

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 972 390**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

C13K 1/02 (2006.01)

D21C 3/26 (2006.01)

C13K 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2015** **PCT/EP2015/059316**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2015** **WO15165951**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2015** **E 15718906 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2023** **EP 3137619**

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

30 Prioridad:

30.04.2014 EP 14166538

30.04.2014 EP 14166539

30.04.2014 EP 14166545

07.05.2014 EP 14167284

08.05.2014 EP 14167483

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.06.2024

73 Titular/es:

VERSALIS S.P.A. (100.0%)

Piazza Boldrini 1

20097 San Donato Milanese (MI), IT

72 Inventor/es:

NOORDAM, BERTUS;

BEVERS, LOES ELIZABETH;

PARTON, RUDY FRANCOIS MARIA JOZEF y

BERKHOUT, MICHAEL PETRUS JOZEF

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 972 390 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso para hidrólisis enzimática de material lignocelulósico y fermentación de azúcares

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un proceso para la preparación de un producto de azúcar a partir de material lignocelulósico, que comprende los siguientes pasos: (a) opcionalmente, pretratamiento del material lignocelulósico, (b) opcionalmente, lavado del material lignocelulósico opcionalmente pretratado, (c) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico
 10 opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado utilizando una composición enzimática que comprende al menos dos celulasas y en la que la composición enzimática comprende al menos LPMO, y (d) opcionalmente, recuperación de una composición que contiene glucosa, en donde la cantidad de ácido glucónico formado al final de la hidrólisis enzimática por oxidación mediante LPMO del material lignocelulósico que contiene celulosa y/o celo-oligosacáridos se mantiene entre
 15 3 y 10 g/kg de glucano presente en el material lignocelulósico añadiendo una cantidad adecuada de oxígeno durante el paso de hidrólisis enzimática (c) al material lignocelulósico. La invención también se refiere a un proceso para la preparación de un producto de fermentación a partir de material lignocelulósico, que comprende los siguientes pasos: (a) opcionalmente, pretratamiento del material lignocelulósico, (b) opcionalmente, lavado del material lignocelulósico
 20 opcionalmente pretratado, (c) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado utilizando una composición enzimática que comprende al menos dos celulasas y en la que la composición enzimática comprende al menos LPMO, y, opcionalmente, purificación del material lignocelulósico hidrolizado, (d) fermentación del material lignocelulósico hidrolizado para obtener un producto de fermentación, y (e) opcionalmente, recuperación de un producto de fermentación, en donde la cantidad de ácido glucónico formado al final de la hidrólisis enzimática por oxidación mediante LPMO del material lignocelulósico que contiene celulosa y/o celo-oligosacáridos se
 25 mantiene entre 3 y 10 g/kg de glucano presente en el material lignocelulósico añadiendo una cantidad adecuada de oxígeno durante el paso de hidrólisis enzimática (c) al material lignocelulósico.

Antecedentes de la invención

El material vegetal lignocelulósico, en la presente también denominado materia prima, es una fuente renovable de energía
 30 en forma de azúcares que se pueden convertir en productos valiosos, por ejemplo, azúcares o biocombustibles, tal como el bioetanol. Durante este proceso, la (ligno- o hemi)celulosa presente en la materia prima, tal como paja de trigo, rastrojo de maíz, cáscaras de arroz, etc., se convierte en azúcares reductores por enzimas (hemi)celulolíticas, que luego se convierten opcionalmente en productos valiosos, tal como etanol, por microorganismos como levadura, bacterias y hongos.

35 Dado que la (hemi)celulosa es cristalina y está atrapada en una red de lignina, la conversión en azúcares reductores es en general lenta e incompleta. Típicamente, la hidrólisis enzimática de materia prima no tratada produce azúcares <20 % de la cantidad teórica. Mediante la aplicación de un pretratamiento químico y termo-físico, la (hemi)celulosa es más accesible para las enzimas (hemi)celulolíticas y, por lo tanto, las conversiones van más rápido y con mayores rendimientos.

40 Un rendimiento típico de etanol a partir de la glucosa, derivado del rastrojo de maíz pretratado, es de 151.4 litros (40 galones) de etanol por cada 1000 kg de rastrojo de maíz seco (Badger P., Ethanol from cellulose: a general review, Trends in new crops and new uses, 2002, J. Janick & A. Whipkey (eds.) ASHS Press, Alexandria, VA) o 0,3 g de etanol por g de materia prima. El rendimiento máximo de etanol en base de celulosa es de aproximadamente 90 %.

Las enzimas celulolíticas, la mayoría de ellas son producidas por especies como *Trichoderma*, *Humicola* y *Aspergillus*, se utilizan comercialmente para convertir la materia prima pretratada en una pulpa que contiene celulosa insoluble (hemi), reduciendo los azúcares hechos de ella, y lignina. Las enzimas celulolíticas termoestables derivadas de *Rasamsonia*, se
 50 han utilizado para degradar la materia prima lignocelulósica y estas enzimas son conocidas por su termoestabilidad, véase WO 2007/091231. La pulpa producida se utiliza en una fermentación durante la cual los azúcares reductores se convierten en biomasa de levadura (células), dióxido de carbono y etanol. El etanol producido de esta manera se denomina bioetanol.

La producción común de azúcares a partir de materia prima lignocelulósica pretratada, la hidrólisis también denominada
 55 licuefacción, presacarificación o sacarificación, se lleva a cabo típicamente durante un proceso que dura de 6 a 168 horas (Kumar S., Chem. Eng. Technol. 32 (2009) 517-526) bajo temperaturas elevadas de 45 a 50 °C y condiciones no estériles. Durante esta hidrólisis, la celulosa presente se convierte parcialmente (típicamente del 30 al 95 %, dependiendo de la actividad enzimática y las condiciones de hidrólisis) en azúcares reductores. En caso de inhibición de enzimas por compuestos presentes en la materia prima pretratada y por azúcares de liberación y para minimizar la inactivación térmica, este período de temperatura elevada se minimiza tanto como sea posible.

La fermentación después de la hidrólisis tiene lugar en un paso separado, preferiblemente anaeróbico, ya sea en el mismo o en un recipiente diferente, en el que la temperatura se ajusta a 30 a 33 °C (proceso mesófilo) para acomodar el
 65 crecimiento y la producción de etanol por biomasa microbiana, comúnmente levaduras. Durante este proceso de fermentación, el material (hemi)celulósico restante se convierte en azúcares reductores por las enzimas ya presentes en el paso de hidrólisis, mientras que se producen biomasa microbiana y etanol. La fermentación se termina una vez que el

material (hemi)celulósico se convierte en azúcares fermentables y todos los azúcares fermentables se convierten en etanol, dióxido de carbono y células microbianas. Esto puede tomar hasta 6 días. En general, el tiempo total de proceso de hidrólisis y fermentación puede ser de hasta 13 días.

5 La pulpa fermentada así obtenida consiste en azúcares no fermentables, material no hidrolizable (hemi)celulósico, lignina, células microbianas (las células más comunes de levadura), agua, etanol, dióxido de carbono disuelto. Durante los pasos sucesivos, el etanol se destila de la pulpa y se purifica adicionalmente. La suspensión sólida restante se seca y se utiliza, por ejemplo, como combustible, fertilizante o piensos para ganado.

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

15 WO 2009/046538 divulga un método para el tratamiento de materias primas lignocelulósicas para la liberación de azúcares fermentables utilizando un proceso de hidrólisis enzimática para el tratamiento de los materiales que se lleva a cabo al vacío y la producción de un flujo de proceso rico en azúcar que comprende cantidades reducidas de compuestos de azúcar volátil/inhibidores de la fermentación, tales como el ácido furfural y acético. Además de eliminar los compuestos
20 inhibidores volátiles, otros compuestos y/o moléculas que también se eliminan incluyen nitrógeno, oxígeno, argón y dióxido de carbono.

Canella et al. (2013) describen el impacto de una preparación y estrategia de procesamiento de enzimas seleccionadas en el rendimiento final de etanol y el rendimiento general, mientras que WO 2011/000949 describe varias cepas de *Talaromyces* y composiciones enzimáticas producidas por dichas cepas.

25 Con cada lote de materia prima, se añaden enzimas para maximizar el rendimiento y la tasa de liberación de azúcares fermentables de la materia prima lignocelulósica pretratada durante el tiempo de proceso dado. En general, los costos de producción de enzimas, los rendimientos de materia prima a etanol y las inversiones son factores de costo importantes en los costos generales de producción (Kumar S., Chem. Eng. Technol. 32 (2009) 517-526). Hasta ahora, el coste de la reducción del uso de enzimas se consigue aplicando productos enzimáticos de una sola o de múltiples fuentes microbianas (WO 2008/008793) con una actividad hidrolítica (específica) más amplia y/o más alta cuyo uso apunta a una menor necesidad enzimática, tasas de conversión más rápidas y/o mayores rendimientos de conversión y, por lo tanto, a menores costos de producción de bioetanol. Esto requiere grandes inversiones en investigación y desarrollo de estos
30 productos enzimáticos. En el caso de un producto enzimático compuesto de enzimas de múltiples fuentes microbianas, se necesitan grandes inversiones de capital para la producción de cada compuesto enzimático.

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

40 Breve descripción de la invención

Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar un proceso en el que la fase de hidrólisis se lleve a cabo en condiciones mejoradas. Otro objeto de la invención es proporcionar un proceso que implica una hidrólisis con un tiempo de proceso reducido. Otro objeto de la invención es proporcionar un proceso, en donde la dosificación de la enzima puede
45 ser reducida y al mismo tiempo la producción de producto de hidrólisis útil se mantiene en el mismo nivel o incluso aumenta. Otro objeto es proporcionar un proceso que implique hidrólisis, en donde se optimicen las condiciones del proceso de hidrólisis. Un objeto adicional de la invención es proporcionar un proceso que implica hidrólisis, en donde la producción de producto de hidrólisis útil se aumenta utilizando la misma dosificación enzimática. Uno o más de estos objetos se obtienen de acuerdo con la invención.

50 La presente invención proporciona un proceso para la preparación de un producto de azúcar a partir de material lignocelulósico, que comprende los siguientes pasos: (a) opcionalmente, pretratamiento del material lignocelulósico, (b) opcionalmente, lavado del material lignocelulósico opcionalmente pretratado, (c) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado utilizando una composición enzimática que
55 comprende al menos dos celulasas y en la que la composición enzimática comprende al menos LPMO, y (d) opcionalmente, recuperación de una composición que contiene glucosa, en donde la cantidad de ácido glucónico formado al final de la hidrólisis enzimática por oxidación mediante LPMO del material lignocelulósico que contiene celulosa y/o celo-oligosacáridos se mantiene entre 3 y 10 g/kg de glucano presente en el material lignocelulósico añadiendo una cantidad adecuada de oxígeno durante el paso de hidrólisis enzimática (c) al material lignocelulósico.

60 Además, la presente invención proporciona un proceso para la preparación de un producto de fermentación a partir de material lignocelulósico, que comprende los siguientes pasos: (a) opcionalmente, pretratamiento del material lignocelulósico, (b) opcionalmente, lavado del material lignocelulósico opcionalmente pretratado, (c) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado utilizando una composición enzimática
65 que comprende al menos dos celulasas y en la que la composición enzimática comprende al menos LPMO, y, opcionalmente, purificación del material lignocelulósico hidrolizado, (d) fermentación del material lignocelulósico

hidrolizado para obtener un producto de fermentación, y (e) opcionalmente, recuperación de un producto de fermentación, en donde la cantidad de ácido glucónico formado al final de la hidrólisis enzimática por oxidación mediante LPMO del material lignocelulósico que contiene celulosa y/o celo-oligosacáridos se mantiene entre 3 y 10 g/kg de glucano presente en el material lignocelulósico añadiendo una cantidad adecuada de oxígeno durante el paso de hidrólisis enzimática (c) al material lignocelulósico.

La oxidación por LPMO del material lignocelulósico da lugar a polisacáridos oxidados que, durante la hidrólisis, se hidrolizan en, entre otras, unidades de glucosa y glucosa oxidada, tal como el ácido glucónico o diol. En general, 1 molécula de oxígeno (O₂) da un mol de producto de oxidación. El oxígeno también puede ser absorbido por la materia prima (por ejemplo, lignina).

El oxígeno se añade durante el paso de hidrólisis enzimática c).

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

Sorprendentemente, de acuerdo con la invención, mediante la adición de oxígeno es posible alcanzar muchas ventajas del proceso, incluyendo condiciones óptimas de temperatura, tiempo de proceso reducido, dosificación reducida de la enzima, reutilización de enzimas, mayores rendimientos y otras optimizaciones del proceso, lo que da como resultado la reducción de costos.

En una realización de este proceso, el tiempo de fermentación es de 5 a 120 horas. En una realización, la composición enzimática estable utilizada conserva la actividad durante 30 horas o más. De acuerdo con una realización posterior, la hidrólisis se realiza preferiblemente a una temperatura de 45 °C o más, más preferiblemente a una temperatura de 50 °C o más, y aún más preferiblemente a una temperatura de 55 °C o más. En una realización preferida la composición enzimática se deriva de un hongo, preferiblemente un microorganismo del género *Rasamsonia* o la composición enzimática comprende una enzima fúngica, preferiblemente una enzima *Rasamsonia*. El proceso de la invención se ilustrará con más detalle a continuación.

Descripción detallada de la invención

A lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones adjuntas, las palabras “comprenden” e “incluyen”, y sus variaciones, tales como “comprende”, “comprender”, “incluye” e “incluir” deben interpretarse de manera inclusiva. Es decir, estas palabras pretenden transmitir la posible inclusión de otros elementos o números enteros no recitados específicamente, cuando el contexto lo permita. Los artículos “un” y “una” se utilizan en la presente para referirse a uno o más de uno (es decir, uno o al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” puede significar un elemento o más de un elemento.

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

En la técnica anterior, se sugiere mejorar la hidrólisis del material celulolítico mediante el uso de condiciones anaeróbicas (WO 2010/080407) o de vacío (WO 2009/046538) durante la hidrólisis enzimática. En los procesos de ambos documentos se redujo el nivel de oxígeno. Ahora se ha descubierto sorprendentemente que la hidrólisis de la presente invención muestra resultados en un producto de reacción mejorada que da mayores cantidades de productos de azúcar (reducidos) y/o productos de fermentación deseados en la fermentación después de la hidrólisis en comparación con un proceso en el que no se añade oxígeno. En general, se observa un aumento de la conversión de glucosa de 5 a 15 % p/p.

El oxígeno se puede añadir de varias maneras. Por ejemplo, el oxígeno se puede añadir como gas de oxígeno, gas enriquecido con oxígeno, tal como aire enriquecido con oxígeno o aire. El oxígeno se puede añadir de forma continua o discontinua. Por “se añade” oxígeno, se entiende que el oxígeno se añade a la fase líquida (que comprende el material lignocelulósico) en el reactor de hidrólisis y no que el oxígeno está presente en el espacio de cabeza en el reactor por encima de la fase líquida, por lo que el oxígeno tiene que difundirse desde el espacio de cabeza a la fase líquida. Preferiblemente, el oxígeno se añade o se genera en la fase líquida (que comprende el material lignocelulósico) en el reactor de hidrólisis. Así que, preferiblemente, el oxígeno se añade como burbujas, más preferiblemente como burbujas pequeñas. En una realización, las burbujas tienen un diámetro de al menos 0,5 mm, al menos 1 mm, al menos 1,5 mm, al menos 2 mm, al menos 2,5 mm, al menos 3 mm, al menos 3,5 mm, al menos 4 mm, al menos 4,5 mm, al menos 5 mm. En una realización, las burbujas tienen un diámetro de entre 0,5 mm y 500 mm, preferiblemente entre 0,5 mm y 400 mm, entre 0,5 mm y 300 mm, entre 0,5 mm y 200 mm, entre 0,5 mm y 100 mm.

Los inventores plantean la hipótesis de que en (el paso de) la hidrólisis (enzimática) los polisacáridos amorfos y cristalinos

o celulosa se hidrolizan a azúcares, tal como la glucosa. Los polisacáridos amorfos son convertidos, por ejemplo, en oligosacáridos por las endogluconasas, tras lo cual los oligosacáridos pueden ser convertidos en glucosa por la celobiohidrolasa (CBH) y beta-glucosidasa (BG). La conversión de los polisacáridos cristalinos puede ocurrir en paralelo o secuencialmente, y continuar incluso cuando la mayoría de los polisacáridos amorfos están hidrolizados. De acuerdo con la presente hipótesis, especialmente la adición de oxígeno en combinación con LPMO es beneficiosa durante la hidrólisis de los polisacáridos cristalinos, por ejemplo, en la degradación de los polisacáridos en oligosacáridos. Por lo tanto, la adición de oxígeno es muy útil especialmente en la fase en la que los polisacáridos cristalinos son convertidos por enzimas. Fuera de esta fase, la adición de ningún oxígeno o adición de menos oxígeno puede ser más eficiente. Esta hipótesis sólo se da como posible explicación del efecto notado por los inventores y la presente invención no depende de la exactitud de esta teoría.

