inducida por celulosa, por ejemplo, el producto polipeptídico del gen *cip1* o *cip2* o genes similares (ver Foreman *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278(34), 31988-31997, 2003), una proteína integradora de celulosa/celulosoma, por ejemplo, el producto polipeptídico del gen *cipA* o *cipC*, o una scaffoldina o una proteína similar a la scaffoldina. Las andafoldinas y las proteínas integradoras de la celulosa son subunidades integradoras multifuncionales que pueden organizar las subunidades celolíticas en un complejo multienzimático. Esto se consigue por la interacción de dos clases complementarias de dominios, es decir, un dominio de cohesión en la andamiaquina y un dominio de dockerina en cada unidad enzimática. La subunidad de scaffoldina también lleva un módulo de unión a la celulosa (CBM, por sus siglas en inglés) que media la unión del celulosoma a su sustrato. Una proteína integradora de andamiaje o celulosa puede comprender uno o ambos de tales dominios.

20 Una catalasa; el término "catalasa" significa una oxidorreductasa de peróxido de hidrógeno:peróxido de hidrógeno (EC 1.11.1.6 o EC 1.11.1.21) que cataliza la conversión de dos peróxidos de hidrógeno en oxígeno y dos aguas. La actividad de la catalasa se puede determinar controlando la degradación del peróxido de hidrógeno a 240 nm basado en la siguiente reacción:  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ . La reacción se lleva a cabo en 50 mM de fosfato pH 7,0 a 25 °C con 10,3 mM de sustrato ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y aproximadamente 100 unidades de enzima por mL. La absorbancia se controla espectrofotométricamente en 16-24 segundos, lo que debería corresponder a una reducción de la absorbancia de 0,45 a 0,4. Una unidad de actividad catalasa se puede expresar como un micromol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  degradado por minuto a pH 7,0 y 25 °C.

25 El término "amilasa", como se usa en la presente, se refiere a enzimas que hidrolizan enlaces alfa-1,4-glucosídicos en el almidón, tanto en la amilosa como en la amilopectina, tales como alfa-amilasa (EC 3.2.1.1), beta-amilasa (EC 3.2.1.2), glucano 1,4-alfa-glucosidasa (EC 3.2.1.3), glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa (EC 3.2.1.60), glucano 1,4-alfa-maltohexaosa (EC 3.2.1.98), glucano 1,4-alfa-maltotrihidrolasa (EC 3.2.1.116) y glucano 1,4-alfa-maltohidrolasa (EC 3.2.1.133), y enzimas que hidrolizan los enlaces alfa-1,6-glucosídicos, que son los puntos de ramificación en la amilopectina, tales como la pullulanasa (EC 3.2.1.41) y la dextrinasa limitante (EC 3.2.1.142).

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

40 Las enzimas se pueden producir exógenamente en microorganismos, levaduras, hongos, bacterias o plantas, y posteriormente aislar y añadir, por ejemplo, al material lignocelulósico. Alternativamente, la enzima se puede producir en una fermentación que usa material lignocelulósico (pretratado) (tal como rastrojo de maíz o paja de trigo) para proporcionar nutrición a un organismo que produce una(s) enzima(s). De este modo, las plantas que producen las enzimas pueden servir por sí mismas como material lignocelulósico y añadirlas al material lignocelulósico.

45 En los usos y procesos descritos en la presente, los componentes de las composiciones descritas anteriormente se pueden proporcionar concomitantemente (es decir, como una única composición *per se*) o por separado o secuencialmente.

50 De acuerdo con la invención, se usa un caldo de fermentación completo de un hongo filamentoso que comprende al menos una celobiohidrolasa, una endoglucanasa, una beta-glucosidasa, una xilanas, una beta-xilosidasa y una monooxigenasa lítica de polisacáridos para la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico pretratado.

55 La composición enzimática es preferiblemente un caldo de fermentación completo de *Rasamsonia*. El caldo de fermentación completo se puede preparar a partir de la fermentación de hongos filamentosos no recombinantes y/o recombinantes. En una realización, el hongo filamentoso es un hongo filamentoso recombinante que comprende uno o más genes que pueden ser homólogos o heterólogos al hongo filamentoso. En un aspecto el hongo filamentoso es un hongo filamentoso recombinante que comprende uno o más genes que pueden ser homólogos o heterólogos al hongo filamentoso en donde el uno o más genes codifican enzimas que pueden degradar un sustrato celulósico. El caldo de fermentación completo puede comprender cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente o cualquier combinación de los mismos.

60 Preferiblemente, la composición enzimática es un caldo de fermentación completo en donde se destruyen las células. El caldo de fermentación completo puede contener ácido(s) orgánico(s) (usado(s) para destruir las células), células destruidas y/o restos celulares, y medio de cultivo.

65 Generalmente, los hongos filamentosos se cultivan en un medio de cultivo celular adecuado para la producción de enzimas

capaces de hidrolizar un sustrato celulósico. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Se conocen en la técnica los medios de cultivo adecuados, los rangos de temperatura y otras condiciones adecuadas para el crecimiento y la producción de celulasa y/o hemicelulasa y/o pectinasa. El caldo de fermentación completo se puede preparar al cultivar los hongos filamentosos hasta la fase estacionaria y al mantener los hongos filamentosos bajo condiciones limitantes de carbono por un periodo de tiempo suficiente para expresar la una o más celulasas y/o hemicelulasas y/o pectinasas. Una vez que las enzimas, tales como celulasas y/o hemicelulasas y/o pectinasas, son secretadas por los hongos filamentosos en el medio de fermentación, se puede usar todo el caldo de fermentación. Todo el caldo de fermentación de la presente invención puede comprender hongos filamentosos. En algunas realizaciones, el caldo de fermentación completo comprende el contenido no fraccionado de los materiales de fermentación derivados al extremo de la fermentación. Típicamente, el caldo de fermentación completo comprende el medio de cultivo gastado y los restos celulares presentes después de que el hongo filamentosos haya crecido hasta la saturación, incubado bajo condiciones limitantes de carbono para permitir la síntesis de proteínas (particularmente, la expresión de celulasas y/o hemicelulasas y/o pectinasas). En algunas realizaciones, el caldo de fermentación completo comprende el medio de cultivo celular gastado, las enzimas extracelulares y los hongos filamentosos. En algunas realizaciones, los hongos filamentosos presentes en el caldo de fermentación completo se pueden lisar, permeabilizar o destruir usando métodos conocidos en la técnica para producir un caldo de fermentación completo destruido por células. En una realización, el caldo de fermentación completo es un caldo de fermentación completo destruido por células, en donde el caldo de fermentación completo que contiene las células de hongos filamentosos se lisan o se destruyen. En algunas realizaciones, las células se destruyen al lisar los hongos filamentosos por tratamiento químico y/o de pH para generar el caldo completo destruido por células de una fermentación de los hongos filamentosos. En algunas realizaciones, las células se destruyen al lisar los hongos filamentosos por tratamiento químico y/o de pH y al ajustar el pH de la mezcla de fermentación destruida por células a un pH adecuado. En una realización, todo el caldo de fermentación comprende un primer componente de ácido orgánico que comprende al menos un ácido orgánico de 1-5 carbonos y/o una sal del mismo y un segundo componente de ácido orgánico que comprende al menos un ácido orgánico de 6 o más carbonos y/o una sal del mismo. En una realización, el primer componente ácido orgánico es ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, una sal del mismo, o cualquier combinación del mismo y el segundo componente ácido orgánico es ácido benzoico, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido 4-metilvalérico, ácido fenilacético, una sal de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

El término "caldo de fermentación completo", como se usa en la presente, se refiere a una preparación producida por fermentación celular que no se somete a recuperación y/o purificación o lo hace de forma mínima. Por ejemplo, los caldos de fermentación completos se producen cuando los cultivos microbianos crecen hasta la saturación, se incuban bajo condiciones limitantes de carbono para permitir la síntesis de proteínas (por ejemplo, la expresión de enzimas por las células hospedadoras) y la secreción en el medio de cultivo celular. Típicamente, el caldo de fermentación completo no está fraccionado y comprende medio de cultivo celular gastado, enzimas extracelulares y células microbianas, preferiblemente no viables.

En caso necesario, se puede fraccionar todo el caldo de fermentación y usar uno o varios de los contenidos fraccionados. Por ejemplo, las células destruidas y/o los restos celulares se pueden eliminar de todo un caldo de fermentación para proporcionar una composición libre de estos componentes.

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

El caldo de fermentación completo, como se describe en la presente, es típicamente un líquido, pero puede contener componentes insolubles, tales como células destruidas, restos celulares, componentes del medio de cultivo y/o enzima(s) insoluble(s). En algunas realizaciones, se pueden eliminar los componentes insolubles para proporcionar un caldo de fermentación completo clarificado.

Todo el caldo de fermentación se puede complementar con una o más actividades enzimáticas que no se expresan endógenamente, o que se expresan a un nivel relativamente bajo por los hongos filamentosos, para mejorar la degradación del sustrato celulósico, por ejemplo, a azúcares fermentables tales como glucosa o xilosa. La(s) enzima(s) suplementaria(s) se puede(n) añadir como suplemento al caldo de fermentación completo y las enzimas pueden ser un componente de un caldo de fermentación completo separado, o pueden estar purificadas, o mínimamente recuperadas y/o purificadas.

El caldo de fermentación completo puede comprender un caldo de fermentación completo de una fermentación de un hongo filamentosos recombinante que sobreexpresa una o más enzimas para mejorar la degradación del sustrato celulósico. Alternativamente, el caldo de fermentación completo puede comprender una mezcla de un caldo de fermentación completo de una fermentación de un hongo filamentosos no recombinante y un hongo filamentosos recombinante que sobreexpresa una o más enzimas para mejorar la degradación del sustrato celulósico. En una realización, el caldo de fermentación completo comprende un caldo de fermentación completo de una fermentación de un hongo filamentosos que sobreexpresa beta-glucosidasa. Alternativamente, el caldo de fermentación completo para usar en los presentes métodos y composiciones reactivas puede comprender una mezcla de un caldo de fermentación completo de una fermentación de un hongo filamentosos no recombinante y un caldo de fermentación completo de una fermentación de un hongo filamentosos recombinante que sobreexpresa una beta-glucosidasa.