La estructura cristalina del glucano puede ser abierta por una monooxigenasa lítica de polisacáridos (LPMO). Este tipo de enzima abre la estructura oxidando los enlaces glicosídicos y haciéndola accesible para las otras enzimas celulolíticas para una mayor hidrolización de los oligosacáridos en glucosa.

Las LPMO más conocidas forman ácidos aldónicos, es decir, productos oxidados en la posición C1 del azúcar terminal en el sitio de escisión. Esta unidad de glucosa oxidada se libera en forma de ácido glucónico durante la hidrólisis. Además, se ha reportado oxidación de C4 y C6 de la unidad de glucosa no reductora en el sitio de escisión. Por ejemplo, T. Isaksen et al. (*Vide supra*) informó la oxidación de la posición C4, el resto final no reductor, dando lugar a un ceto-azúcar en la posición C4, que está en equilibrio con un diol geminal C4 en disolución de agua. Los inventores actuales plantean que los productos de oxidación hidrolizados, como, por ejemplo, el ácido glucónico, son una medida para el rendimiento de la LPMO aplicada en la hidrólisis de lignocelulosa.

Sorprendentemente, los inventores actuales han encontrado que la hidrólisis óptima de lignocelulosa (conversión de glucano de más del 70 %) va de la mano de una formación óptima de los productos de oxidación mencionados anteriormente, como, por ejemplo, el ácido glucónico. Será evidente que la hidrólisis óptima de la lignocelulosa sólo se puede lograr cuando la celulosa (cristalina) y los celo-oligosacáridos se hidrolizan de manera óptima. Esta hidrólisis óptima por la acción de una LPMO dará lugar a la formación de producto de oxidación, como el ácido glucónico. Si no hay ningún producto de oxidación, esto significa una hidrólisis menos eficiente del glucano (cristalino). Sin embargo, los niveles demasiado altos de productos de oxidación como el ácido glucónico serán a expensas de la glucosa y, por lo tanto, el rendimiento de glucosa en el glucano (inicial) disminuirá. La cantidad de ácido glucónico formado por la oxidación de LPMO de celulosa y/o celo-oligosacáridos se mantiene ventajosamente entre 3 a 10 g/kg de glucano presente en el material lignocelulósico mediante la adición de una cantidad adecuada de oxígeno durante la hidrólisis enzimática al material lignocelulósico. La cantidad de ácido glucónico formado por la oxidación de celulosa y/o celo-oligosacáridos es preferiblemente de 5 a 10 g/kg de glucano presente en el material lignocelulósico.

Mediante el proceso de acuerdo con la presente invención, se obtienen ventajosamente mayores rendimientos de glucosa. La adición de cantidades más altas de oxígeno dará lugar a que se produzca más ácido glucónico en lugar de glucosa y, por otro lado, en caso de cantidades más bajas de oxígeno, la LPMO no es capaz de funcionar de manera óptima. Además, se observó que cantidades demasiado altas de productos de oxidación, como el ácido glucónico, pueden inhibir las celulasas o hemicelulasas o, en caso de que el hidrolizado se fermente posteriormente, el ácido glucónico puede tener un efecto negativo en la fermentación al inhibir el microorganismo, tal como una levadura, utilizado en la fermentación. Las cantidades anteriores son las cantidades al final de la hidrólisis.

En general, la cantidad de oxígeno añadido durante la hidrólisis enzimática al material lignocelulósico puede ser controlada o variada de diversas maneras. La restricción del oxígeno suministrado es posible añadiendo solo oxígeno durante parte del tiempo de hidrólisis. Otra opción es añadir oxígeno a baja concentración, por ejemplo, mediante el uso de una mezcla de aire y aire reciclado (aire que sale del reactor de hidrólisis) o mediante la "dilución" del aire con un gas inerte. El aumento de la cantidad de oxígeno añadido, se puede obtener mediante la adición de oxígeno durante períodos más largos de tiempo de hidrólisis, mediante la adición del oxígeno a una concentración más alta o mediante la adición de más aire. Otra opción para cambiar la absorción de oxígeno es variar la temperatura de hidrólisis, una temperatura más alta causará una menor concentración máxima de saturación del oxígeno en el contenido del reactor. Otra forma de manejar la concentración de oxígeno es añadir un consumidor de oxígeno o un generador de oxígeno. En caso de que la enzima pueda dañarse por la presencia o adición de oxígeno, se puede utilizar un suministro de oxígeno más leve. En ese caso, se puede encontrar un equilibrio entre la producción mejorada de glucosa y el rendimiento enzimático. La adición del oxígeno al material celulolítico se realiza durante la hidrólisis enzimática. En caso de que se añada oxígeno en forma gaseosa, se puede introducir gas que contenga oxígeno, por ejemplo soplado, en el contenido del reactor de hidrólisis líquida del material celulolítico. En otra realización de la invención, el gas que contiene oxígeno se introduce en la corriente de material celulolítico líquido que entrará en el reactor de hidrólisis. En otra realización de la invención, se introduce el gas que contiene oxígeno junto con el material celulolítico que entra en el reactor de hidrólisis o con parte del contenido del reactor líquido que pasa un bucle externo del reactor. En la mayoría de los casos, la adición de oxígeno antes de entrar en el reactor de hidrólisis no es suficiente y la adición de oxígeno se hace durante la hidrólisis también. En otra realización de la invención, la fase gaseosa presente en la parte superior del reactor (espacio de cabeza) se refresca de manera continua o discontinua con el gas que contiene oxígeno. En este último caso se necesita mezclar o agitar (vigorosamente) para obtener el oxígeno como burbujas y/o por difusión en el contenido del reactor líquido, preferiblemente en combinación con la sobrepresión en el reactor. En general, la descarga del espacio de cabeza con aire en combinación con un mezclado

o agitación (vigorosos) puede introducir suficiente oxígeno en el material celulósico en el reactor de hidrólisis para reactores de hasta un tamaño de 100 litros a 1 m³. A mayor escala, por ejemplo, en un reactor de 50 m³ o más, por ejemplo 100 m³, se necesita tanta energía para una agitación vigorosa que, desde un punto de vista económico, no se aplicará en un proceso operativo comercial.

Como se describe en la presente, la cantidad de ácido glucónico formado al final de la hidrólisis enzimática mediante la oxidación por LPMO del material lignocelulósico que contiene celulosa y/o celo-oligosacáridos se mantiene entre 3 a 10 g/kg de glucano presente en el material lignocelulósico mediante la adición de una cantidad adecuada de oxígeno durante la hidrólisis enzimática al material lignocelulósico. En una realización "una cantidad adecuada de oxígeno" es 20 – 10.000 mmol de oxígeno por kg de glucano, preferiblemente 30 – 5.000 mmol de oxígeno por kg de glucano, más preferiblemente 40 – 4.000 mmol de oxígeno por kg de glucano, y lo más preferiblemente 50 – 3.500 mmol de oxígeno por kg de glucano. La cantidad de oxígeno es la cantidad total de oxígeno añadido durante la hidrólisis enzimática.

De acuerdo con la presente invención, el oxígeno se añade durante parte del paso de hidrólisis, durante todo el paso de hidrólisis, o una combinación de antes o durante el paso de hidrólisis. Ventajosamente, el oxígeno se añade durante la primera mitad del paso de hidrólisis. La adición de oxígeno durante sólo una parte de la hidrólisis se puede hacer, por ejemplo, en caso de que ocurra daño por oxidación de la(s) enzima(s). En caso de que el oxígeno presente en el contenido del reactor de hidrólisis o el producto de azúcar o el hidrolizado formado en el paso de hidrólisis pueda influir o perturbar el paso de fermentación posterior, la adición de oxígeno se puede hacer excepto para la última parte de la hidrólisis y, por lo tanto, (la mayor parte de) el oxígeno se consume antes de que la biomasa hidrolizada entre en el reactor de fermentación.

Varios ejemplos de aireación durante el proceso de hidrólisis enzimática se dan en los Ejemplos para mostrar el efecto beneficioso de la presente invención. Este efecto beneficioso se encuentra en varios sustratos o materias primas y, por lo tanto, se cree que está presente para la hidrólisis de todo tipo de sustratos o materias primas.

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

La concentración de oxígeno en la fase líquida (DO), en donde el material lignocelulósico está presente durante la hidrólisis enzimática, es de al menos 0,001 mol/m³, preferiblemente de al menos 0,002 mol/m³, más preferiblemente al menos 0,003 mol/m³ y aún más preferiblemente más de 0,01 mol/m³, por ejemplo, más de 0,02 mol/m³ o 0,03 mol/m³. En reactores de menos de 1 m³, se obtendrán valores de DO inferiores a 0,01 mol/m³ o 0,02 mol/m³ por agitación lenta. El mezclado o agitación vigorosos a tal escala introduce parte de la fase gaseosa del espacio de cabeza en el líquido de reacción. Por ejemplo, el mezclado o agitación puede crear un remolino que atrae oxígeno al líquido. En general, la descarga del espacio de cabeza con aire en combinación con un mezclado o agitación (vigorosos) introducirá suficiente oxígeno en el material celulósico en el reactor de hidrólisis para reactores de hasta un tamaño de 100 litros a 1 m³. A mayor escala, por ejemplo, en un reactor de 50 m³ o más, por ejemplo 100 m³, se necesita tanta energía para una agitación vigorosa que, desde un punto de vista económico, no se aplicará en un proceso operativo comercial. En general, en reactores grandes, agitar o mezclar sin introducir aire u oxígeno dará como resultado valores de DO inferiores a 0,01 mol/m³.

Durante la generación o producción de oxígeno, la concentración de oxígeno en la fase líquida (aireación o adición de oxígeno), la concentración de oxígeno en la fase líquida en donde el material lignocelulósico está presente durante la hidrólisis enzimática, es preferiblemente el 80 % de la concentración de saturación de oxígeno en condiciones de reacción a la hidrólisis, más preferiblemente como máximo 0,12 mol/m³, aún más preferiblemente como máximo 0,09 mol/m³, incluso más preferiblemente como máximo 0,06 mol/m³, todavía más preferiblemente como máximo 0,045 mol/m³, y lo más preferiblemente como máximo 0,03 mol/m³. Lo anterior explica la situación en la que la tasa de transferencia de oxígeno del material lignocelulósico es mayor que la tasa de captación de oxígeno (OUR) del material lignocelulósico. Cuando el consumo de oxígeno (OUR) es más alto que la tasa de transferencia de oxígeno, la concentración de oxígeno es 0 mol/m³. La temperatura y la presión influirán en el DO. Los valores preferidos y ejemplares de mol/m³ indicados anteriormente se refieren a la presión atmosférica normal y a una temperatura de aproximadamente 62 °C. Un experto en la técnica entenderá los valores favorables de DO con base en las enseñanzas presentes.

El oxígeno se consume en una cantidad correspondiente a entre 20 y 5000 mmol de oxígeno molecular por kg de glucano presente en el material lignocelulósico. Preferiblemente, el oxígeno se consume en una cantidad correspondiente a entre 22 y 4500 mmol de oxígeno molecular por kg de glucano presente en el material lignocelulósico, entre 24 y 4000 mmol de oxígeno molecular por kg de glucano presente en el material lignocelulósico, entre 26 y 3500 mmol de oxígeno molecular por kg de glucano presente en el material lignocelulósico, entre 28 y 3400 mmol de oxígeno molecular por kg de glucano presente en el material lignocelulósico. El oxígeno se añade después del pretratamiento y antes y/o durante la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico, preferiblemente en una cantidad correspondiente al menos 30 mmol de oxígeno molecular por kg de glucano presente en el material lignocelulósico, más preferiblemente en una cantidad correspondiente a al menos 40 mmol de oxígeno molecular por kg de glucano presente en el material lignocelulósico, y lo más preferiblemente en una cantidad correspondiente a al menos 50 mmol de oxígeno molecular por kg de glucano presente en el material lignocelulósico. Todo el oxígeno que se añade al sistema se transferirá al líquido y se utilizará para la hidrólisis. Esta cantidad se puede controlar midiendo y controlando la cantidad de aire que entra en el sistema.

Además, el oxígeno se consume en una cantidad correspondiente a entre 0,17 y 41,7 mmol de oxígeno molecular por kg de glucano presente en el material lignocelulósico por hora. Preferiblemente, el oxígeno se consume en una cantidad correspondiente a entre 0,18 y 37,5 mmol de oxígeno molecular por kg de glucano presente en el material lignocelulósico por hora, entre 0,20 y 33,3 mmol de oxígeno molecular por kg de glucano presente en el material lignocelulósico por hora, entre 0,22 y 29,2 mmol de oxígeno molecular por kg de glucano presente en el material lignocelulósico por hora, entre 0,23 y 28,3 mmol de oxígeno molecular por kg de glucano presente en el material lignocelulósico por hora. Más preferiblemente, el oxígeno se consume en una cantidad correspondiente a entre 0,36 y 27,8 mmol de oxígeno molecular por kg de glucano presente en el material lignocelulósico por hora. Todo el oxígeno que se añade al sistema se transferirá al líquido y se utilizará para la hidrólisis. Esta cantidad se puede controlar midiendo y controlando la cantidad de aire que entra en el sistema. "Por hora", como se usa en la presente, significa por hora de hidrólisis.

La adición de oxígeno en forma de aire u otro gas que contenga oxígeno de acuerdo con la invención también podrá utilizarse para, al menos parcialmente, agitar o mezclar el contenido del reactor de hidrólisis. Otras formas de adición de oxígeno incluyen la generación de oxígeno *in situ*. Por ejemplo, el oxígeno se genera por electrólisis, el oxígeno se produce enzimáticamente, preferiblemente por la adición de peróxido, o el oxígeno se produce químicamente, por ejemplo, por un sistema de generación de oxígeno, tal como KHSOs. Por ejemplo, el oxígeno se produce a partir del peróxido por la catalasa. El peróxido se puede añadir en forma de peróxido disuelto, o generado por una reacción enzimática o química. En caso de que la catalasa se utilice como enzima para producir oxígeno, se puede utilizar la catalasa presente en la composición enzimática para la hidrólisis o se puede añadir catalasa para este propósito.

El proceso actual de la invención muestra ventajas especialmente en la planta piloto y escala industrial. De acuerdo con una realización de la invención, el reactor para la hidrólisis enzimática tiene un volumen de 1 m³ o más. Preferiblemente, el reactor tiene un volumen de al menos 1 m³, al menos 2 m³, al menos 3 m³, al menos 4 m³, al menos 5 m³, al menos 6 m³, al menos 7 m³, al menos 8 m³, al menos 9 m³, al menos 10 m³, al menos 15 m³, al menos 20 m³, al menos 25 m³, al menos 30 m³, al menos 35 m³, al menos 40 m³, al menos 45 m³, al menos 50 m³, al menos 60 m³, al menos 70 m³, al menos 75 m³, al menos 80 m³, al menos 90 m³, al menos 100 m³, al menos 200 m³, al menos 300 m³, al menos 400 m³, al menos 500 m³, al menos 600 m³, al menos 700 m³, al menos 800 m³, al menos 900 m³, al menos 1000 m³, al menos 1500 m³, al menos 2000 m³, al menos 2500 m³. En general, el reactor tendrá un tamaño inferior a 3000 m³ o 5000 m³. Se pueden utilizar varios reactores. Los reactores utilizados en los procesos de la presente invención pueden tener el mismo volumen, pero también pueden tener un volumen diferente.

El inventor plantea la teoría de que, especialmente a gran escala, no hay suficiente oxígeno disponible para la hidrólisis, lo que podría deberse a limitaciones de transferencia de oxígeno en el reactor, por ejemplo, en la biomasa celulolítica. En experimentos a escala de laboratorio, esta insuficiencia de oxígeno puede desempeñar un papel menos importante. El área de superficie (o área de contacto de oxígeno del contenido del reactor) a la relación de volumen del reactor es más favorable para los experimentos a pequeña escala que en los experimentos a gran escala. Además, el mezclado en experimentos a pequeña escala es relativamente más fácil que a gran escala. Durante esos experimentos a pequeña escala, el transporte de oxígeno desde el espacio de cabeza del reactor de hidrólisis también es más rápido en comparación con la situación en experimentos a gran escala. Esta teoría sólo se da como posible explicación del efecto notado por los inventores y la presente invención no depende de la exactitud de esta teoría. De acuerdo con una realización adicional de la invención, la adición de oxígeno puede utilizarse para controlar al menos parcialmente el proceso de hidrólisis.

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

Una enzima "termoestable" significa que la enzima tiene una temperatura óptima de 60 °C o superior, por ejemplo, 70 °C o superior, tal como 75 °C o superior, por ejemplo, 80 °C o superior, tal como 85 °C o superior. Por ejemplo, pueden estar aislados de microorganismos termofílicos, o pueden ser diseñados por un experto y sintetizados artificialmente. En una realización, los polinucleótidos pueden aislarse u obtenerse de hongos filamentosos termofílicos o termotolerantes o aislarse de hongos no termofílicos o no termotolerantes, pero que se encuentran termoestables.

Por "hongo termofílico" se entiende un hongo que crece a una temperatura de 50 °C o más. Por hongo "temotolerante" se entiende un hongo que crece a una temperatura de 45 °C o más, teniendo un máximo cerca de 50 °C.