El material lignocelulósico como se usa en la presente incluye cualquier material lignocelulósico y/o hemicelulósico. El material lignocelulósico adecuado para usar en los procesos descritos en la presente incluye biomasa, por ejemplo, biomasa virgen y/o biomasa no virgen tal como biomasa agrícola, productos orgánicos comerciales, escombros de construcción y demolición, residuos sólidos municipales, papel usado y residuos de jardinería. Las formas comunes de biomasa incluyen árboles, arbustos y hierbas, trigo, paja de trigo, caña de azúcar, paja de caña, bagazo de caña de azúcar, *Panicum virgatum*, *Miscanthus*, caña energética, maíz, rastrojo de maíz, hojas de maíz, mazorcas de maíz, fibra de maíz, granos de maíz, tallos de canola, tallos de soja, sorgo dulce, productos y subproductos de la molienda de cereales tales como maíz, trigo y cebada (incluida la molienda húmeda y la molienda seca) a menudo denominados "salvado o fibra", granos secos de destilería, así como residuos sólidos urbanos, papel usado y residuos de jardinería. La biomasa también puede ser, pero no se limitan a, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos forestales, residuos sólidos urbanos, residuos de papel y residuos de fábricas de pasta y papel. La "biomasa agrícola" incluye ramas, arbustos, cañas, maíz y cáscaras de maíz, cultivos energéticos, bosques, frutas, flores, granos, hierbas, cultivos herbáceos, hojas, corteza, agujas, troncos, raíces, árboles jóvenes, cultivos leñosos de rotación corta, arbustos, hierbas de cambio, árboles, verduras, cáscaras de frutas, vides, pulpa de remolacha azucarera, plántulas de trigo, cáscaras de avena y maderas duras y blandas (sin incluir maderas con materiales deletéreos). Además, la biomasa agrícola incluye los materiales orgánicos residuales generados a partir de procesos agrícolas, incluidas las actividades agrícolas y forestales, incluyendo específicamente los residuos de madera forestal. La biomasa agrícola puede consistir en cualquiera de los elementos antes mencionados, ya sea individualmente o en cualquier combinación o mezcla de los mismos.

De acuerdo con la invención, el material lignocelulósico se pretrata antes de la hidrólisis enzimática. El pretratamiento se realiza por medio de modificación térmica y química: El material lignocelulósico se pretrata a una temperatura de 170 °C a 190 °C.

El material lignocelulósico se pretrata a un pH de 1,9 a 2,2.

El material lignocelulósico se pretrata de 2,5 a 6 minutos.

El material lignocelulósico se puede pretratar a una presión de 0,5 a 2,5 MPa(a) [5 a 25 bar(a)].

El material lignocelulósico se puede lavar. El material lignocelulósico se puede lavar después del pretratamiento. El paso de lavado se puede usar para eliminar compuestos solubles en agua que puedan actuar como inhibidores del paso de fermentación y/o hidrólisis. El paso de extracción se puede realizar de la manera conocida por el experto. Además del lavado, existen otros métodos de desintoxicación. El material lignocelulósico también se puede detoxificar por cualquiera (o cualquier combinación) de estos métodos que incluyen, pero no se limitan a, separación sólido/líquido, evaporación al vacío, extracción, adsorción, neutralización, sobrecalentamiento, adición de agentes reductores, adición de enzimas detoxificantes tales como lacasas o peroxidasas, adición de microorganismos capaces de detoxificar hidrolizados.

La composición enzimática usada en el proceso como se describe en la presente puede hidrolizar de manera extremadamente eficaz material lignocelulósico, por ejemplo, rastrojo de maíz, paja de trigo, paja de caña y/o bagazo de caña de azúcar, que posteriormente se puede convertir en un producto, tal como etanol, biogás, butanol, un plástico, un ácido orgánico, un disolvente, un suplemento alimenticio para animales, un producto farmacéutico, una vitamina, un aminoácido, una enzima o una materia prima química. Además, los productos intermedios de un proceso posterior a la hidrólisis, por ejemplo, el ácido láctico como producto intermedio en la producción de biogás, se pueden usar como bloques de construcción para otros materiales.

En un aspecto, la cantidad de enzima añadida (en la presente también denominada dosificación enzimática o carga enzimática) es baja. En un aspecto, la cantidad de enzima es de 0,1-10 mg de proteína/g de materia seca.

El pH durante la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico pretratado es de 4 a 6. La temperatura durante la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico pretratado es de 50 °C a 65 °C, preferiblemente de 55 °C a 65 °C.

El paso de extracción se puede realizar hasta que se libere entre el 70 % y el 90 %, preferiblemente entre el 70 % y el 95 %, más preferiblemente entre el 70 % y el 100 % del azúcar disponible en el material lignocelulósico.

La hidrólisis enzimática de un proceso como el descrito en la presente se lleva a cabo usando material lignocelulósico pretratado que tiene un peso de materia seca del 15 al 25 % (p/p).

Como se ha descrito anteriormente, la presente invención también se refiere a un proceso para la preparación de un producto de fermentación a partir de material lignocelulósico, que comprende los pasos de (a) realizar un proceso para la preparación de un producto de azúcar a partir de material lignocelulósico como se ha descrito anteriormente, (b) fermentar el producto de azúcar para obtener el producto de fermentación; y (c) opcionalmente, recuperar el producto de fermentación. Como se ha descrito anteriormente, el producto del azúcar también se puede denominar material lignocelulósico hidrolizado.

La fermentación se puede realizar en un reactor. En una realización, la fermentación también se puede realizar en dos,

tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o incluso más reactores. Así pues, el término "reactor" no se limita a un único reactor, sino que se puede referir a varios reactores.