Ejemplos de cepas de hongos termofílicos son *Rasamsonia emersonii* (anteriormente conocido como *Talaromyces emersoni*). *Talaromyces emersonii*, *Penicillium geosmithia emersonii* y *Rasamsonia emersonii* se utilizan indistintamente en la presente.

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

Thermoascus aurantiacus y *Thielavia terrestris*.

Los hongos termofílicos no están restringidos a un orden taxonómico específico y ocurren en todo el árbol de la vida fúngico. Ejemplos son *Rhizomucor* en los Mucorales, *Myceliophthora* en Sordariales y *Talaromyces*, *Thermomyces* y *Thermoascus* en los Eurotiales (Mouchacca 1997). La mayoría de las especies de *Talaromyces* son mesófilas, pero las excepciones son especies dentro de las secciones *Emersonii* y *Thermophila*. La sección *Emersonii* incluye *Talaromyces emersonii*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Talaromyces bacillisporus* and *Talaromyces leycettanus*, todos los cuales crecen bien a 40 °C. *Talaromyces bacillisporus* es termotolerante, *Talaromyces leycettanus* es termotolerante a termofílico, y *Talaromyces emersonii* y *Talaromyces byssochlamydoides* son verdaderamente termofílicos (Stolk y Sansón, 1972). El único miembro de la sección de *Talaromyces Thermophila*, *T. thermophilus*, crece rápidamente a 50 °C (Evans y Stolk, 1971; Evans, 1971; Stolk y Samson, 1972). La clasificación actual de estas especies termofílicas de *Talaromyces* se basa principalmente en caracteres fenotípicos y fisiológicos, tal como su capacidad de crecer por encima de los 40 °C, el color de la ascospora, la estructura de la cubierta ascornatal y la formación de un determinado tipo de anamorfo. Stolk y Samson (1972) declararon que los miembros de la sección *Emersonii* tienen anamorfos de las series *Paecilomyces* (*T. Byssochlamydoides* y *T. leycettanus*) o *Penicillium cylindrosporum* (*T. emersonii* y *T. bacillisporus*). Más tarde, Pitt (1979) transfirió las especies pertenecientes a la serie *Penicillium cylindrosporum* al género *Geosmithia*, basándose en varios caracteres, tales como la formación de conidios a partir de poros terminales en lugar de en colulas (cuellos), un carácter de *Penicillium* y *Paecilomyces*. Dentro del género *Geosmithia*, sólo *G. argillacea* es termotolerante, y Stolk et al. (1969) y Evans (1971) propusieron una conexión con los miembros de la sección *Talaromyces. Emersonii*. Se desconoce la relación filogenética de las especies termofílicas de *Talaromyces* con las *Trichocomaceae* (véase J. Houbraken, Antonie van Leeuwenhoek, Feb 2012;101(2):403-21).

Rasamsonia es un nuevo género que comprende especies termotolerantes y termofílicas de *Talaromyces* y *Geosmithia* (J. Houbraken et al., *vida supra*). Con base en datos fenotípicos, fisiológicos y moleculares, Houbraken et al. propusieron transferir las especies *T. emersonii*, *T. byssochlamydoides*, *T. eburneus*, *G. argillacea* y *G. cylindrospora* a *Rasamsonia* gen. nov. *Talaromyces emersonii*, *Penicillium geosmithia emersonii* y *Rasamsonia emersonii* se utilizan indistintamente en la presente.

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

"Hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (según lo definido por Hawksworth et al., Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8a edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido). Los hongos filamentosos se caracterizan por una pared micelial compuesta de quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por elongación hifal y el catabolismo del carbono es obligatoriamente aeróbico. Las cepas fúngicas filamentosas incluyen, pero no se limitan a, las cepas de *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*, *Piromyces*, *Panerochaete*, *Pleurotus*, *Podospora*, *Pyricularia*, *Rasamsonia*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Scylatidium*, *Schizophyllum*, *Stagonospora*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thermomyces*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes pleurotus*, *Trichoderma* y *Trichophyton*.

Varias razas de hongos filamentosos son fácilmente accesibles para el público en varias colecciones de cultivos, tales como: American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL). Ejemplos de estas cepas incluyen *Aspergillus niger* CBS 513,88, *Aspergillus oryzae* ATCC 20423, IFO 4177, ATCC 1011, ATCC 9576, ATCC14488-14491, ATCC 11601, ATCC12892, *P. chrysogenum* CBS 455,95, *Penicillium citrinum* ATCC 38065, *Penicillium chrysogenum* P2, *Talaromyces emersonii* CBS 393,64, *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225 o ATCC 48272, *Trichoderma reesei* ATCC 26921 o ATCC 56765 o ATCC 26921, *Aspergillus sojae* ATCC11906, *Chrysosporium lucknowense* C1, Garg 27K, VKM F-3500-D, ATCC44006 y derivados de las mismas.

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

De acuerdo con la invención, mediante la adición de oxígeno es posible alcanzar muchas ventajas del proceso, incluyendo condiciones óptimas de temperatura, tiempo de proceso reducido, dosificación reducida de la enzima, reutilización de enzimas, y otras optimizaciones del proceso, lo que da como resultado la reducción de costos. Ventajosamente, la invención proporciona un proceso en el que el paso de hidrólisis se lleva a cabo en condiciones mejoradas. La invención también proporciona un proceso de hidrólisis que tiene un tiempo de proceso reducido. Además, la invención proporciona un proceso, en donde la dosificación de la enzima puede reducirse y al mismo tiempo la producción de producto de hidrólisis útil se mantiene al mismo nivel. Otra ventaja de la invención es que el proceso actual de hidrólisis puede dar lugar a condiciones de proceso optimizadas. Una ventaja adicional de la invención es que la producción de producto de

hidrólisis útil del proceso que implica hidrólisis se aumenta utilizando la misma dosificación enzimática.

Composición enzimática estable

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

En una realización la composición enzimática utilizada en los procesos de la presente invención se deriva de un hongo o la composición enzimática utilizada en los procesos de la presente invención comprende una enzima fúngica. En una realización, la composición enzimática se deriva de un hongo filamentoso o la composición enzimática comprende una enzima fúngica filamentosa. Los procesos de la invención se aplican ventajosamente en combinación con composiciones enzimáticas derivadas de un microorganismo del género *Rasamsonia*, o la composición enzimática comprende una enzima de *Rasamsonia*.

La composición enzimática puede prepararse mediante la fermentación de un sustrato adecuado con un microorganismo adecuado, por ejemplo, *Rasamsonia emersonii* o *Aspergillus niger*, en donde la composición enzimática es producida por el microorganismo. El microorganismo puede ser alterado para mejorar o para preparar la composición de la celulosa. Por ejemplo, el microorganismo puede mutarse por procedimientos clásicos de mejora de la cepa o por técnicas de ADN recombinante. Por lo tanto, los microorganismos mencionados en la presente pueden ser utilizados como tales para producir la composición de la celulosa o pueden ser alterados para aumentar la producción o para producir una composición de celulosa alterada que podría incluir celulasas heterólogas, por lo tanto, enzimas que no son producidas originalmente por ese microorganismo. Preferiblemente, un hongo, más preferiblemente un hongo filamentoso, se utiliza para producir la composición de celulosa. Ventajosamente, se utiliza un microorganismo termofílico o termotolerante. Opcionalmente, se utiliza un sustrato que induce la expresión de las enzimas en la composición enzimática durante la producción de la composición enzimática.

La composición enzimática se utiliza para la liberación de azúcares de lignocelulosa que comprende polisacáridos. Los principales polisacáridos son la celulosa (glucanos) y las hemicelulosas (xilanos, heteroxilanos y xiloglucanos). Además, algunas hemicelulosas pueden estar presentes como glucomananos, por ejemplo, en materias primas derivadas de la madera. La hidrólisis enzimática de estos polisacáridos a azúcares solubles, incluyendo tanto monómeros como multímeros, por ejemplo, glucosa, celobiosa, xilosa, arabinosa, galactosa, fructosa, manosa, ramnosa, ribosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico, y otras hexosas y pentosas se producen bajo la acción de diferentes enzimas que actúan de forma concertada. Por producto de azúcar se entiende el producto de hidrólisis enzimática de la materia prima o material lignocelulósico. El producto de azúcar comprenderá azúcares solubles, incluyendo tanto monómeros como multímeros, preferiblemente comprenderá glucosa. Ejemplos de otros azúcares son la celulosa, xilosa, arabinosa, galactosa, fructosa, manosa, ramnosa, ribosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico y otras hexosas y pentosas. El producto de azúcar puede utilizarse como tal o puede transformarse posteriormente, por ejemplo, purificarse.

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

La celulosa es un polisacárido lineal compuesto de residuos de glucosa vinculados por enlaces β -1,4. La naturaleza lineal de las fibras de celulosa, así como la estequiometría de la glucosa ligada a β (en relación con α), genera estructuras más propensas a la unión entre hilos de hidrógeno que las estructuras altamente ramificadas del almidón ligadas a α . Por lo tanto, los polímeros de celulosa son generalmente menos solubles y forman fibras más estrechamente unidas que las fibras que se encuentran en el almidón.

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

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

Las xilanasas junto con otras enzimas accesorias, por ejemplo, α -L-arabinofuranosidasas, feruloilo y acetilxilano

esterasas, glucuronidasas y β -xilosidasas) catalizan la hidrólisis de las hemicelulosas.

Las sustancias pécticas incluyen pectinas, arabinanos, galactanos y arabinogalactanos. Las pectinas son los polisacáridos más complejos en la pared celular de la planta. Se construyen alrededor de una cadena central de unidades de ácido D-galacturónico ligadas a $\alpha(1,4)$ intercaladas hasta cierto punto con L-ramnosa. En cualquier pared celular hay una serie de unidades estructurales que se ajustan a esta descripción y generalmente se ha considerado que en una sola molécula péctica, las cadenas centrales de diferentes unidades estructurales son continuas entre sí.

Los principales tipos de unidades estructurales son: galacturonano (homogalacturonano), que puede estar sustituido con metanol en el grupo carboxilo y acetato en O-2 y O-3; ramnogalacturonano I (RGI), en el que las unidades de ácido galacturónico se alternan con unidades de ramnosa con lactano ligado (1,4) y (1,5) arabinano. Las cadenas laterales de arabinano pueden estar unidas directamente a la ramnosa o indirectamente a través de las cadenas de galactano; xilacturonano, con unidades únicas de xilósil en O-3 de ácido galacturónico (estrechamente asociado con RGI); y ramnogalacturonano II (RGII), una unidad menor particularmente compleja que contiene azúcares inusuales, por ejemplo, apiosa. Una unidad RGII puede contener dos residuos de apiosilo que, bajo condiciones iónicas adecuadas, pueden formar ésteres reversibles con borato.

Una composición para su uso en un método de la invención comprende preferiblemente al menos dos actividades, aunque típicamente una composición comprenderá más de dos actividades, por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más. Normalmente, una composición de la invención puede comprender al menos dos celulasas diferentes, o dos celulasas y al menos una hemicelulasa. Una composición de la invención puede comprender celulasas, pero no xilanasas. Además, una composición de la invención puede comprender actividad enzimática auxiliar, es decir, actividad adicional que, directa o indirectamente, conduce a la degradación de la lignocelulosa. Ejemplos de tales actividades auxiliares se mencionan en la presente.

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

Una composición para su uso en la invención actual puede derivarse de un hongo, tal como un hongo filamentoso, tal como *Rasamsonia*, tal como *Rasamsonia emersonii*. En una realización, un conjunto central de actividades enzimáticas (degradantes de lignocelulosa) puede derivarse de *Rasamsonia emersonii*. Como se demuestra en la presente, *Rasamsonia emersonii* puede proporcionar un conjunto altamente eficaz de actividades para la hidrólisis del material lignocelulósico. Si es necesario, el conjunto de actividades se puede complementar con actividades enzimáticas adicionales de otras fuentes. Estas actividades adicionales pueden derivarse de fuentes clásicas y/o ser producidas por organismos genéticamente modificados.

Las actividades de una composición para su uso en la invención pueden ser termoestables. En la presente, esto significa que la actividad tiene un óptimo de temperatura de aproximadamente 60 °C o superior, por ejemplo, aproximadamente 70 °C o superior, tal como aproximadamente 75 °C o superior, por ejemplo, aproximadamente 80 °C o superior, tal como 85 °C o más superior. Las actividades de una composición para su uso en la invención normalmente no tendrán la misma temperatura óptima, sin embargo, preferiblemente, será termoestables.

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

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

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

La composición enzimática que se utilizará en los procesos de la invención actual puede comprender una celulasa y/o una hemicelulasa y/o una pectinasa de una fuente distinta de *Rasamsonia*. Pueden usarse junto con una o más enzimas de *Rasamsonia* o pueden usarse sin que existan enzimas *Rasamsonia* adicionales.

Por ejemplo, las enzimas para su uso en los procesos de la invención actual pueden comprender una beta-glucosidasa

(BG) de *Aspergillus*, como *Aspergillus oryzae*, tal como la indicada en WO 02/095014 o la proteína de fusión con actividad beta-glucosidasa 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-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus*, tal como una divulgada en WO 2012/044915, tal como una con las siguientes sustituciones: F100D, S283G, N456E, F512Y (utilizando SEQ ID NO: 5 en WO 2014/130812 para numeración), o *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus kawachi*. En otra realización la beta-glucosidasa se deriva de *Penicillium*, tal como *Penicillium brasilianum* divulgado como SEQ ID NO:2 en WO 2007/019442, o de *Trichoderma*, tal como *Trichoderma reesei*, tales como los descritos en US 6,022,725, US 6,982,159, US 7,045,332, US 7,005,289, US 2006/0258554 US 2004/0102619. En una realización, incluso se puede utilizar una beta-glucosidasa bacteriana. En otra realización, la beta-glucosidasa se deriva de *Thielavia terrestris* (WO 2011/035029) o *Trichophaea saccata* (WO 2007/019442).

Por ejemplo, las enzimas para su uso en los procesos de la invención actual pueden comprender una endoglucanasa (EG) de *Trichoderma*, tal como *Trichoderma reesei*; de *Humicola*, tal como una cepa de *Humicola insolens*; de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus aculeatus* o *Aspergillus kawachii*; de *Erwinia*, tal como *Erwinia carotovora*; de *Fusarium*, tal como *Fusarium oxysporum*; de *Thielavia*, tal como *Thielavia terrestris*; de *Humicola*, tal como *Humicola grisea* var. *thermoidea* o *Humicola insolens*; de *Melanocarpus*, tal como *Melanocarpus albomyces*; de *Neurospora*, tal como *Neurospora crassa*; de *Myceliophthora*, tal como *Myceliophthora thermophila*; de *Cladorrhinum*, tal como *Cladorrhinum foecundissimum* y/o de *Chrysosporium*, tal como una cepa de *Chrysosporium lucknowense*. En una realización, incluso una endoglucanasa bacteriana puede ser utilizada, incluyendo, pero sin limitarse a, endoglucanasa de *Acidothermus cellulolyticus* (véase, 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* (véase, WO 05/093050); y endoglucanasa V de *Thermobifida fusca* (véase, WO 05/093050).

Por ejemplo, las enzimas para su uso en los procesos de la invención actual pueden comprender una celobiohidrolasa I de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus fumigatus*, tales como Cel7A CBH I, que se divulga en SEQ ID NO:6 en WO 2011/057140 o SEQ ID NO:6 en WO 2014/130812, o de *Trichoderma*, tal como *Trichoderma reesei*.

Por ejemplo, las enzimas para su uso en los procesos de la invención actual pueden comprender una celobiohidrolasa II de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus fumigatus*, tal como la de SEQ ID NO:7 en WO 2014/130812 o de *Trichoderma*, tal como *Trichoderma reesei*, o de *Thielavia*, tal como *Thielavia terrestris*, tal como celobiohidrolasa II CEL6A de *Thielavia terrestris*.

Por ejemplo, las enzimas para uso en los procesos de la presente invención pueden comprender un polipéptido GH61 (una monooxigenasa lítica de polisacáridos) de *Thermoascus*, tal como *Thermoascus aurantiacus*, tal como el descrito 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 *Thielavia terrestris*, tal como el descrito en WO 2005/074647 como SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO:4 en WO2014/130812 y en WO 2008/148131, y WO2011/035027; o de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus fumigatus*, como el descrito en WO 2010/138754 como SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO: 3 en WO2014/130812; o de *Penicillium*, tal como *Penicillium emersonii*, como el que se divulga como SEQ ID NO:2 en WO 2011/041397 o SEQ ID NO:2 en WO2014/130812. Otros polipéptidos GH61 adecuados incluyen, pero no se limitan a *Trichoderma reesei* (véase, WO 2007/089290), *Myceliophthora thermophila* (véase, WO 2009/085935, WO 2009/085859, WO 2009/085864, WO 2009/085868), *Penicillium pinophilum* (véase, WO 2011/005867), *Thermoascus* sp. (véase, WO 2011/039319), y *Thermoascus crustaceus* (véase, WO 2011/041504). En un aspecto, el polipéptido GH61 se utiliza en presencia de un catión metálico divalente activador soluble según WO 2008/151043, por ejemplo, sulfato de manganeso. En un aspecto, el polipéptido GH61 se utiliza en presencia de un compuesto dioxi, un compuesto bicíclico, un compuesto heterocíclico, un compuesto que contiene nitrógeno, un compuesto de quinona, un compuesto que contiene azufre, o un líquido obtenido de un material celulósico pretratado, tal como el rastrojo de maíz pretratado.

Otras enzimas celulolíticas que pueden utilizarse en los procesos de la presente invención 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 nombrar sólo algunas.

Además, ejemplos de xilanasas útiles en los procesos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, xilanasas de *Aspergillus aculeatus* (véase, WO 94/21785), *Aspergillus fumigatus* (véase WO 2006/078256), *Penicillium pinophilum* (véase, WO 2011/041405), *Penicillium* sp. (véase, WO 2010/126772), *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (véase, WO 2009/079210), y *Trichophaea saccata* GH10 (véase, WO 2011/057083). Ejemplos de beta-xilosidasas útiles en los procesos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, beta-xilosidasas de *Neurospora crassa* y *Trichoderma reesei*. Ejemplos de acetilxilano esterasas útiles en los procesos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, acetilxilano esterasas de *Aspergillus aculeatus* (véase, WO 2010/108918), *Chaetomium globosum*, *Chaetomium gracile*, *Humicola insolens* DSM 1800 (véase, WO 2009/073709), *Hypocrea jecorina* (véase, WO 2005/001036), *Myceliophthora thermophila* (véase, WO 2010/014880), *Neurospora crassa*, *Phaeosphaeria nodorum* y *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (véase, WO 2009/042846). Ejemplos de feruloil esterasas (esterasas de ácido ferúlico) útiles en los procesos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, feruloil esterasas de *Humicola insolens* DSM 1800 (véase, WO 2009/076122), *Neosartorya fischeri*, *Neurospora crassa*, *Penicillium aurantiogriseum* (véase, WO 2009/127729), y

Thielavia terrestris (véase, WO 2010/053838 y WO 2010/065448). Ejemplos de arabinofuranosidasas útiles en los procesos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, arabinofuranosidasas de *Aspergillus niger*, *Humicola insolens* DSM 1800 (véase WO 2006/114094 y WO 2009/073383) y *M. giganteus* (véase WO 2006/114094). Ejemplos de alfa-glucuronidasas útiles en los procesos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, las alfa-glucuronidasas de *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Humicola insolens* (véase, WO 2010/014706), *Penicillium aurantiogriseum* (véase, WO 2009/068565) y *Trichoderma reesei*.

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

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

En la presente, una celulasa es cualquier polipéptido que es capaz de degradar o modificar la celulosa. Un polipéptido capaz de degradar la celulosa es aquel que es 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 según la invención puede dar lugar a una población mixta de celodextrinas y monómeros de glucosa cuando se pone en contacto con la celulosa. Tal degradación se producirá típicamente por medio de una reacción de hidrólisis.

Las LPMO (monooxigenasas líticas de polisacáridos) han sido clasificadas recientemente por CAZy en la familia AA9 (Familia de Actividad Auxiliar 9) o AA10 (Familia de Actividad Auxiliar 10). Como se mencionó anteriormente, la LPMO es capaz de abrir una estructura de glucano cristalino. La LPMO también puede afectar los celo-oligosacáridos. En la presente, se utilizan PMO y LPMO indistintamente. Las proteínas GH61 (familia de glucósido hidrolasas 61 o a veces denominadas EGV) son monooxigenasas (líticas) de polisacáridos dependientes del oxígeno (PMO/LPMO) según la literatura más reciente (Isaksen et al., Journal of Biological Chemistry, vol. 289, no. 5, pp. 2632-2642). A menudo, en la literatura, estas proteínas se mencionan para mejorar la acción de las celulasas sobre los sustratos de lignocelulosa. GH61 se clasificó originalmente como endoglucanasa con base en la medición de la actividad muy débil de endo-1,4-β-D-glucanasa en un miembro de la familia. El término "GH61", como se utiliza en la presente, debe entenderse como una familia de enzimas, que comparten porciones y plegamientos de secuencia conservados comunes para ser clasificados en la familia 61 del sistema de clasificación CAZy GH bien establecido (<http://www.cazy.org/GH61.html>). La familia de glucósido hidrolasas 61 es un miembro de la familia de glucósido hidrolasas EC 3.2.1. Los GH61 se han reclasificado recientemente por CAZy en la familia AA9 (Familia de Actividad Auxiliar 9). GH61 se considera en la presente como parte de las celulasas. CBM33 (módulo de unión a carbohidratos de la familia 33) es una LPMO (Isaksen et al., Journal of Biological Chemistry, vol. 289, no 5, pp. 2632-2642), CAZy ha reclasificado recientemente CBM33 en AA10 (Familia de Actividad Auxiliar 10).

En la presente, una hemicelulasa es cualquier polipéptido que es capaz de degradar o modificar la hemicelulosa. Es decir, una hemicelulasa puede ser capaz de degradar o modificar uno o más de xilano, glucuronoxilano, arabinoxilano, glucomanano y xiloglucano. Un polipéptido capaz de degradar una hemicelulosa es aquel que es 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 según la invención puede dar lugar a una población mixta de oligosacáridos y monómeros de azúcar cuando se pone en contacto con la hemicelulosa. Tal degradación se producirá típicamente por medio de una reacción de hidrólisis.

En la presente, una pectinasa es cualquier polipéptido que es capaz de degradar o modificar la pectina. Un polipéptido que es capaz de degradar la pectina es aquel que es capaz de catalizar el proceso de descomponer la pectina en unidades más pequeñas, ya sea parcialmente, por ejemplo, en oligosacáridos, o completamente en monómeros de azúcar. Una pectinasa de acuerdo con la invención puede dar lugar a una población mixta de oligosacáridos y monómeros de azúcar cuando se pone en contacto con la pectinasa. Tal degradación se producirá típicamente por medio de una reacción de hidrólisis.

En consecuencia, una composición de la invención puede comprender cualquier celulasa, por ejemplo, una GH61, una celobiohidrolasa, una endo-β-1,4-glucanasa, una beta-glucosidasa o una β-(1,3)(1,4)-glucanasa.

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

En la presente, una endo- β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,4- β -D-glucosídicos en celulosa, liquenina o β -D-glucanos de cereales. Tal polipéptido también puede ser capaz de hidrolizar enlaces 1,4 en β -D-glucanos que también contienen enlaces 1,3. Esta enzima también se puede denominar celulasa, avicelasa, β -1,4-endoglucano hidrolasa, β -1,4-glucanasa, carboximetilcelulasa, celludextrinasa, endo-1,4- β -D-glucanasa, endo-1,4- β -D-glucanohidrolasa, endo-1,4- β -glucanasa o endoglucanasa.

En la presente, una beta-glucosidasa (EC 3.2.1.21) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de residuos terminales de β -D-glucosa con liberación de β -D-glucosa. Tal polipéptido puede tener una amplia especificidad para los 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 denominar amigdalasa, β -D-glucósido glucohidrolasa, celobiasa o gentobiasa.

En la presente, una β -(1,3)(1,4)-glucanasa (EC 3.2.1.73) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la hidrólisis de enlaces 1,4- β -D-glucosídicos en β -D-glucanos que contengan enlaces 1,3 y 1,4. Este polipéptido puede actuar sobre licenina y β -D-glucanos de cereales, pero no sobre los β -D-glucanos que contengan sólo enlaces 1,3 o 1,4. Esta enzima también se puede denominar liceninasa, 1,3-1,4- β -D-glucano 4-glucanohidrolasa, β -glucanasa, endo- β -1,3-1,4 glucanasa, licenasa, o β -glucanasa de enlace mixto. Una alternativa para este tipo de enzima es EC 3.2.1.6, que se describe como endo-1,3(4)-beta-glucanasa. Este tipo de enzima hidroliza los enlaces 1,3 o 1,4 de la beta-D-glucanosa cuando el residuo de glucosa cuyo grupo reductor está implicado en el enlace que se va a hidrolizar está a su vez sustituido en C-3. Los nombres alternativos incluyen endo-1,3-beta-glucanasa, laminarinasa, 1,3-(1,3;1,4)-beta-D-glucano 3 (4) glucanohidrolasa; los sustratos incluyen laminarina, licenina y beta-D-glucanos de cereales.

Una composición para su uso en la invención puede comprender cualquier hemicelulasa, por ejemplo, una endoxilanas, una β -xilosidasa, una α -L-arabionofuranosidasa, una α -D-glucuronidasa, una acetil xilan esterasa, una feruloil esterasa, una coumaroil esterasa, una α -galactosidasa, una β -galactosidasa, una β -mananasa o una β -manosidasa.

En la presente, una endoxilanas (EC 3.2.1.8) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,4- β -D-xilosídicos en xilanos. Esta enzima también se puede denominar endo-1,4- β -xilanas o 1,4- β -D-xilan xilano hidrolasa. Una alternativa es EC 3.2.1.136, una endoxilanas de glucuronoarabinoxilano, una enzima capaz de hidrolizar los enlaces 1,4 xilosídicos de los glucuronoarabinoxilanos.

En la presente, una β -xilosidasa (EC 3.2.1.37) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la hidrólisis de 1,4- β -D-xilanos, para eliminar los sucesivos residuos de D-xilosa de los terminales no reductores. Tales enzimas también pueden hidrolizar la xilobiosa. Esta enzima también se puede denominar xilan 1,4- β -xilosidasa, 1,4- β -D-xilan xilohidrolasa, exo-1,4- β -xilosidasa o xilobiasa.

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

En la presente, una α -D-glucuronidasa (EC 3.2.1.139) es cualquier polipéptido capaz de catalizar una reacción de la siguiente forma: α -D-glucuronósido + H₂O = un alcohol + D-glucuronato. Esta enzima también se puede denominar α -D-glucuronidasa o α -glucosiduronasa. Estas enzimas también pueden hidrolizar el ácido glucorónico 4-O-metilado, que también puede estar presente como un sustituyente en los xilanos. La alternativa es EC 3.2.1.131: xilan α -1,2-glucuronosidasa, que cataliza la hidrólisis de los enlaces α -1,2-(4-O-metil)glucuronosilo.

En la presente, una acetil xilano esterasa (EC 3.1.1.72) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la desacetilación de xilanos y xilo-oligosacáridos. Dicho polipéptido puede catalizar la hidrólisis de grupos acetilo a partir de xilano polimérico, xilosa acetilada, glucosa acetilada, acetato de α -naptilo o acetato de p-nitrofenilo pero, normalmente, no a partir de glicerol triacetilo. Tal polipéptido típicamente no actúa sobre el manano acetilado o la pectina.

En la presente, una feruloil esterasa (EC 3.1.1.73) es cualquier polipéptido capaz de catalizar una reacción de la forma: feruloil-sacárido + H₂O = ferulado + sacárido. El sacárido puede ser, por ejemplo, un oligosacárido o un polisacárido. Típicamente puede catalizar la hidrólisis del grupo 4-hidroxi-3-metoxycinnamoyl (feruloil) de un azúcar esterificado, que suele ser la arabinosa en sustratos "naturales". El acetato de p-nitrofenol y el ferulato de metilo suelen ser sustratos más pobres. Esta enzima también puede ser denominada cinnamoyl éster hidrolasa, ácido ferúlico esterasa o hidroxycinnamoyl esterasa. También se puede denominar enzima accesorio de la hemicelulosa, ya que puede ayudar a xilanasas y pectinasas a descomponer la hemicelulosa de la pared celular de la planta y la pectina.

En la presente, una coumaroil esterasa (EC 3.1.1.73) es cualquier polipéptido capaz de catalizar una reacción de la forma: coumaroil-sacárido + H₂O = coumarato + sacárido. El sacárido puede ser, por ejemplo, un oligosacárido o un polisacárido. Esta enzima también se puede denominar trans-4-coumaroil esterasa, trans-p-coumaroil esterasa, p-coumaroil esterasa o ácido p-cumárico esterasa. Esta enzima también cae dentro de EC 3.1.1.73, por lo que también se puede denominar feruloil esterasa.

En la presente, una α -galactosidasa (EC 3.2.1.22) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la hidrólisis de residuos de

α -D-galactosa terminales no reductores en α -D-galactósidos, incluyendo oligosacáridos de galactosa, galactomananos, galactanos y arabinogalactanos. Tal polipéptido también puede ser capaz de hidrolizar α -D-fucósidos. Esta enzima también puede ser denominada melibiasa.

5 En la presente, una β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la hidrólisis de residuos terminales no reductores de β -D-galactosa en β -D-galactósidos. Tal polipéptido también puede ser capaz de hidrolizar α -L-arabinosidos. Esta enzima también puede denominarse exo-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-galactanasa o lactasa.

10 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 denominar manan endo-1,4- β -manosidasa o endo-1,4-mananasa.

15 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 denominar mananasa o manasa.

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

25 En la presente, una endo-poligalacturonasa (EC 3.2.1.15) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis aleatoria de enlaces 1,4- α -D-galactosiduronic en pectato y otros galacturonanos. Esta enzima también se puede denominar 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) gliccanohidrolasa.

30 En la presente, una pectina metil esterasa (EC 3.1.1.11) es cualquier enzima capaz de catalizar la reacción: pectina + n H₂O = n metanol + pectato. La enzima también puede denominarse pectinesterasa, pectina demetoxilasa, pectina metoxilasa, pectina metilesterasa, pectasa, pectinoesterasa o pectina pectilhidrolasa.

35 En la presente, una endo-galactanasa (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 arabinogalactán endo-1,4- β -galactosidasa, endo-1,4- β -galactanasa, galactanasa, arabinogalactanasa o arabinogalactán 4- β -D-galactanohidrolasa.

En la presente, una acetil esterasa de pectina se define como cualquier enzima que tiene una actividad acetil esterasa que cataliza la desacetilación de los grupos acetilo en los grupos hidroxilo de los residuos GalUA de la pectina.

40 La presente, una endo-pectina liasa (EC 4.2.2.10) es cualquier enzima capaz de catalizar la escisión eliminativa del (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-galacturonano metil éster para dar oligosacáridos con grupos 4-deoxi-6-O-metil- α -D-galact-4-enuronosil en sus extremos no reductores. La enzima también puede denominarse pectina liasa, pectina *trans*-eliminasa; endo-pectina liasa, polimetilgalacturónico transeliminasa, pectina metiltranseliminasa, pectoliasa, PL, PNL o PMGL, o (1 $\rightarrow$ 4)-6-O-metil- α -D-galacturonano liasa.

45 En la presente, una pectato liasa (EC 4.2.2.2) es cualquier enzima capaz de catalizar la escisión eliminativa de (1 $\rightarrow$ 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 denominarse poligalacturónico transeliminasa, ácido péctico transeliminasa, poligalacturonato liasa, endopectina metiltranseliminasa, pectato transeliminasa, endogalacturonato transeliminasa, ácido péctico liasa, liasa péctica, ácido α -1,4-D-endopoligalacturónico liasa, PGA liasa, PPasa-N, endo- α -1,4-poligalacturónico ácido liasa, ácido poligalacturónico liasa, pectina *trans*-eliminasa, ácido poligalacturónico *trans*-eliminasa o (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-galacturonano liasa.

50 En la presente, una alfa-ramnosidasa (EC 3.2.1.40) es cualquier polipéptido que sea capaz de catalizar la hidrólisis de residuos terminales no reductores de α -L-ramnosa en los α -L-ramnósidos o alternativamente en el ramnogalacturonano. Esta enzima también puede denominarse α -L-ramnosidasa T, α -L-ramnosidasa N o α -L-ramnósido ramnoidrolasa.

55 En la presente, la exo-galacturonasa (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 denominarse exo-poli- α -galacturonosidasa, expoligalacturonosidasa o expoligalacturanosidasa.

60 En la presente, la exo-galacturonasa (EC 3.2.1.67) es cualquier polipéptido capaz de catalizar: (1,4- α -D-galacturonida)_n + H₂O = (1,4- α -D-galacturonida)_{n-1} + D-galacturonato. La enzima también puede denominarse galacturano 1,4- α -galacturonidasa, expoligalacturonasa, poli(galacturonato) hidrolasa, exo-D-galacturonasa, exo-D-galacturonanasa, expoligalacturonasa o poli(1,4- α -D-galacturónido) galacturonohidrolasa.

65 En la presente, la expoligalacturonato liasa (EC 4.2.2.9) es cualquier polipéptido capaz de catalizar la escisión eliminativa

de 4-(4-deoxi- α -D-galact-4-enuronosil)-D-galacturonato del extremo reductor del pectato, es decir, de la pectina desesterificada. Esta enzima puede denominarse pectato disacárido-liasa, pectato exo-liasa, transeliminasa de ácido exopéctico, exopectato liasa, ácido exopoligalacturónico-trans-eliminasa, PATE, exo-PATE, exo-PGL o disacárido liasa terminal reductora de (1 $\rightarrow$ 4)- α -D galacturonano.