5 La fermentación se puede realizar en un reactor con un volumen de 1-5000 m<sup>3</sup>. En caso de que se usen múltiples reactores en la fermentación de los procesos como se describe en la presente, pueden tener el mismo volumen, pero también pueden tener un volumen diferente.

En una realización, el reactor en el que se realiza la fermentación tiene una relación de altura/diámetro de 2:1 a 8:1.

10 La fermentación puede ser realizada por un microorganismo productor de alcohol para producir alcohol. La fermentación por un microorganismo productor de alcohol para producir alcohol se puede realizar en el mismo reactor en donde se lleva a cabo la hidrólisis. Preferiblemente, la fermentación por un microorganismo productor de alcohol para producir alcohol se realiza en un reactor separado.

15 En una realización, la fermentación la realiza una levadura. En una realización, el microorganismo productor de alcohol es una levadura. En una realización, el microorganismo productor de alcohol es capaz de fermentar al menos un azúcar C5 y al menos un azúcar C6. En una realización, la fermentación se realiza con una levadura capaz de convertir al menos un azúcar C5. En una realización, la solicitud se refiere a un proceso para la preparación de un producto de fermentación a partir de material lignocelulósico, que comprende los siguientes pasos: (a) pretratar el material lignocelulósico a una temperatura de 160 °C a 200 °C a un pH de 1,0 a 2,5 por 1 a 15 minutos; (b) hidrolizar enzimáticamente el material lignocelulósico pretratado con un peso de materia seca del 15 al 25 % (p/p) a una temperatura de 50 °C a 65 °C y un pH de 4 a 6 por 40 horas a 150 horas, usando un caldo de fermentación completo de un hongo filamentoso, dicho caldo comprende al menos una celobiohidrolasa, una endoglucanasa, una beta-glucosidasa, una xilanasas, una beta-xilosidasa y una monooxigenasa lítica de polisacáridos, para obtener un material lignocelulósico hidrolizado; (c) fermentar el material lignocelulósico hidrolizado para obtener un producto de fermentación; y (d) opcionalmente, recuperar el producto de fermentación, en donde el material lignocelulósico hidrolizado comprende glucosa, galactosa y arabinosa. En una realización, el material lignocelulósico hidrolizado comprende ácido acético, preferiblemente al 0,3 % (p/p) o más. En una realización, el material lignocelulósico hidrolizado comprende glicerol. En una realización, el material lignocelulósico hidrolizado comprende ácido acético, glicerol y un azúcar C6 y/o un azúcar C5. En una realización, el microorganismo usado para la fermentación fermenta ácido acético, glicerol y un azúcar C6 y/o un azúcar C5 a un producto de fermentación. En una realización, la levadura usada para la fermentación fermenta ácido acético, glicerol y un azúcar C6 y/o un azúcar C5 a un producto de fermentación. En una realización, la levadura usada para la fermentación fermenta ácido acético, glicerol y un azúcar C6 y/o un azúcar C5 a etanol. En una realización, el material lignocelulósico hidrolizado comprende Mn<sup>2+</sup>.

35 En otro aspecto, la solicitud incluye un proceso como se describe en la presente en el que se usa un microorganismo para la fermentación de una fuente de carbono que comprende azúcar(es), por ejemplo, glucosa, L-arabinosa, galactosa y/o xilosa. La fuente de carbono puede incluir cualquier oligohidrato o polímero de hidratos de carbono con unidades de L-arabinosa, galactosa, xilosa o glucosa, tal como, por ejemplo, lignocelulosa, xilanos, celulosa, almidón, arabinano y similares. Para la liberación de unidades de xilosa o glucosa a partir de tales carbohidratos, se pueden añadir al medio de fermentación carbohidrasas apropiadas (tales como xilanasas, glucanasas, amilasas y tales como) o pueden ser producidas por la célula hospedera modificada. En este último caso, la célula hospedera modificada puede ser modificada por ingeniería genética para producir y excretar tales carbohidrasas. Otra ventaja de usar fuentes oligo- o poliméricas de glucosa es que permite mantener una concentración baja de glucosa libre durante la fermentación, por ejemplo, usando cantidades limitantes de carbohidrasas. Esto, a su vez, prevendrá la represión de los sistemas necesarios para el metabolismo y el transporte de azúcares distintos de la glucosa, tales como la xilosa. En una realización, la célula hospedera modificada fermenta tanto la L-arabinosa (opcionalmente xilosa) como la glucosa, preferiblemente de forma simultánea, en cuyo caso se usa preferiblemente una célula hospedera modificada que sea insensible a la represión de la glucosa para prevenir el crecimiento diauxico. Además de una fuente de L-arabinosa, opcionalmente xilosa (y glucosa) como fuente de carbono, el medio de fermentación comprenderá además el ingrediente apropiado necesario para el crecimiento de la célula hospedera modificada.

50 El proceso de fermentación puede ser aeróbico o anaeróbico. Un proceso de fermentación anaerobia se define en la presente como un proceso de fermentación que se lleva a cabo en ausencia de oxígeno o en el que prácticamente no se consume oxígeno, preferiblemente 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 actúan como donantes y aceptores de electrones. En ausencia de oxígeno, el NADH (por sus siglas en inglés) producido en la glucólisis y la formación de biomasa, no puede ser oxidado por fosforilación oxidativa. Para resolver este problema, muchos microorganismos usan el piruvato o uno de sus derivados como aceptor de electrones e hidrógeno, regenerando por lo mismo el NAD<sup>+</sup>. Así, en un proceso de fermentación anaerobia preferido, el piruvato se usa como aceptor de electrones (e hidrógeno) y se reduce a productos de fermentación tales como etanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico, un aminoácido, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, butanol, un antibiótico β-lactámico y una cefalosporina. En una realización preferida, el proceso de fermentación es anaeróbico. Un proceso anaeróbico es ventajoso, ya que es más barato que los procesos aeróbicos: se necesita menos equipo especial. 65 Asimismo, se espera que los procesos anaerobios proporcionen un mayor rendimiento de productos que los procesos aerobios. Bajo condiciones aerobias, usualmente el rendimiento de biomasa es mayor que bajo condiciones anaerobias.

En consecuencia, usualmente bajo condiciones aerobias, el rendimiento esperado del producto es menor que bajo condiciones anaerobias.

5 En otro aspecto, el proceso de fermentación se realiza bajo condiciones limitantes de oxígeno. Más preferiblemente, el proceso de fermentación es aeróbico y bajo condiciones limitantes de oxígeno. Un proceso de fermentación con oxígeno limitado es un proceso en el que el consumo de oxígeno está limitado por la transferencia de oxígeno del gas al líquido. El grado de limitación 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 proceso bajo condiciones limitantes de oxígeno, la tasa de consumo de oxígeno es de al menos 5,5, más preferiblemente de al menos 6 y aún más preferiblemente de al menos 7 mmol/L/h. En una realización, la fermentación es anaeróbica.

15 El proceso de fermentación se realiza preferiblemente a una temperatura óptima para el microorganismo usado. Así, para la mayoría de las levaduras o células fúngicas, el proceso de fermentación se realiza a una temperatura menor a 42 °C, preferiblemente 38 °C o menor. En el caso de las células hospederas de levaduras u hongos filamentosos, el proceso de fermentación se realiza preferiblemente a una temperatura menor a 35, 33, 30 o 28 °C y a una temperatura mayor a 20, 22 o 25 °C. En una realización, la fermentación se lleva a cabo entre 25 °C y 35 °C.

20 En una realización, las fermentaciones se llevan a cabo con un microorganismo fermentador. En una realización de la invención, las fermentaciones alcohólicas (por ejemplo, etanol) de azúcares C5 se llevan a cabo con un microorganismo fermentador C5. En una realización de la invención, las fermentaciones alcohólicas (por ejemplo, etanol) de azúcares C6 se llevan a cabo con un microorganismo fermentador C5 o un microorganismo fermentador C6 comercial. Las levaduras comercialmente disponibles adecuadas para la producción de etanol incluyen, pero no se limitan a, BIOFERM™ AFT y XR (NABC-North American Bioproducts Corporation, GA, USA), levadura ETHANOL RED™ (Fermentis/Lesaffre, EE. UU.), FALI™ (Fleischmann's Yeast, EE. UU.), FERMIO™ (DSM Specialties), GERT STRAND™ (Gert Strand AB, Suecia), y SUPERSTART™ y THERMOSACC™ levadura fresca (Ethanol Technology, WI, EE. UU.).

30 En una realización, el microorganismo productor de alcohol es un microorganismo capaz de fermentar al menos un azúcar C5. Preferiblemente, también es capaz de fermentar al menos un azúcar C6. En una realización, la solicitud describe un proceso para la preparación de etanol a partir de material lignocelulósico, que comprende los pasos de (a) realizar un proceso para la preparación de un producto de azúcar a partir de material lignocelulósico como se ha descrito anteriormente, (b) fermentar el producto de azúcar para producir etanol; y (c) opcionalmente, recuperar el etanol. La fermentación se puede realizar con una levadura capaz de fermentar al menos un azúcar C5.

35 El microorganismo usado en la fermentación puede ser procariota o eucariota. El microorganismo usado puede ser un microorganismo modificado por ingeniería genética. Los ejemplos de microorganismos adecuados son levaduras, por ejemplo, *Saccharomyces*, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus* o *Saccharomyces uvarum*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, por ejemplo, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia*, por ejemplo, *Pichia stipites* o *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces*, por ejemplo, *Kluyveromyces fragilis*, *Candida*, por ejemplo, *Candida pseudotropicalis* o *Candida acidothermophilum*, *Pachysolen*, por ejemplo, *Pachysolen tannophilus* o bacterias, por ejemplo, *Lactobacillus*, por ejemplo, *Lactobacillus lactis*, *Geobacillus*, *Zymomonas*, por ejemplo, *Zymomonas mobilis*, *Clostridium*, por ejemplo, *Clostridium phytofermentans*, *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Klebsiella*, por ejemplo, *Klebsiella oxytoca*. En una realización, el microorganismo capaz de fermentar al menos un azúcar C5 es una levadura. En una realización, la levadura pertenece al género *Saccharomyces*, preferiblemente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, usada en los procesos como se describe en la presente es capaz de convertir azúcares hexosas (C6) y pentosas (C5). La levadura, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, usada en los procesos como se usa en la presente puede fermentar anaeróticamente al menos un azúcar C6 y al menos un azúcar C5. En una realización, la levadura como se describe en la presente es capaz de usar L-arabinosa y xilosa además de glucosa anaeróticamente. En una realización, la levadura es capaz de convertir la L-arabinosa en L-ribulosa y/o xilulosa 5-fosfato y/o en un producto de fermentación deseado, por ejemplo, en etanol. Los organismos, por ejemplo, las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, capaces de producir etanol a partir de L-arabinosa se pueden producir modificando una levadura hospedera al introducir los genes *araA* (L-arabinosa isomerasa), *araB* (L-ribuloglioxalato) y *araD* (L-ribulosa-5-P4-epimerasa) de una fuente adecuada. Tales genes se pueden introducir en una célula hospedera para que sea capaz de usar arabinosa. Tal enfoque se describe en WO2003/095627. Se pueden usar genes *araA*, *araB* y *araD* de *Lactobacillus plantarum*, como se divulga en WO2008/041840. Se pueden usar el gen *araA* de *Bacillus subtilis* y los genes *araB* y *araD* de *Escherichia coli*, que se divulgan en EP1499708. En otra realización, los genes *araA*, *araB* y *araD* se pueden derivar de al menos uno de los géneros *Clavibacter*, *Arthrobacter* y/o *Gramella*, en particular uno de *Clavibacter michiganensis*, *Arthrobacter aurescens*, y/o *Gramella forsetii*, como se divulga en WO 2009011591. En una realización, la levadura también puede comprender una o más copias del gen de la xilosa isomerasa y/o una o más copias de la xilosa reductasa y/o xilitol deshidrogenasa.