5

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

10

En la presente, la ramnogalacturonano liasa es cualquier polipéptido capaz de escindir enlaces α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-GalpA de forma endo en ramnogalacturonano por beta-eliminación.

En la presente, ramnogalacturonano acetil esterasa es cualquier polipéptido que cataliza la desacetilación de la cadena principal de la alternancia de ramnosa y residuos de ácido galacturónico en ramnogalacturonano.

15

En la presente, ramnogalacturonano galacturonohidrolasa es cualquier polipéptido que es capaz de hidrolizar el ácido galacturónico del extremo no reductor de las estructuras de ramnogalacturonano estrictamente alternadas en una forma exográfica.

20

Por xilogalacturonasa se entiende cualquier polipéptido que actúe sobre el xilogalacturonano escindiendo la cadena principal del ácido galacturónico sustituido por β -xilosa de forma endogénica. Esta enzima también puede denominarse xilogalacturonano hidrolasa.

25

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

30

En la presente, la endo-arabinanasa (EC 3.2.1.99) es cualquier polipéptido que es capaz de catalizar la endohidrólisis de enlaces 1,5- α -arabinofuranosídicos en 1,5-arabinanos. La enzima también puede ser denominada endo-arabinasa, arabinan endo-1,5- α -L-arabinosidasa, endo-1,5- α -L-arabinanasa, endo- α -1,5-arabanasa, endo-arabanasa o 1,5- α -L-arabinan 1,5- α -L-arabinanohidrolasa.

35

Una composición para su uso en la invención normalmente comprenderá al menos dos celulasas y, opcionalmente, al menos una hemicelulasa y, opcionalmente, al menos una pectinasa (una de las cuales es un polipéptido de acuerdo con la invención). Una composición de la invención puede comprender una GH61, una celobiohidrolasa, una endoglucanasa y/o una beta-glucosidasa. Tal composición también puede comprender una o más hemicelulasas y/o una o más pectinasas.

40

Además, una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o todos) de una amilasa, una proteasa, una lipasa, una ligninasa, una hexosiltransferasa, una glucuronidasa o una expansina, o una proteína inducida por celulosa o una proteína integradora de celulosa, o similares pueden estar presentes en una composición para su uso en la invención (estas se denominan actividades auxiliares anteriormente).

45

La "proteasa" incluye las enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos (peptidasas), así como las enzimas que hidrolizan los enlaces entre los péptidos y otros elementos, como los azúcares (glicopéptidasas). Muchas proteasas se caracterizan bajo EC 3.4, y son adecuadas para su uso en la invención incorporada en la presente como referencia. Algunos tipos específicos de proteasas incluyen, proteasas de cisteína incluyendo pepsina, papaína y serina, proteasas que incluyen quimotripsinas, carboxipeptidasas y metaloendopeptidasas.

50

La "lipasa" incluye enzimas que hidrolizan lípidos, ácidos grasos y acilglicéridos, incluyendo fosfoglicéridos, lipoproteínas, diacilgliceroles, y similares. En las plantas, los lípidos se utilizan 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.

55

La "ligninasa" incluye enzimas que pueden hidrolizar o descomponer la estructura de los polímeros de lignina. Las enzimas que pueden descomponer la lignina incluyen peroxidasas de lignina, peroxidasas de manganeso, lacasas y feruloil esterases, y otras enzimas descritas en la técnica conocidas por despolimerizar o romper de otra manera los polímeros de lignina. También se incluyen enzimas capaces de hidrolizar las uniones formadas entre los azúcares hemicelulósicos (especialmente arabinosa) y la lignina. Las ligninasas incluyen, entre otras, el siguiente grupo de enzimas: peroxidasas de lignina (EC 1.11.1.14), peroxidasas de manganeso (EC 1.11.1.13), lacasas (EC 1.10.3.2) y feruloil esterases (EC 3.1.1.73).

60

La "hexosiltransferasa" (2,4,1-) incluye enzimas capaces de catalizar una reacción transferasa, pero que también pueden catalizar una reacción de hidrólisis, por ejemplo, de celulosa y/o productos de degradación de celulosa. Un ejemplo de una hexosiltransferasa que puede usarse en la invención es una β -glucanosiltransferasa. Tal enzima puede ser capaz de catalizar la degradación de (1,3)(1,4)glucano y/o celulosa y/o un producto de degradación de celulosa.

65

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

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

Las expansinas están implicadas en el aflojamiento de la estructura de la pared celular durante el crecimiento celular de la planta. Se ha propuesto que las expansinas alteren la unión de hidrógeno entre la celulosa y otros polisacáridos de la pared celular sin tener actividad hidrolítica. De esta manera, se cree que permiten el deslizamiento de las fibras de celulosa y la ampliación de la pared celular. La swollenina, una proteína similar a la expansina, contiene un dominio N-terminal del módulo de unión a carbohidratos de la familia 1 (CBD) y un dominio C-terminal similar a la expansina. A los efectos de esta invención, una proteína similar a la expansina o una proteína similar a la swollenina puede comprender uno o ambos de esos dominios y/o puede alterar la estructura de las paredes celulares (tal como alterar la estructura de la celulosa), opcionalmente sin producir cantidades detectables de azúcares reductores.

Una composición para su uso en la invención puede comprender una proteína inducida por celulosa, por ejemplo, el producto polipéptido del gen *cip1* o *cip2*, o genes similares (véase, Foreman et al., J. Biol. Chem. 278(34), 31988-31997, 2003), una proteína integradora de celulosa/celulosoma, por ejemplo el producto polipeptídico del gen *cipA* o *cipC*, o una scaffoldina o una proteína similar a la scaffoldina. Las scaffoldinas y proteínas integradoras de celulosa son subunidades integradoras multifuncionales que pueden organizar subunidades celolíticas en un complejo multienzimático. Esto se logra mediante la interacción de dos clases complementarias de dominio, es decir, un dominio de cohesión en scaffoldina y un dominio dedockerina en cada unidad enzimática. La subunidad de scaffoldina también porta un módulo de unión a celulosa (CBM) que media la fijación del celulosoma a su sustrato. Una scaffoldina o proteína integradora de celulosa a los efectos de esta invención puede comprender uno o ambos dominios.

Una composición para su uso en la invención actual también puede comprender una catalasa. El término "catalasa" significa un peróxido de hidrógeno: oxidoreductasa de 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 mediante el monitoreo de la degradación del peróxido de hidrógeno a 240 nm en función de la siguiente reacción: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. La reacción se realiza en 50 mM de fosfato pH 7,0 a 25 °C con sustrato de 10,3 mM (H_2O_2) y aproximadamente 100 unidades de enzima por ml. La absorbancia se monitorea espectrofotométricamente en 16-24 segundos, lo que debe corresponder a una reducción de la absorbancia de 0,45 a 0,4. Una unidad de actividad de la catalasa puede expresarse como un micromol de H_2O_2 degradado por minuto a pH 7,0 y 25 °C.

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

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

Las enzimas se pueden producir de forma exógena en microorganismos, levaduras, hongos, bacterias o plantas, luego se aíslan y añaden, por ejemplo, a la materia prima lignocelulósica. Alternativamente, las enzimas se producen, pero no se aíslan, y el caldo de fermentación de masa celular bruta, o material vegetal (como el rastrojo de maíz o la paja de trigo), y similares se pueden añadir, por ejemplo, a la materia prima. Alternativamente, la masa celular bruta o el medio de producción enzimática o el material vegetal pueden tratarse para evitar un mayor crecimiento microbiano (por ejemplo, mediante el calentamiento o la adición de agentes antimicrobianos), y luego añadirse a, por ejemplo, una materia prima. Estas mezclas de enzimas brutas pueden incluir el organismo que produce la enzima. Alternativamente, la enzima se puede producir en una fermentación que utiliza materia prima (pretratada) (como rastrojo de maíz o paja de trigo) para proporcionar nutrición a un organismo que produce una enzima o enzimas. De esta manera, las plantas que producen las enzimas pueden actuar por sí mismas como materia prima lignocelulósica y añadirse a la materia prima lignocelulósica.

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

Por lo tanto, la invención se refiere a los métodos en los que se utiliza la composición descrita anteriormente y a los usos de la composición en procesos industriales.

En una realización de los procesos de acuerdo con la presente invención, la composición enzimática está en forma de un caldo de fermentación completo de un hongo. En una realización, las composiciones enzimáticas pueden ser un caldo de

- fermentación completo como se describe a continuación. 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 filamentosos es un hongo filamentosos recombinante que comprende uno o más genes que pueden ser homólogos o heterólogos al hongo filamentosos. En una realización, el hongo filamentosos es un hongo filamentosos recombinante que comprende uno o más genes que pueden ser homólogos o heterólogos al hongo filamentosos, en donde uno o más genes codifican enzimas que pueden degradar un sustrato celulósico. El caldo de fermentación completo puede comprender cualquiera de los polipéptidos o cualquier combinación de los mismos.
- Preferiblemente, la composición enzimática es un caldo de fermentación completo en donde se eliminan las células. El caldo de fermentación completo puede contener ácidos orgánicos (utilizados para eliminar las células), células eliminadas y/o residuos celulares, y medio de cultivo.
- 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 se lleva a cabo en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno, y sales inorgánicas, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. En la técnica se conocen medios de cultivo adecuados, 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 cultivando los hongos filamentosos hasta la fase estacionaria y manteniendo los hongos filamentosos en condiciones de limitación de carbono durante un período de tiempo suficiente para expresar una o más celulasas y/o hemicelulasas y/o pectinasas. Una vez que las enzimas, tales como las celulasas y/o las hemicelulasas y/o pectinasas, son secretadas por los hongos filamentosos en el medio de fermentación, se puede utilizar el caldo de fermentación completo. El caldo de fermentación completo de la presente invención puede comprender hongos filamentosos. En algunas realizaciones, todo el caldo de fermentación comprende el contenido no fraccionado de los materiales de fermentación derivados al final de la fermentación. Típicamente, el caldo de fermentación completo comprende el medio de cultivo usado y los residuos celulares presentes después de que los hongos filamentosos crecen hasta la saturación, incubados bajo condiciones de limitación de carbono para permitir la síntesis de proteínas (particularmente, la expresión de celulasas y/o hemicelulasas y/o pectinasas). En algunas realizaciones, todo el caldo de fermentación comprende el medio de cultivo celular usado, enzimas extracelulares y hongos filamentosos. En algunas realizaciones, los hongos filamentosos presentes en todo el caldo de fermentación pueden ser lisados, permeabilizados o eliminados utilizando métodos conocidos en la técnica para producir un caldo de fermentación completo eliminado por células. En una realización, todo el caldo de fermentación es un caldo de fermentación completo eliminado por células, en donde el caldo de fermentación completo que contiene las células de hongos filamentosos se lisa o se elimina. En algunas realizaciones, las células se eliminan lisando los hongos filamentosos por medio de un tratamiento químico y/o de pH para generar el caldo completo eliminado por células de una fermentación de los hongos filamentosos. En algunas realizaciones, las células se eliminan lisando los hongos filamentosos mediante un tratamiento químico y/o de pH y ajustando el pH de la mezcla de fermentación eliminada por células a un pH adecuado. En una realización, el caldo de fermentación completo comprende un primer componente de ácido orgánico que comprende al menos un ácido orgánico de carbono 1-5 y/o una sal del mismo, y un segundo componente de ácido orgánico que comprende al menos un ácido orgánico de carbono 6 o más y/o una sal del mismo. En una realización, el primer componente de ácido orgánico es ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, una sal de los mismos, o cualquier combinación de los mismos, y el segundo componente de ácido orgánico es ácido benzoico, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido 4-metilvalérico, ácido fenilacético, una sal de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.
- El término "caldo de fermentación completo" como se utiliza en la presente se refiere a una preparación producida por fermentación celular que se somete a ninguna o mínima recuperación y/o purificación. Por ejemplo, los caldos de fermentación completos se producen cuando los cultivos microbianos se saturan, se incuban bajo condiciones de limitación 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. Por lo general, el caldo de fermentación completo no está fraccionado y comprende un medio de cultivo celular usado, enzimas extracelulares y células microbianas, preferiblemente no viables.
- Si es necesario, se puede fraccionar el caldo de fermentación completo y se puede utilizar uno o más de los contenidos fraccionados. Por ejemplo, las células eliminadas y/o los desechos celulares pueden ser retirados de un caldo de fermentación completo para proporcionar una composición que esté libre de estos componentes.
- El caldo de fermentación completo puede comprender 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 eliminadas, residuos celulares, componentes de medios de cultivo y/o enzimas insolubles. En algunas realizaciones, los componentes insolubles se pueden eliminar para proporcionar un caldo de fermentación completo clarificado.
- En una realización, todo el caldo de fermentación puede complementarse con una o más actividades enzimáticas que no se expresan endógenamente, o son expresadas a un nivel relativamente bajo por los hongos filamentosos, para mejorar la degradación del sustrato celulósico, por ejemplo, a azúcares fermentables, tales como la glucosa o la xilosa. Las

enzimas suplementarias se pueden añadir como un suplemento al caldo de fermentación completo y las enzimas pueden ser un componente de un caldo de fermentación completo separado, o pueden ser purificadas, o mínimamente recuperadas y/o purificadas.

5 En una realización, el caldo de fermentación completo comprende un caldo de fermentación completo de una fermentación de un hongo filamentoso 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
10 fermentación completo de una fermentación de un hongo filamentoso no recombinante y un hongo filamentoso
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 filamentoso que sobreexpresa beta-glucosidasa. Alternativamente, el caldo de fermentación completo para uso en
los métodos actuales y las composiciones reactivas puede comprender una mezcla de un caldo de fermentación completo
de una fermentación de un hongo filamentoso no recombinante y un caldo de fermentación completo de una fermentación
de un hongo filamentoso recombinante que sobreexpresa una beta-glucosidasa.

15 En una realización, el proceso para la preparación de un producto de azúcar a partir de material lignocelulósico comprende
los siguientes pasos: (a) opcionalmente, pretratamiento del material lignocelulósico, (b) opcionalmente, lavado del material
lignocelulósico opcionalmente pretratado, (c) producir una composición enzimática que comprende al menos dos
celulasas y en la que la composición enzimática comprende al menos LPMO cultivando un hongo en condiciones que
20 permitan la expresión de la composición enzimática, (d) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente
lavado y/u opcionalmente pretratado utilizando la composición enzimática, y (e) opcionalmente, recuperación de una
composición que contiene glucosa, en donde las cantidades de productos de oxidación hidrolizados formados al final de
la hidrólisis enzimática mediante la oxidación por LPMO del material lignocelulósico que contiene celulosa y/o celo-
oligosacáridos se mantiene entre 3 y 10 g/kg de glucano presente en el material lignocelulósico añadiendo una cantidad
25 adecuada de oxígeno durante la hidrólisis enzimática al material lignocelulósico, el producto de oxidación hidrolizado
formado es ácido glucónico.

En una realización, el proceso para la preparación de un producto de fermentación a partir de material lignocelulósico
comprende los siguientes pasos: (a) opcionalmente, pretratamiento del material lignocelulósico, (b) opcionalmente, lavado
30 del material lignocelulósico opcionalmente pretratado, (c) producir una composición enzimática que comprende al menos
dos celulasas y en la que la composición enzimática comprende al menos LPMO cultivando un hongo en condiciones que
permitan la expresión de la composición enzimática, (d) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente
lavado y/u opcionalmente pretratado utilizando la composición enzimática, (e) fermentación del material lignocelulósico
hidrolizado para obtener un producto de fermentación, y (f) opcionalmente, recuperación de un producto de fermentación,
35 en donde las cantidades de productos de oxidación hidrolizados formados al final de la hidrólisis enzimática mediante
la oxidación por LPMO del material lignocelulósico que contiene celulosa y/o celo-oligosacáridos se mantiene entre 3 y 10
g/kg de glucano presente en el material lignocelulósico añadiendo una cantidad adecuada de oxígeno durante la hidrólisis
enzimática al material lignocelulósico, el producto de oxidación hidrolizado formado es ácido glucónico.

40 Como se indicó anteriormente, en una realización preferida el hongo es un hongo filamentoso, preferiblemente el hongo
pertenece al género *Rasamsonia* o *Aspergillus*. En una realización, el cultivo del hongo se lleva a cabo en condiciones
aeróbicas. Un experto en la técnica es consciente de los diseños de fermentadores para el cultivo aeróbico, tales como,
por ejemplo, tanques agitados y columnas de burbujas. Generalmente, los hongos se cultivan en un medio de cultivo
celular adecuado para la producción de la composición enzimática de interés. El cultivo se lleva a cabo en un medio
45 nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno, y sales inorgánicas, utilizando procedimientos
conocidos en la técnica. En la técnica se conocen medios de cultivo adecuados, rangos de temperatura y otras condiciones
adecuadas para el crecimiento y la producción de enzimas. Ejemplos de los mismos se describen en la presente. La
composición enzimática se puede preparar cultivando los hongos a la fase estacionaria y manteniendo los hongos bajo
condiciones de limitación de carbono durante un período de tiempo suficiente para expresar las enzimas. Una vez que las
50 enzimas de interés son secretadas por los hongos en el medio de fermentación, se puede utilizar la composición
enzimática. El paso de proceso de producir una composición enzimática que comprende al menos dos celulasas y en la
que la composición enzimática comprende al menos LPMO mediante el cultivo de un hongo en condiciones que permiten
la expresión de la composición enzimática como se describe en la presente puede ser precedido por un proceso de
propagación del hongo. La propagación puede comprender varios pasos en frascos de agitación, recipientes pequeños y
55 recipientes grandes.