60 La levadura puede incluir una o más modificaciones genéticas que le permitan fermentar la xilosa. Los ejemplos de modificaciones genéticas son la introducción de uno o más genes *xyIA*, *XYL1* y *XYL2* y/o *XKS1*; la delección del gen de la aldosa reductasa (*GRE3*); la sobreexpresión de los genes PPP *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* y *RKI1* para permitir el aumento del flujo a través de la ruta de las pentosas fosfato en la célula (por sus siglas en inglés, respectivamente). En EP1468093 y/o WO2006/009434 se describen ejemplos de levaduras modificadas por ingeniería genética.

65 Un ejemplo de levadura comercial adecuada es la RN1016, una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de DSM, Países

Bajos, que fermenta la xilosa y la glucosa.

En un aspecto, el proceso de fermentación para la producción de etanol es anaeróbico. Anaeróbico ya se ha definido anteriormente en la presente. En otro aspecto, el proceso de fermentación para la producción de etanol es aeróbico. En otro aspecto, el proceso de fermentación para la producción de etanol se realiza bajo condiciones limitadas de oxígeno, por ejemplo, aeróbico y bajo condiciones limitadas de oxígeno. Las condiciones limitantes de oxígeno ya se han definido anteriormente en la presente.

Como alternativa a los procesos de fermentación descritos anteriormente, se pueden usar al menos dos células distintas, lo que significa que este proceso es un proceso de cofermentación. Todos los aspectos de los procesos de fermentación descritos anteriormente son también aspectos de este proceso de cofermentación: identidad del producto de fermentación, identidad de la fuente de L-arabinosa y de la fuente de xilosa, condiciones de fermentación (condiciones aeróbicas o anaeróbicas, condiciones limitantes de oxígeno, temperatura a la que se lleva a cabo el proceso, productividad de etanol, rendimiento de etanol).

Los productos de fermentación que se pueden producir por los procesos de la invención pueden ser cualquier sustancia derivada de la fermentación. Estos incluyen, pero no se limitan a, alcohol (tales como arabinitol, butanol, etanol, glicerol, metanol, 1,3-propanediol, sorbitol y xilitol); ácido orgánico (tales como ácido acético, ácido acetónico, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido acrílico, ácido cítrico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucárico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutárico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido oxalacético, ácido propiónico, ácido succínico y ácido xilónico); cetonas (tal como acetona); aminoácidos (tales como ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina, serina, triptófano y treonina); alcanos (tales como pentano, hexano, heptano, octano, nonano, decano, undecano y dodecano), cicloalcanos (tales como ciclohexano, cicloheptano y ciclooctano), alquenos (tales como penteno, hexeno, heptano y octeno); y gases (tales como metano, hidrógeno (H<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y monóxido de carbono (CO)). El producto de fermentación también puede ser una proteína, una vitamina, un producto farmacéutico, un suplemento alimenticio para animales, una especialidad química, una materia prima química, un plástico, un disolvente, etileno, una enzima, tal como una proteasa, una celulasa, una amilasa, una glucanasa, una lactasa, una lipasa, una liasa, una oxidorreductasa, una transferasa o una xilanas. Preferiblemente, se prepara un alcohol en los procesos de fermentación descritos en la presente. Preferiblemente, el etanol se prepara en los procesos de fermentación descritos en la presente.

Los procesos descritos en la presente pueden incluir la recuperación de todo tipo de productos obtenidos durante los procesos, incluidos los productos de fermentación tales como el etanol. Se puede separar un producto de fermentación del caldo de fermentación de la manera conocida por el experto. Algunos ejemplos de técnicas de recuperación son, pero no se limitan a, la cromatografía, los procedimientos electroforéticos, la solubilidad diferencial, la destilación o la extracción. Para cada producto de fermentación, el experto podrá así seleccionar una técnica de separación adecuada. Por ejemplo, el etanol se puede separar de un caldo de fermentación de levadura por destilación, por ejemplo, destilación al vapor/destilación al vacío de forma convencional.