Material lignocelulósico

60 El material lignocelulósico en la presente incluye cualquier material lignocelulósico y/o hemicelulósico. El material
lignocelulósico adecuado para su uso como materia prima en la invención incluye la biomasa, por ejemplo, biomasa virgen
y/o biomasa no virgen, tales como biomasa agrícola, productos orgánicos comerciales, desechos de construcción y
demolición, residuos sólidos municipales, residuos de papel y residuos de jardín. Las formas más comunes de biomasa
incluyen árboles, arbustos y hierbas, trigo, paja de trigo, caña de azúcar, paja de caña, bagazo de caña de azúcar, basura
de caña de azúcar, pasto aguja, miscanto, caña energética, maíz, rastrojo de maíz, cáscaras de maíz, mazorcas de maíz,
65 tallos de canola, tallos de soya, sorgo dulce, granos de maíz, incluyendo fibra de granos, productos y subproductos de la
molienda de granos, tales como maíz, trigo y cebada (incluyendo molienda húmeda y molienda en seco) a menudo

denominados "salvado o fibra", así como residuos sólidos municipales, residuos de papel y residuos de jardín. La biomasa también puede ser, pero no se limita a, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos forestales, residuos sólidos municipales, 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, matorrales, pasto aguja, árboles, verduras, cáscaras de frutas, vides, pulpa de remolacha azucarera, harinillas de trigo, cáscaras de avena, y maderas duras y suaves (sin incluir maderas con materiales nocivos). Además, la biomasa agrícola incluye los materiales de desecho orgánicos generados a partir de procesos agrícolas, incluyendo las actividades agrícolas y forestales, incluyendo específicamente los desechos forestales de madera. La biomasa agrícola puede ser cualquiera de las mencionadas singularmente, o cualquier combinación o mezcla de las mismas.

La celulosa es un compuesto orgánico con la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$, un polisacárido que consiste en una cadena lineal de varios cientos a más de diez mil unidades de D-glucosa con enlace $\beta(1\rightarrow4)$. Una molécula de glucano es un polisacárido de monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glicosídicos. En la presente, el glucano y la celulosa se utilizan indistintamente para un polisacárido de monómeros de D-glucosa unidos por uniones glicosídicas. Los métodos para el análisis cuantitativo de las composiciones de glucano o polisacárido son bien conocidos y descritos en la técnica, y se resumen, por ejemplo, en Carvalho de Souza et al., Carbohydrate Polymers 95 (2013) 657-663. En general, entre 50 y 70 % del glucano es celulosa cristalina, el resto es celulosa amorfa.

Pretratamiento

El material lignocelulósico utilizado en la presente invención puede ser lavado y/o pretratado. Opcionalmente, la materia prima puede ser pretratada con modificación térmica, mecánica y/o química, o cualquier combinación de tales métodos, con el fin de mejorar la accesibilidad del sustrato a la hidrólisis enzimática y/o hidrolizar la hemicelulosa y/o solubilizar la hemicelulosa y/o celulosa y/o lignina, de cualquier forma conocida en la técnica. En una realización, el pretratamiento se lleva a cabo tratando la lignocelulosa con explosión de vapor, tratamiento de agua caliente o tratamiento con ácido diluido o base diluida.

En una realización, el material lignocelulósico se pretrata antes y/o durante la hidrólisis enzimática. Los métodos de pretratamiento son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, calor, mecánica, modificación química, modificación biológica y cualquier combinación de los mismos. El pretratamiento se realiza típicamente para mejorar la accesibilidad del material lignocelulósico a la hidrólisis enzimática y/o hidrolizar la hemicelulosa y/o solubilizar la hemicelulosa y/o celulosa y/o lignina, en el material lignocelulósico. En una realización, el pretratamiento comprende el tratamiento del material lignocelulósico con explosión de vapor, tratamiento de agua caliente o tratamiento con ácido diluido o base diluida. Ejemplos de métodos de pretratamiento incluyen, pero no se limitan a, tratamiento con vapor (por ejemplo, tratamiento a 100-260 °C, a una presión de 700-4500 kPa (7-45 bares), a pH neutro, durante 1-10 minutos), tratamiento ácido diluido (por ejemplo, tratamiento con 0,1 - 5 % de H_2SO_4 y/o SO_2 y/o HNO_3 y/o HCl, en presencia o ausencia de vapor, a 120-200 °C, a una presión de 200-1500 kPa (2-15 bares), a pH ácido, durante 2-30 minutos), tratamiento organodisolvente (por ejemplo, tratamiento con 1 - 1,5 % de H_2SO_4 en presencia de disolvente orgánico y vapor, a 160-200 °C, a una presión de 700-3000 kPa (7-30 bares), a pH ácido, durante 30-60 minutos), tratamiento con cal (por ejemplo, tratamiento con 0,1 - 2 % $NaOH/Ca(OH)_2$ en presencia de agua/vapor a 60-160 °C, a una presión de 100-1000 kPa (1-10 bares), a pH alcalino, durante 60-4800 minutos), tratamiento ARP (por ejemplo, tratamiento con 5 - 15 % NH_3 , a 150-180 °C, a una presión de 900-1700 kPa (9-17 bares), a pH alcalino, durante 10-90 minutos), tratamiento AFEX (por ejemplo, tratamiento con > 15 % de NH_3 , a 60-140 °C, a una presión de 800-2000 kPa (8-20 bares), a pH alcalino, durante 5-30 minutos).

Paso de lavado

Opcionalmente, el proceso de acuerdo con la invención comprende un paso de lavado. El paso de lavado opcional se puede utilizar para eliminar los compuestos solubles en agua que pueden actuar como inhibidores para el paso de fermentación. El paso de lavado puede llevarse a cabo de manera conocida.

El material lignocelulósico puede lavarse. En una realización, el material lignocelulósico puede lavarse después del pretratamiento. El paso de lavado se puede utilizar para eliminar los compuestos solubles en agua que pueden actuar como inhibidores para el paso de fermentación y/o hidrólisis. El paso de lavado puede llevarse a cabo de manera conocida por un experto. Junto al lavado, existen otros métodos de desintoxicación. El material lignocelulósico pretratado también puede ser desintoxicado por cualquiera (o cualquier combinación) de estos métodos que incluyen, pero no se limitan a, separación sólido/líquido, evaporación al vacío, extracción, adsorción, neutralización, sobrelimado, adición de agentes reductores, adición de enzimas desintoxicantes, tales como lacasas o peroxidasas, adición de microorganismos capaces de desintoxicar hidrolizados.

Hidrólisis enzimática

La composición enzimática utilizada en el proceso de la invención puede hidrolizar de manera extremadamente eficaz el material lignocelulolítico, por ejemplo, rastrojo de maíz, paja de trigo, paja de caña y/o bagazo de caña de azúcar, que luego se puede convertir en un producto útil, tal como etanol, biogás, butanol, ácido láctico, un plástico, un ácido orgánico,

un disolvente, un suplemento de alimentación animal, 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 intermedio en la producción de biogás, pueden utilizarse como bloque de construcción para otros materiales. La presente invención se ejemplifica con la producción de etanol, pero esto se hace sólo como ejemplificación en lugar de como limitación, los otros productos útiles mencionados se pueden producir igualmente bien.

El proceso según la invención comprende un paso de hidrólisis enzimática. La hidrólisis enzimática incluye, pero no se limita a, la hidrólisis con fines de licuefacción de la materia prima y la hidrólisis con fines de liberación de azúcar de la materia prima, o ambos. En este paso, el material lignocelulósico opcionalmente pretratado y opcionalmente lavado se pone en contacto con la composición enzimática de acuerdo con la invención. Dependiendo del material lignocelulósico y del pretratamiento, las diferentes condiciones de reacción, por ejemplo, temperatura, dosificación enzimática, tiempo de reacción de hidrólisis y concentración de materia seca, pueden ser adaptados por un experto para lograr una conversión deseada de lignocelulosa en azúcar. A continuación, se dan algunas indicaciones.

En una realización, la hidrólisis enzimática comprende al menos un paso de licuefacción en donde el material lignocelulósico se hidroliza en al menos un primer recipiente, y un paso de sacarificación en donde el material lignocelulósico licuado se hidroliza en al menos el primer recipiente y/o en al menos un segundo recipiente. La sacarificación se puede hacer en el mismo recipiente que la licuefacción (es decir, al menos el primer recipiente), también se puede hacer en un recipiente separado (es decir, al menos el segundo recipiente). Así, en la hidrólisis enzimática de los procesos según la presente invención se puede combinar la licuefacción y sacarificación. Alternativamente, la licuefacción y la sacarificación pueden ser pasos separados. La licuefacción y la sacarificación se pueden realizar a diferentes temperaturas, pero también se pueden realizar a una sola temperatura. En una realización, la temperatura de la licuefacción es más alta que la temperatura de la sacarificación. La licuefacción se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura de 60 - 75 °C y la sacarificación se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura de 50 - 65 °C.

Las enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática pueden añadirse antes y/o durante la hidrólisis enzimática. En caso de que la hidrólisis enzimática comprenda un paso de licuefacción y un paso de sacarificación, se pueden añadir enzimas adicionales durante y/o después del paso de licuefacción. Las enzimas adicionales pueden añadirse antes y/o durante el paso de sacarificación. También se pueden añadir enzimas adicionales después del paso de sacarificación.

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

La viscosidad del material lignocelulósico en uno o más recipientes utilizados para la hidrólisis enzimática se mantiene entre 10 y 4000 mPa·s (10 y 4000 cP), entre 10 y 2000 mPa·s (10 y 2000 cP), preferiblemente entre 10 y 1000 mPa·s (10 y 1000 cP).

En caso de que el proceso comprenda una hidrólisis enzimática que comprenda un paso de licuefacción y un paso de sacarificación, la viscosidad del material lignocelulósico en el paso de licuefacción se mantiene entre 10 y 4000 mPa·s (10 y 4000 cP), entre 10 y 2000 mPa·s (10 y 2000 cP), preferiblemente entre 10 y 1000 mPa·s (10 y 1000 cP) y/o la viscosidad del material lignocelulósico en el paso de sacarificación se mantiene entre 10 y 1000 mPa·s (10 y 1000 cP), entre 10 y 900 mPa·s (10 y 900 cP), preferiblemente entre 10 y 800 mPa·s (10 y 800 cP).

La viscosidad se puede determinar con un reómetro Brookfield DV III a la temperatura utilizada para la hidrólisis.

En otro aspecto de la invención, la cantidad de composición enzimática añadida (en la presente también denominada dosificación enzimática o carga enzimática) es baja. En una realización, la cantidad de enzima es de 6 mg de proteína / g de peso de materia seca o inferior, 5 mg de proteína / g de materia seca o inferior, 4 mg de proteína / g de materia seca o inferior, 3 mg de proteína / g de materia seca o inferior, 2 mg de proteína / g de materia seca o inferior, o 1 mg de proteína / g de materia seca o inferior (expresado como proteína en mg de proteína / g de materia seca). En una realización, la cantidad de enzima es 0,5 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,4 mg de composición enzimática / g de peso de materia seca o inferior, 0,3 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,25 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,20 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,18 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior, 0,15 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior o 0,10 mg de enzima / g de peso de materia seca o inferior (expresado como total de enzimas de celulasa en mg de enzima / g de materia seca). La dosificación enzimática baja es posible, ya que debido a la actividad y estabilidad de las enzimas, es posible aumentar el tiempo de reacción de hidrólisis.

En otro aspecto de la invención, el tiempo de reacción de hidrólisis es de 5 horas o más, 10 horas o más, 20 horas o más, 40 horas o más, 50 horas o más, 60 horas o más, 70 horas o más, 80 horas o más, 90 horas o más, 100 horas o más, 120 horas o más, 130 horas o más. En otro aspecto, el tiempo de reacción de hidrólisis es de 5 a 150 horas, 80 a 130 horas, 100 a 120 horas, 60 a 120 horas, 60 a 110 horas, 60 a 100 horas, 70 a 100 horas, 70 a 90 horas o 70 a 80 horas.

Debido a la estabilidad de la composición enzimática, los tiempos de reacción de hidrólisis más largos son posibles con los correspondientes rendimientos de azúcar más altos.

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

En otro aspecto de la invención, la fase de hidrólisis se lleva a cabo hasta que se libera 70 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 92 % o más, 95 % o más del azúcar disponible en el material lignocelulósico.

Significativamente, un proceso de la invención puede llevarse a cabo utilizando altos niveles de materia seca (del material lignocelulósico) en la reacción de hidrólisis. Por lo tanto, la invención puede llevarse a cabo con un contenido de materia seca de aproximadamente 5 % en peso o superior, aproximadamente 8 % en peso o superior, aproximadamente 10 % en peso o superior, aproximadamente 11 % en peso o superior, aproximadamente 12 % en peso o superior, aproximadamente 13 % en peso o superior, aproximadamente 14 % en peso o superior, aproximadamente 15 % en peso o superior, aproximadamente 20 % en peso o superior, aproximadamente 25 % en peso o superior, aproximadamente 30 % en peso o superior, aproximadamente 35 % en peso o superior, o aproximadamente 40 % en peso o superior. En una realización adicional, el contenido de materia seca en el paso de hidrólisis es 14 % en peso, 15 % en peso, 16 % en peso, 17 % en peso, 18 % en peso, 19 % en peso, 20 % en peso, 21 % en peso, 22 % en peso, 23 % en peso, 24 % en peso, 25 % en peso, 26 % en peso, 27 % en peso, 28 % en peso, 29 % en peso, 30 % en peso, 31 % en peso, 32 % en peso, 33 % en peso o más, o 14 a 33 % en peso.

En otra realización, el contenido de materia seca al final de la hidrólisis es de 5 % en peso o superior, 6 % en peso o superior, 7 % en peso o superior, 8 % en peso o superior, 9 % en peso o superior, 10 % en peso o superior, 11 % en peso o superior, 12 % en peso o superior, 13 % en peso o superior, 14 % en peso o superior, 15 % en peso o superior, 16 % en peso o superior, 17 % en peso o superior, 18 % en peso o superior, 19 % en peso o superior, 20 % en peso o superior, 21 % en peso o superior, 22 % en peso o superior, 23 % en peso o superior, 24 % en peso o superior, 25 % en peso o superior, 26 % en peso o superior, 27 % en peso o superior, 28 % en peso o superior, 29 % en peso o superior, 30 % en peso o superior, 31 % en peso o superior, 32 % en peso o superior, 33 % en peso o superior, 34 % en peso o superior, 35 % en peso o superior, 36 % en peso o superior, 37 % en peso o superior, 38 % en peso o superior o 39 % en peso o superior. En otra realización, el contenido de materia seca al final de la hidrólisis enzimática está entre 5 % en peso - 40 % en peso, 6 % en peso - 40 % en peso, 7 % en peso - 40 % en peso, 8 % en peso - 40 % en peso, 9 % en peso - 40 % en peso, 10 % en peso - 40 % en peso, 11 % en peso - 40 % en peso, 12 % en peso - 40 % en peso, 13 % en peso - 40 % en peso, 14 % en peso - 40 % en peso, 15 % en peso - 40 % en peso, 16 % en peso - 40 % en peso, 17 % en peso - 40 % en peso, 18 % en peso - 40 % en peso, 19 % en peso - 40 % en peso, 20 % en peso - 40 % en peso, 21 % en peso - 40 % en peso, 22 % en peso - 40 % en peso, 23 % en peso - 40 % en peso, 24 % en peso - 40 % en peso, 25 % en peso - 40 % en peso, 26 % en peso - 40 % en peso, 27 % en peso - 40 % en peso, 28 % en peso - 40 % en peso, 29 % en peso - 40 % en peso, 30 % en peso - 40 % en peso, 31 % en peso - 40 % en peso, 32 % en peso - 40 % en peso, 33 % en peso - 40 % en peso, 34 % en peso - 40 % en peso, 35 % en peso - 40 % en peso, 36 % en peso - 40 % en peso, 37 % en peso - 40 % en peso, 38 % en peso - 40 % en peso, 39 % en peso - 40 % en peso.