Los procesos descritos en la presente también producen energía, calor, electricidad y/o vapor.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Condiciones para el pretratamiento y la hidrólisis enzimática de material lignocelulósico

El rastrojo de maíz (con una composición basada en materia seca del 36,5 % (p/p) de glucano, 0,2 % (p/p) de manano, 1,0 % (p/p) de galactano, 2,3 % (p/p) de arabinano, 19,4 % (p/p) de xilano, 2,9 % (p/p) de acetilo y 0,6 % (p/p) de formilo) se secó en un horno a 40 °C al vacío hasta alcanzar un contenido de humedad del 9,3 % (p/p). Posteriormente, el material seco se molió en partículas < 2 mm y el material molido se usó para otros experimentos.

Se añadieron una barra de agitación, 0,83 gramos de rastrojo de maíz seco molido (= 0,75 gramos de peso seco) y 9,17 gramos de disolución de ácido sulfúrico o agua a viales de 20 mL, resultando en una concentración de rastrojo de maíz del 7,5 % (p/p). Los viales se almacenaron durante la noche y, a continuación, se sometieron a un paso de extracción usando un microondas (Biotage Initiator 2.0 Microwave synthesizer) bajo las siguientes condiciones:

Tabla 1: Condiciones previas al tratamiento.

Número de muestra	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	pH
1	160	4,6	1,3
2	180	2,7	1,9
3	200	1,9	2,5
4	140	151	1,9
5	200	15	4,0

\* el % en peso del ácido sulfúrico en las muestras 1-5 fue de 0,67, 0,32, 0,24, 0,32 y 0, respectivamente.

Tras el pretratamiento, las muestras se sometieron a hidrólisis enzimática. Los viales usados para los procesos de pretratamiento se abrieron y su contenido se transfirió a un tubo de centrifuga de 40 mL. Subsecuentemente, el pH de las muestras pretratadas se ajustó a pH 4,5 usando una disolución 2 M de NaOH. Se usó el volumen total de disolución de NaOH añadida para corregir el contenido final de materia seca de cada tubo (las muestras pretratadas de forma diferente requerían volúmenes diferentes de NaOH 2 M para ajustar el pH a 4,5, en el rango de 0,05 mL a 0,5 mL). A continuación, se añadió un cóctel de celulasa de *Talaromyces emersonii* (es decir, un caldo de fermentación completo) con un 2,0 % de beta-glucosidasa de *Talaromyces emersonii* sobre el total de proteínas (p/p) hasta una dosificación final de 30 mg de proteína por gramo de materia seca. El cóctel se elaboró de acuerdo con los procedimientos de inoculación y fermentación descritos en WO 2011/000949. La concentración de proteínas del cóctel se determinó usando el método TCA-biuret (por sus siglas en inglés). En resumen, se realizaron diluciones de albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés; 0, 1, 2, 5, 8 y 10 mg/mL) para generar una curva de calibración. Adicionalmente, se hicieron diluciones del cóctel con agua. De cada muestra diluida (de la BSA y del cóctel), se transfirieron 270 µL a un tubo de 10 mL con 830 µL de una disolución de ácido tricloroacético al 12 % (p/v) en acetona y se mezclaron bien. Subsecuentemente, los tubos se incubaron en agua helada por una hora y se centrifugaron por 30 minutos a 4 °C y 6000 rpm. El sobrenadante se desechó y los sedimentos se secaron al invertir los tubos sobre un pañuelo de papel y dejándolos reposar por 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 3 mL de la mezcla de reactivos BioQuant Biuret al sedimento en los tubos y se solubilizó el sedimento al mezclarlo, seguido de la adición de 1 mL de agua. Los tubos se mezclaron bien y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. La absorción de las mezclas se midió a 546 nm y se usó una muestra de agua como medición en blanco. Las diluciones del cóctel que dieron un valor de absorción a 546 nm dentro del rango de la curva de calibración se usaron para calcular la concentración total de proteínas en el cóctel mediante la curva de calibración de BSA.

Los tubos de centrifuga con el material pretratado y el cóctel enzimático se incubaron en un horno incubador a 62 °C, mientras giraban. Tras incubar por 72 horas a pH 4,5, 62 °C, los hidrolizados obtenidos se centrifugaron y el contenido de glucosa y xilosa del sobrenadante se analizó usando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (Agilent 1100) equipado con un detector de índice de refracción (Agilent 1260 Infinity). La separación de los azúcares se logró usando una columna Aminex HPX-87P (Bio Rad) de 300 X 7,8 mm con una precolumna Micro Guard Carbo-P (Bio Rad). La fase móvil fue agua de grado HPLC (por sus siglas en inglés), la tasa de flujo fue de 0,6 mL/min y la temperatura de la columna fue de 85 °C. La precolumna se mantuvo a temperatura ambiente. El volumen de inyección fue de 10 µL. Las muestras se diluyeron con agua de grado HPLC hasta un máximo estimado de 2 g/L de glucosa y se filtraron usando un filtro de 0,2 µm (membrana de PVDF (por sus siglas en inglés) del filtro de jeringa Afridisc LC25 mm). El contenido de glucosa y xilosa se identificó de acuerdo con el tiempo de retención y se cuantificó mediante una curva de calibración de glucosa y xilosa generada con patrones de glucosa (D-(+)-glucosa, Sigma) en el rango de 0,2; 0,4; 1,0; 2,0 g/L y patrones de xilosa (xilosa, Sigma) en el rango de 0,2; 0,4; 1,0; 2,0 g/L. Los resultados de la prueba se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Glucano, xilano y conversión total.

Número de muestra	Conversión de glucano en glucosa (% en moles)	Conversión de xilano en xilosa (% en moles)	Conversión total de biomasa en azúcares (% en moles)
1	94	113	101
2	87	105	93
3	95	104	98
4	80	100	87
5	87	69	81

Tabla 3: Pérdida por degradación del xilano en furfural.

Número de muestra	Concentración de furfural (ppm)*	Pérdida por degradación del xilano en furfural (% en moles del xilano original)
1	210	2,0
2	150	1,4
3	340	3,2
4	750	7,1
5	470	4,4

\* El furfural se midió por HPLC usando una columna Aminex HPX-87H (BioRad) a una temperatura de 60 °C y un volumen de inyección de 100 µL; Eluyente: 5 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a un flujo de 0,55 mL/min; Detección RI: Temperatura del detector: 50 °C; Tiempo de ejecución: 60 min

Los datos de la Tabla 2 muestran que llevar a cabo un proceso con condiciones de pretratamiento e hidrólisis de acuerdo con la presente invención (ver las muestras 1-3) resultó en índices de conversión más altos que cuando se llevó a cabo un proceso con condiciones de pretratamiento e hidrólisis diferentes (ver las muestras 4-5). Cuando se lleva a cabo un proceso con material lignocelulósico pretratado que tiene un peso de materia seca del 15 al 25 % (p/p), la diferencia en los índices de conversión entre el proceso que se lleva a cabo con condiciones de pretratamiento e hidrólisis según la presente invención y un proceso que se lleva a cabo con condiciones de pretratamiento e hidrólisis diferentes es aún mayor (es decir, el proceso que se lleva a cabo con condiciones de pretratamiento e hidrólisis de acuerdo con la presente invención tiene índices de conversión más altos).

5 Los datos de la Tabla 3 muestran que se observan menores pérdidas de degradación de xilano a furfural en las muestras que han sido sometidas a un proceso con condiciones de pretratamiento e hidrólisis de acuerdo con la presente invención (es decir, las muestras 1-3) en comparación con las muestras que han sido sometidas a condiciones de pretratamiento e hidrólisis diferentes (es decir, las muestras 4-5). La menor pérdida de degradación de xilano a furfural se observa en la muestra 2, es decir, una muestra que ha sido sometida a pretratamiento a una temperatura de 170 °C a 190 °C y un pH de 1,9 a 2,2 por 2,5 a 6 minutos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para la preparación de un producto del azúcar a partir de material lignocelulósico, que comprende los siguientes pasos:
- (a) pretratar el material lignocelulósico a una temperatura de 170 °C a 190 °C a un pH de 1,9 a 2,2 por 2,5 a 6 minutos;
- 10 (b) hidrolizar enzimáticamente el material lignocelulósico pretratado con un peso de materia seca del 15 al 25 % (p/p) a una temperatura de 50 °C a 65 °C y un pH de 4 a 6 por 40 horas a 150 horas, usando un caldo de fermentación completo de un hongo filamentosos, dicho caldo comprende al menos una celobiohidrolasa, una endoglucanasa, una beta-glucosidasa, una xilanasas, una beta-xilosidasa y una monooxigenasa lítica de polisacáridos; y
- (c) opcionalmente, recuperar el producto del azúcar.
- 15 2. Un proceso para la preparación de un producto de fermentación a partir de material lignocelulósico, que comprende los siguientes pasos:
- (a) pretratar el material lignocelulósico a una temperatura de 170 °C a 190 °C a un pH de 1,9 a 2,2 por 2,5 a 6 minutos;
- 20 (b) hidrolizar enzimáticamente el material lignocelulósico pretratado con un peso de materia seca del 15 al 25 % (p/p) a una temperatura de 50 °C a 65 °C y un pH de 4 a 6 por 40 horas a 150 horas, usando un caldo de fermentación completo de un hongo filamentosos, dicho caldo comprende al menos una celobiohidrolasa, una endoglucanasa, una beta-glucosidasa, una xilanasas, una beta-xilosidasa y una monooxigenasa lítica de polisacáridos, para obtener un material lignocelulósico hidrolizado;
- 25 (c) fermentar el material lignocelulósico hidrolizado para obtener un producto de fermentación; y
- (d) opcionalmente, recuperar el producto de fermentación.
- 30 3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde durante la hidrólisis enzimática se añade oxígeno al material lignocelulósico pretratado.
4. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la hidrólisis enzimática se realiza en un reactor con un volumen de 10-5000 m<sup>3</sup>.
- 35 5. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la hidrólisis enzimática se lleva a cabo a una temperatura de 55 °C a 65 °C.
6. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde la fermentación se realiza con una levadura capaz de convertir al menos un azúcar C5.
- 40 7. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el pretratamiento se realiza en un reactor con un volumen de 30-200 m<sup>3</sup>.
- 45 8. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el reactor de pretratamiento tiene una relación de altura/diámetro de 3:1 a 12:1.
9. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la hidrólisis enzimática se realiza en un reactor que tiene una relación de altura/diámetro de 2:1 a 8:1.
- 50 10. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en donde la fermentación se realiza en un reactor que tiene una relación de altura/diámetro de 2:1 a 8:1.