Fermentación

El proceso de acuerdo con la invención puede comprender un paso de fermentación. La fermentación se puede hacer simultáneamente con la hidrólisis en un reactor (SSF). Preferiblemente la fermentación se realiza después de la hidrólisis y se pueden seleccionar condiciones óptimas tanto para la hidrólisis como para la fermentación, que pueden ser diferentes para la hidrólisis y la fermentación. En otro aspecto, la invención incluye, por lo tanto, procesos de fermentación escalonada en los que se utiliza un microorganismo para la fermentación de una fuente de carbono que comprende azúcar(es), por ejemplo, glucosa, L-arabinosa y/o xilosa. La fuente de carbono puede incluir cualquier carbohidrato oligo- o polímero que comprenda L-arabinosa, xilosa o unidades de glucosa, como por ejemplo lignocelulosa, xilanos, celulosa, almidón, arabinano y similares. Para la liberación de unidades de xilosa o glucosa de dichos carbohidratos, se pueden añadir carbohidratos apropiados (tales como xilanasas, glucanasas, amilasas y similares) al medio de fermentación o pueden ser producidos por la célula hospedera modificada. En este último caso, la célula hospedera modificada puede ser modificada por ingeniería genética para producir y excretar tales carbohidratos. Una ventaja adicional del uso de fuentes oligo- o poliméricas de glucosa es que permite mantener una concentración baja de glucosa libre durante la fermentación, por ejemplo, mediante el uso de cantidades limitativas de la velocidad de las carbohidrasas. Esto, a su vez, evitará la represión de los sistemas necesarios para el metabolismo y el transporte de azúcares no glucémicos, tal como la xilosa. En un proceso preferido la célula hospedera modificada fermenta tanto la L-arabinosa (opcionalmente xilosa) como la glucosa, preferiblemente simultáneamente, en cuyo caso se utiliza preferiblemente una célula hospedera modificada que es 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 requerido para el crecimiento de la célula hospedera modificada. Las composiciones de medios de fermentación para el crecimiento de microorganismos, tales como levaduras u hongos filamentosos, son bien conocidos en la técnica.

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

El proceso de fermentación puede ser un proceso de fermentación aeróbico o anaeróbico. Un proceso de fermentación anaeróbica se define en la presente como un proceso de fermentación que se ejecuta en ausencia de oxígeno o en el que no se consume sustancialmente oxígeno, preferiblemente menos de 5, 2,5 o 1 mmol/L/h, preferiblemente se consume 0 mmol/L/h (es decir, el consumo de oxígeno no es detectable), y en donde las moléculas orgánicas sirven como donante de electrones y aceptores de electrones. En ausencia de oxígeno, el NADH producido en la glicólisis y la formación de biomasa, no puede ser oxidado por fosforilación oxidativa. Para resolver este problema, muchos microorganismos utilizan piruvato o uno de sus derivados como un aceptor de electrones e hidrógeno regenerando así NAD⁺. Por lo tanto, en un proceso de fermentación anaeróbica preferido, el piruvato se utiliza como un electrón (y aceptor de hidrógeno) y se reduce a productos de fermentación, tales como etanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico, un aminoácido, 1, 3-propano-diol, etileno, glicerol, butanol, antibióticos β -lactámicos y 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. Además, se espera que los procesos anaeróbicos proporcionen un rendimiento de producto más alto que los procesos aeróbicos. En condiciones aeróbicas, el rendimiento de biomasa suele ser mayor que en condiciones anaeróbicas. Como consecuencia, generalmente en condiciones aeróbicas, el rendimiento esperado del producto es menor que en condiciones anaeróbicas.

En otra realización, el proceso de fermentación está bajo condiciones de oxígeno limitado. Más preferiblemente, el proceso de fermentación es aeróbico y bajo condiciones de oxígeno limitado. Un proceso de fermentación de 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 de entrada, así como las propiedades reales de mezcla/transferencia de masa del equipo de fermentación utilizado. Preferiblemente, en un proceso bajo condiciones de oxígeno limitado, la tasa de consumo de oxígeno es de al menos 5,5, más preferiblemente de al menos 6 e incluso más preferiblemente de al menos 7 mmol/L/h.

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

En una realización de la invención, en un paso la fermentación se lleva a cabo con un microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar C5. En una realización, el proceso es un proceso para la producción de etanol por el cual el proceso comprende el paso que comprende la fermentación de un medio que contiene azúcar(es) con un microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar C5, por lo que la célula hospedadora es capaz de fermentar glucosa, L-arabinosa y xilosa a etanol. El microorganismo puede ser un organismo procariota o eucariota. El microorganismo utilizado en el proceso puede ser un microorganismo modificado por ingeniería genética. Los ejemplos de organismos adecuados son las 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 del mismo, el microorganismo que es 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*, en la que se han realizado modificaciones genéticas. Un ejemplo de este microorganismo y su preparación se describe con más detalle en WO 2008/041840 y en la solicitud de patente europea EP10160622,6, presentada el 21 de abril de 2010. En una realización, el proceso de fermentación para la producción de etanol es anaeróbico. El término anaeróbico ya se ha definido anteriormente en la presente. En otra realización preferida, el proceso de fermentación para la producción de etanol es aeróbico. En otra realización preferida, el proceso de fermentación para la producción de etanol es bajo condiciones de oxígeno limitado, más preferiblemente aeróbico y bajo condiciones de oxígeno limitado. Las condiciones de de oxígeno limitado ya se han definido anteriormente en la presente.

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

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

- los procesos anaeróbicos son posibles;
- también son posibles condiciones de oxígeno limitado;
- se pueden obtener mayores rendimientos de etanol y tasas de producción de etanol;
- la cepa utilizada puede ser capaz de utilizar L-arabinosa y, opcionalmente, xilosa.

Alternativamente a los procesos de fermentación descritos anteriormente, se pueden utilizar al menos dos células distintas, esto significa que este proceso es un proceso de co-fermentación. Todas las realizaciones preferidas de los procesos de fermentación como se describe anteriormente son también realizaciones preferidas de este proceso de co-fermentación: identidad del producto de fermentación, identidad de la fuente de L-arabinosa y fuente de xilosa, condiciones de fermentación (condiciones aeróbicas o anaeróbicas, condiciones de oxígeno limitado, temperatura a la que se está llevando a cabo el proceso, productividad de etanol, rendimiento de etanol).

El proceso de fermentación puede llevarse a cabo sin necesidad de ajustar el pH durante el proceso. Es decir, el proceso es uno que puede llevarse a cabo sin la adición de ningún ácido o base. Sin embargo, esto excluye un paso de pretratamiento, en donde se puede añadir ácido. El punto es que la composición de la invención es capaz de actuar a un pH bajo y, por lo tanto, no hay necesidad de ajustar el pH de ácido de una materia prima pretratada con ácido para que pueda tener lugar la sacarificación o la hidrólisis. En consecuencia, un método de la invención puede ser un método de cero residuos utilizando únicamente productos orgánicos sin necesidad de insumos químicos inorgánicos.

Tiempo de reacción general

De acuerdo con la invención, el tiempo total de reacción (o el tiempo de reacción del paso de hidrólisis y el paso de fermentación juntos) puede reducirse. En una realización, el tiempo de reacción total es de 300 horas o menos, 200 horas o menos, 150 horas o menos, 140 horas o menos, 130 horas o menos, 120 horas o menos, 110 horas o menos, 100 horas o menos, 90 horas o menos, 80 horas o menos, 75 horas o menos, o aproximadamente 72 horas a 90 % de rendimiento de glucosa. En consecuencia, se pueden alcanzar tiempos generales más bajos con un rendimiento de glucosa más bajo.

Productos de fermentación

Los productos de fermentación que pueden producirse de acuerdo con la invención incluyen aminoácidos, vitaminas, productos farmacéuticos, suplementos de alimentación animal, productos químicos especializados, materias primas químicas, plásticos, disolventes, combustibles u otros polímeros orgánicos, ácido láctico y etanol, incluyendo el etanol combustible (se entiende que el término "etanol" incluye alcohol etílico o mezclas de alcohol etílico y agua).

Los productos específicos de valor añadido que pueden producirse mediante los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, biocombustibles (incluyendo biogás, etanol y butanol); ácido láctico; ácido 3-hidroxi-propiónico; ácido acrílico; ácido acético; 1,3-propano-diol; etileno; glicerol; un plástico; un producto químico especializado; un ácido orgánico, incluyendo ácido cítrico, ácido succínico y ácido maleico; un disolvente; un suplemento de alimentación animal; un producto farmacéutico, tal como un antibiótico β -lactámico o una cefalosporina; una vitamina; un aminoácido, tal como lisina, metionina, triptófano, treonina y ácido aspártico; una enzima, tal como una proteasa, una celulasa, una amilasa, una glucanasa, una lactasa, una lipasa, una liasa, una oxidoreductasa, una transferasa o una xilanas; una materia prima química; o un suplemento de alimentación animal.

Los productos de fermentación que pueden ser producidos por los procesos de la invención pueden ser cualquier sustancia derivada de la fermentación, que incluyen, pero no se limitan a, alcoholes (tal como arabinitol, butanol, etanol, glicerol, metanol, 1,3-propanediol, sorbitol, y xilitol); ácido orgánico (tal 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-hidroxi-propiónico, 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 (tal como ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina, serina, triptófano, y treonina); alcanos (tal como pentano, hexano, heptano, octano, nonano, decano, undecano, y dodecano), cicloalcanos (tal como ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano, y ciclooctano), alquenos (tal como penteno, hexeno, hepteno y octeno); y gases (tal como metano, hidrógeno (H_2), dióxido de carbono (CO_2) y monóxido de carbono (CO)). El producto de fermentación también puede ser una proteína, una vitamina, un producto farmacéutico, un suplemento de alimentación animal, un producto químico especializado, 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 oxidoreductasa, una transferasa o una xilanas.

Separación del producto de fermentación

El proceso según la invención comprende opcionalmente la recuperación del producto de fermentación. Un producto de fermentación puede separarse del caldo de fermentación de cualquier manera conocida. Para cada producto de fermentación, el experto podrá seleccionar una técnica de separación adecuada. Por ejemplo, el etanol puede separarse de un caldo de fermentación de levadura por destilación, por ejemplo, destilación al vapor/destilación al vacío de manera

convencional.

Algunas realizaciones de la invención se describirán a continuación con más detalle, pero no limitan en modo alguno el alcance de la invención presente, que está limitado por las reivindicaciones adjuntas.

Uso de enzimas termoestables en condiciones óptimas de temperatura

En una realización, la invención se refiere al uso de enzimas termoestables, tales como las enzimas celulolíticas de *Rasamsonia*, para la producción de azúcares reductores a partir de materias primas lignocelulósicas pretratadas en, pero sin limitarse a, la producción de etanol. Las enzimas celulolíticas de *Rasamsonia* aplicadas en materia prima lignocelulósica pretratada mostraron tasas máximas de conversión a temperatura dentro del rango de 50 a 70 °C. La enzima permanece activa en estas circunstancias durante 14 días o más sin el cese completo de la actividad.

Mediante el uso de condiciones de temperatura óptimas, la máxima cantidad de azúcares reductores puede ser liberada de la materia prima (hidrólisis total) en el menor tiempo posible de hidrólisis. De esta manera, la conversión del 100 % de celulosa en glucosa se logra en menos de 5 días.

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

Para butanol (MW 74 g/ mol) o iso-butanol, el rendimiento máximo teórico es de 1 mol de butanol por mol de glucosa. Así que Yps máx para (iso-)butanol $= 74/180 = 0,411$ g (iso-)butanol/g de glucosa.

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

Para otros productos de fermentación se puede realizar un cálculo similar.

La reducción de costos lograda con la aplicación de enzimas celulolíticas de *Rasamsonia* será el resultado de una reducción general del tiempo de proceso.

Compensación de una dosificación enzimática más baja con un tiempo de hidrólisis prolongado utilizando enzimas de Rasamsonia

Debido a la alta estabilidad de las enzimas estables, las actividades no cesan a tiempo, aunque se liberan menos azúcares reductores en el curso de la hidrólisis. Es posible reducir la dosificación enzimática y extender el uso de la enzima prolongando los tiempos de hidrólisis para obtener niveles similares de azúcares reductores liberados. Por ejemplo, 0,175 ml de enzima/g de materia seca de la materia prima liberaron aproximadamente el 90 % del máximo teórico de azúcares reductores de la materia prima pretratada en 72 horas. Si se utilizan 0,075 ml de enzima/g de materia seca de la materia prima, se alcanza aproximadamente el 90 % de conversión del máximo teórico en 120 h. Los resultados muestran que, debido a la estabilidad de la actividad enzimática, la disminución de la dosis de enzima puede compensarse ampliando el tiempo de hidrólisis para obtener la misma cantidad de azúcares reductores. Lo mismo se aplica a la hidrólisis de materia prima pretratada con un contenido de materia seca superior al 10 % muestra que el efecto compensador del tiempo prolongado de hidrólisis con materia prima seca del 15 %.

La reducción de costos lograda mediante el uso de enzimas celulolíticas estables, tales como las de *Rasamsonia*, es el resultado de requerir menos dosificación enzimática, lo que da como resultado rendimientos de conversión de hidrólisis similares.

Reducir el riesgo de contaminación con enzimas estables

En un proceso común para convertir material lignocelulósico en etanol, los pasos del proceso se realizan preferentemente en condiciones sépticas para reducir los costos operativos. Por lo tanto, la contaminación y el crecimiento de microorganismos contaminantes pueden ocurrir y dar lugar a efectos secundarios indeseables, tal como la producción de ácido láctico, ácido fórmico y ácido acético, pérdidas de rendimiento de etanol en el sustrato, producción de toxinas y polisacáridos extracelulares, que pueden afectar significativamente los costos de producción. Una temperatura de proceso alta y/o un tiempo de proceso corto limitarán el riesgo de contaminación durante la hidrólisis y la fermentación. Las enzimas termoestables, como las de *Rasamsonia*, son capaces de hidrolizar la materia prima lignocelulósica a temperaturas superiores a 60 °C. A estas temperaturas, el riesgo de que un microorganismo contaminante cause efectos secundarios no deseados será mínimo o casi cero.

Durante la fase de fermentación, en la que se produce etanol, las temperaturas suelen estar entre 30 y 37 °C y preferiblemente no se elevarán debido a las pérdidas de producción. Al aplicar tiempos de proceso de fermentación lo más cortos posible, los riesgos y efectos de la contaminación y/o el crecimiento de contaminantes se reducirán lo más

posible. Con enzimas estables, como las de *Rasamsonia*, se pueden aplicar tiempos de fermentación lo más cortos posibles (véase la descripción anterior), por lo que los riesgos de contaminación y/o crecimiento de contaminantes se reducirán lo más posible. La reducción de costos lograda con la aplicación de enzimas celulolíticas termoestables de *Rasamsonia* de esta manera será el resultado de un menor riesgo de fallas en el proceso debido a la contaminación.

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

El primer paso después del pretratamiento térmico será enfriar la materia prima pretratada a temperaturas en donde las enzimas estén activas de forma óptima. A gran escala, esto se hace típicamente añadiendo agua (enfriada), que, además de disminuir la temperatura, reducirá el contenido de materia seca. Mediante el uso de enzimas térmicamente estables, como las de *Rasamsonia*, se puede lograr una reducción de costos por el hecho de (i) se requiere menos enfriamiento de la materia prima pretratada, ya que se permiten temperaturas más altas durante la hidrólisis, y (ii) se añadirá menos agua, lo que aumentará el contenido de materia seca durante la hidrólisis y la fermentación y, por lo tanto, aumentará la capacidad de producción de etanol (cantidad producida por unidad de tiempo por volumen) de una planta de etanol. Además, mediante el uso de enzimas termoestables de acuerdo con la invención, como las de *Rasamsonia*, la reducción de costos también se puede lograr mediante el uso de agua de enfriamiento que tiene una temperatura más alta que el agua que se utiliza en un proceso con enzima no termoestable.

Reciclaje enzimático después de hidrólisis con enzimas estables

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

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

Por ejemplo, después de la hidrólisis de la materia prima pretratada con 0,175 mL/g de carga enzimática de materia seca durante 20 h, se libera el 50 % de la cantidad máxima teórica de azúcares reductores y después de la misma hidrólisis durante 72 h, se libera el 90 % de la cantidad máxima teórica de azúcares reductores. Por centrifugación y ultrafiltración, el 60-70 % de la actividad enzimática se recuperó en el retentado, mientras que el filtrado contenía más del 80 % de los azúcares reductores liberados. Al reutilizar el retentado, ya sea tal como está o después de una mayor purificación y/o concentración, la dosificación enzimática durante el siguiente paso de hidrólisis se puede reducir con un 60 a 70 %. La reducción de costos lograda mediante el uso de enzimas celulolíticas estables, tales como las de *Rasamsonia*, de esta manera es el resultado de requerir menos dosificación enzimática.

Reciclaje enzimático después de la hidrólisis en combinación con la producción enzimática y el reciclaje de células de levadura con enzimas estables

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

Reciclaje enzimático después de la destilación al vacío con enzimas estables

La estabilidad térmica de las enzimas, como las de *Rasamsonia*, provoca la actividad celulolítica restante después de la hidrólisis, fermentación y destilación al vacío en la vinaza fina. La actividad total de la enzima se reduce durante los tres pasos sucesivos del proceso. Por lo tanto, la vinza fina obtenida después de la destilación al vacío puede reutilizarse como fuente de enzima para un ciclo de proceso de hidrólisis, fermentación y destilación recién iniciado de conversión de paja de trigo pretratada en etanol. La vinza fina puede utilizarse en forma concentrada o (no)diluida y/o purificada, y con o sin suplementación enzimática adicional.

Reciclaje enzimático en combinación con la suplementación enzimática después de la destilación al vacío con enzimas termoestables

En un proceso óptimo, una cantidad de enzima se complementa en la vinza fina, antes de su reutilización en un nuevo ciclo de proceso, igual a la cantidad de actividad perdida durante los tres pasos sucesivos del proceso del ciclo de proceso anterior. De esta manera se evita la sobredosis de enzima y, por lo tanto, se obtiene el uso más eficiente de la enzima.

Además, al proporcionar una alta dosificación enzimática en el primer ciclo de proceso, además de complementar la

enzima igual a la cantidad de actividad perdida durante los tres pasos sucesivos del proceso en los siguientes ciclos de proceso, se pueden obtener las tasas de hidrólisis más altas posibles en cada ciclo de proceso, lo que da como resultado tiempos de hidrólisis cortos de menos de 48 horas en combinación con el uso más eficiente de enzimas.

5 *Uso de enzimas estables en sistemas mixtos*

Al aplicar la mezcla durante la hidrólisis, las enzimas entran más a menudo en contacto con los sustratos, lo que da como resultado un uso más eficiente de la actividad catalítica. Esto dará resultado en una menor dosificación enzimática y, por lo tanto, en menores costos, a menos que la mezcla tenga un efecto negativo en las enzimas. Las enzimas estables, como las enzimas termoestables de *Rasamsonia*, son robustas y pueden resistir circunstancias de alto cizallamiento (localmente) y altas temperaturas, como ocurre durante la mezcla intensiva de suspensiones acuosas. Por lo tanto, el uso de la misma en sistemas mixtos es beneficioso y conducirá a la dosificación y, por lo tanto, a la reducción de costos.

La invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos los cuales no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención.

Ejemplos

Información experimental

Cepas

Las cepas adecuadas de *Rasamsonia* que se pueden utilizar en los ejemplos actuales para mostrar el efecto y las ventajas de la invención son, por ejemplo, TEC-101, TEC-147, TEC-192, TEC-201 o TEC-210. Las cepas se describen en WO 2011/000949.

Preparación de sustrato de rastrojo de maíz pretratado con ácido

Se obtuvo el rastrojo de maíz pretratado con ácido diluido (aCS) según lo descrito en Schell, D.J., Applied Biochemistry and Biotechnology (2003), vol. 105-108, pp 69-85. Se utilizó un reactor de pretratamiento a escala piloto que funcionaba en condiciones de estado estacionario de 190 °C, tiempo de residencia de 1 min y una concentración efectiva de ácido H₂SO₄ de 1,45 % (p/p) en la fase líquida.

Ensayos de medición de proteínas

1. Proteína total

TCA Biuret

El método fue una combinación de precipitación de proteína utilizando ácido tricloro acético (TCA) para eliminar sustancias perturbadoras y permitir la determinación de la concentración de proteína con la reacción colorimétrica Biuret. En la reacción de Biuret, un ion de cobre (II) se reduce a cobre (I), que forma un complejo con los nitrógenos y carbonos de los enlaces peptídicos en una disolución alcalina. Un color violeta indica la presencia de proteínas. La intensidad del color, y, por lo tanto, la absorción a 546 nm, es directamente proporcional a la concentración de proteína, de acuerdo con la ley de Beer-Lambert. La estandarización se realizó con BSA (albúmina sérica bovina) y el contenido de proteína se expresó en g de proteína como equivalente de BSA/L o mg de proteína como equivalente de BSA/ml. El contenido de proteína se calculó utilizando protocolos de cálculo estándar conocidos en la técnica, trazando el DO₅₄₆ frente a la concentración de las muestras con concentración conocida, seguido del cálculo de la concentración de las muestras desconocidas utilizando la ecuación generada a partir de la recta de calibración.

2. Proteínas individuales usando PAGE

Pretratamiento de muestra SDS-PAGE

Con base en la concentración de proteína estimada de las muestras, se realizó la siguiente preparación de las muestras. A 10 µl de muestra se añadieron 40 µl de agua MilliQ y 50 µl de TCA (20 %) para diluir la muestra cinco veces (~ 1 mg/ml) y precipitar las proteínas. Después de 1 hora en hielo, la muestra fue centrifugada (10 minutos, 14000 rpm). El gránulo se lavó con 500 µl de acetón y se centrifugó (10 minutos, 14000 rpm). El gránulo se trató como se describe a continuación.

SDS-PAGE

El gránulo se disolvió en 65 µl del agua MilliQ, 25 µl de disolución amortiguadora de muestra (4x) NuPAGE™ LDS Invitrogen y 10 µl de agente reductor de muestras (10x) NuPAGE™ Invitrogen. Antes del paso de deanulación, la muestra se diluyó 5 veces utilizando una mezcla de MilliQ; disolución amortiguadora de muestra NuPAGE™ LDS y 10 µl de reductor de muestras NuPAGE™ en una proporción de 65:25:10. Después de la mezcla, las muestras se incubaron en un termo mezclador durante 10 minutos a 70 °C. Las disoluciones de la muestra se aplicaron sobre un gel BIS-Tris al 4-12 %

(NuPAGE™ BisTris, Invitrogen). También se aplicó una muestra (10 µl) del marcador M12 (Invitrogen) sobre el gel. El gel se ejecutó a 200 V durante 50 minutos, utilizando XCELL Surelock, con 600 ml de disolución amortiguadora de SDS diluida 20 x en la cámara de amortiguación exterior y 200 ml de disolución amortiguadora de SDS diluida 20 x, conteniendo 0,5 ml de antioxidante (NuPAGE™ Invitrogen) en la cámara de amortiguación interior. Después de la ejecución, el gel se enjuagó dos veces con agua desmineralizada, los geles se fijaron con una disolución de metanol al 50 %/ácido acético al 7 % durante una hora y se tiñeron con Sypro Ruby (50 ml por gel) durante la noche. Se realizó una imagen usando el Typhoon 9200 (610 BP 30, Green (532 nm), PMT 600V, 100 micras) después de lavar el gel con agua MilliQ.

Análisis cuantitativo de la proteína

Utilizando el escáner Typhoon, la relación entre las bandas de proteínas dentro de un carril se determinó utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. La muestra se aplicó en triplicado y los valores de gris se determinaron mediante el programa Image quant. Los valores se expresan como % relativo de proteína a la proteína total, calculados utilizando el valor de gris de la banda de proteína seleccionada en relación con el valor de gris total de todas las bandas de proteína.

Cálculo de conversión de glucano:

$$\% \text{ glucan conversion (\%)} = (\text{glucose (g/l)} \times 100 \%) / (\text{glucan (fraction on DM)} \times \text{dm (g/kg)} \times 1.1)$$

En donde:

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

Cálculo de ejemplo:

glucosa =	60 g/l
fracción de glucano =	0,40 (es el 40 % en materia seca)
dm =	200 g/kg
ejemplo de conversión de glucano =	$(60 \times 100) / (0,4 \times 200 \times 1,1) = \text{conversión del 68 \%}$

La corrección para la evaporación se hace si es necesario. La concentración en el sobrenadante se convierte posteriormente a la concentración por kg de hidrolizado.

Medición de ácido glucónico en hidrolizados de biomasa por UPLC-MS/MS

El ensayo se basa en la separación de ácido glucónico con una columna UPLC y la detección por medio de MS/MS (con base en la ionización electropulverizada negativa). Con el fin de excluir los errores causados por la supresión de iones, evaporación y efectos de inyección, se utiliza una etiqueta interna estándar, específicamente, ácido glucónico de $^{13}\text{C}_6$.

Productos químicos y compuestos de referencia

El agua utilizada para la preparación de la muestra y el análisis UPLC-MS/MS se filtró mediante un filtro Millipore de 0,22 µm. El acetonitrilo de grado HPLC se obtuvo de Merck (Ámsterdam, Países Bajos). El 0,1 % (v/v) de ácido fórmico en agua y el 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo se obtuvieron de Biosolve B.V. (Valkenswaard, Países Bajos). El compuesto de referencia de ácido glucónico se obtuvo de Sigma (Zwijndrecht, Países Bajos). El ácido glucónico con etiqueta isotópica ($^{13}\text{C}_6$, utilizado como estándar interno) fue fabricado por Buchem B.V. (Apeldoorn, Países Bajos).

Disolución normalizada interna

Se preparó una disolución madre pesando 10 mg de ácido glucónico de $^{13}\text{C}_6$ en un matraz volumétrico de 10 mL y disolviéndose en 10 mL de agua (~1 mg/mL). A partir de esta disolución madre, se preparó una disolución de trabajo pipeteando 100 µL de la disolución madre estándar interna y añadiendo 9,99 mL de agua (~10 µg/mL).

Disoluciones estándar

Se preparó una disolución madre de ácido glucónico pesando 5 mg de ácido glucónico y añadiendo 10 ml de agua. La disolución madre se diluyó más a fondo mediante el pipeteo de 20 µL de la disolución madre y la adición de 980 µL de agua (dilución 1, c~10 µg/mL). Se realizó una dilución adicional pipeteando 100 µL de dilución 1 y añadiendo 900 µL de agua (dilución 2, c~1 µg/mL). Se realizó una curva de calibración en viales de HPLC de acuerdo con la Tabla 1.

Preparación de muestras

Los hidrolizados de biomasa se descongelaron, de ser necesario, y se diluyeron diez veces con agua, diluyendo 150 µL de muestra en un vial de Eppendorf con 1350 µL de agua, seguido de centrifugación a 13000 rcf durante 15 minutos. El sobrenadante resultante se diluyó cincuenta veces con agua mediante el pipeteo de 20 µL de sobrenadante en un vial de HPLC, y la adición de 100 µL de disolución interna estándar de trabajo y 880 µL de agua.

UPLC-MS/MS

El ácido glucónico se analizó en un sistema Waters UPLC iClass compuesto por un gestor de disolventes binarios Waters iClass y un gestor de muestras Water iClass FTN conectados a un espectrómetro de masas Waters Xevo TQD (Waters, Milford, MA, EE. UU.). La separación cromatográfica se logró con una columna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150x2,1 mm, 1,8 µm) utilizando una elución gradiente con A) 0,1 % (v/v) de ácido fórmico en agua y B) 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo como fases móviles. El gradiente de 7 minutos comenzó con 1 minuto a 99 % de A seguido de una disminución lineal a 90 % de A en 2 minutos, luego se lavó con 20 % de A durante 2 minutos y re-equilibró con 99 % de A durante 2 minutos. La tasa de flujo se mantuvo a 0,35 mL/min, utilizando un volumen de inyección de 5 µl y la temperatura de la columna se fijó a 40 °C.

El espectrómetro de masas se operó en el modo de ionización negativa. La adquisición de datos y la integración de picos se realizaron con el software Masslynx 4,1 (Waters). La detección de ácido glucónico y ácido glucónico de ¹³C₆ se realizó en modo de monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Los ajustes generales fueron los siguientes: la tensión capilar ESI fue de 2,0 kV, la tensión del extractor de 3,0 V, la tensión del cono de 30 V. El flujo de gas desolvador (nitrógeno) fue de 800 L/h con la temperatura establecida a 350 °C, el flujo de gas del cono (nitrógeno) fue de 50 L/h y la temperatura de fuente fue de 150 °C. Se utilizaron los siguientes ajustes de MRM: ácido glucónico m/z 195,0 → 129,0, tiempo de permanencia 0,1 s, tensión de colisión 2 V; ¹³C₆-ácido glucónico m/z 201,0 → 134,0, tiempo de permanencia 0,08 s, tensión de colisión 2 V.

Cuantificación

La concentración de ácido glucónico en g/L se calculó mediante regresión lineal:

$$g/l \text{ de compuesto} = \frac{((\text{Área compuesto}/\text{Área estándar interno}) - \text{intercepto}) * 1000}{(\text{factor de dilución}) \cdot \text{pendiente de la línea de calibración} * 1000}$$

La cantidad calculada de ácido glucónico en g/l se puede convertir en ácido glucónico en g/kg glucano en el material lignocelulósico mediante el siguiente cálculo.

Cuando se utiliza el rastrojo de maíz pretratado ácido a una concentración de 20 % (p/p) dm, al final de la hidrólisis durante 120 horas, a pH 4,5 y 62 °C hay un volumen de gránulos de 6 % (debido a insoluble) y un volumen de sobrenadante de 94 %. El sobrenadante tiene una densidad de 1,07 kg/l y un porcentaje de glucano del 36 %. Por lo tanto, el rastrojo de maíz pretratado con ácido a una concentración de 20 % (p/p) dm tiene 72 g de glucano/kg de hidrolizado.

Comenzando con, por ejemplo, 0,5 g/l de ácido glucónico, esto da $0,5/1,07 = 0,47$ g de ácido glucónico/kg de sobrenadante (1,07 es la densidad de líquido). Esto corresponde con $0,47 \cdot 0,94 = 0,44$ g de ácido glucónico/kg de hidrolizado (el factor de gránulos es del 6 % debido a insoluble). Cuando se utiliza el rastrojo de maíz pretratado con ácido a una concentración de 20 % (p/p) dm, esto corresponde con $0,44/0,072 = 6,1$ g de ácido glucónico/kg de glucano.

Ejemplo 1*Uso de oxígeno durante la hidrólisis para controlar la cantidad de ácido glucónico formado*

La hidrólisis enzimática óptima del maíz pretratado con un 20 % de materia seca (que contiene 36 % de glucano sobre materia seca) a una temperatura del reactor de 60 °C y pH de 4,5 se obtiene manteniendo la concentración de ácido glucónico entre 0,7 y 1,5 g/l en el sobrenadante del hidrolizado mediante la adición de oxígeno. Esto corresponde a 9,7 - 20,8 g de ácido glucónico producido por kg de glucano durante la hidrólisis del glucano. La hidrólisis se realiza con 2,5 mg/g de materia seca de composición (o cóctel) enzimática de la celulasa TEC-210. TEC-210 se produce de acuerdo con los procedimientos de inoculación y fermentación descritos en WO 2011/000949.

Ejemplo 2*Uso de oxígeno durante la hidrólisis para controlar la cantidad de ácido glucónico formado*

La hidrólisis enzimática se realizó utilizando materia prima de maíz pretratada con ácido (aCS) a una concentración de 20 % (p/p) de materia seca (dm). La disolución de materia prima se preparó mediante la dilución de suspensiones acuosas concentradas de materia prima con agua. El pH se ajustó a pH 4,5 con una disolución de NH_4OH al 25 % (p/p). La hidrólisis enzimática se realizó a escala de 1 kg utilizando un reactor de 1,5 litros. El pH se controló a 4,5 y la temperatura se controló a 62 °C. El oxígeno disuelto durante el proceso se controló mediante el reciclaje de gas de espacio de cabeza y aire fresco adicional (conteniendo 20-21 % de oxígeno).

Antes de la adición de la enzima, el gas del espacio de cabeza se recalificó a un flujo de gas de 3 l/hora usando una bomba peristáltica y un rociador. Debido al hecho de que la materia prima consume oxígeno a través de una reacción química, el nivel de DO alcanzó un nivel de 0 % de DO dentro de una hora, lo que dio como resultado una materia prima anaeróbica y un espacio de cabeza que estaba completamente drenado de oxígeno. El gas inerte resultante del espacio de cabeza (libre de oxígeno) se utilizó a lo largo de toda la hidrólisis como gas de arrastre para el aire fresco introducido.

A continuación, se añadió el cóctel de la enzima celulasa TEC210 a la materia prima en una dosificación de 3,75 mg (proteína TCA)/g de dm. TEC-210 se produjo de acuerdo con los procedimientos de inoculación y fermentación descritos en WO 2011/000949. El tiempo total de hidrólisis fue de 120 horas.

Durante todo el proceso de hidrólisis se introdujo aire fresco en el circuito de reciclaje del gas inerte del espacio de cabeza a un flujo de aire fresco de 0 - 3 - 6 - 12 - 24 o 48 ml por kg de mezcla de reacción por hora, respectivamente, comenzando directamente después de la adición de la enzima. El DO se midió constantemente en todos los experimentos. Las muestras fueron extraídas al inicio y al final del experimento para el análisis de glucosa por HPLC.

Se realizó un experimento paralelo en un matraz de agitación para determinar el nivel máximo de hidrólisis de glucano. Esta hidrólisis máxima se determinó mediante la incubación de la materia prima a una dosificación enzimática muy alta (50 mg (proteína TCA)/g dm) en condiciones similares (pH, temperatura y dm) en un exceso de oxígeno que contenía aire de espacio de cabeza. La medición de DO en cada experimento mostró constantemente 0 % de DO. Esto puede explicarse por el consumo directo de oxígeno después de su transferencia desde la corriente de gas de reciclaje de oxígeno a la fase líquida en el reactor.

Los resultados se presentan en la Tabla 2. El aumento de la producción de glucosa se calcula restando la concentración de glucosa (en g/l) al inicio de la hidrólisis de la concentración de glucosa (en g/l) al final de la hidrólisis para cada condición (es decir, flujo de aire fresco (ml/kg/h) 0 - 3 - 6 - 12 - 24 - 48 - 96) y dividiendo los valores respectivos con el valor encontrado cuando el flujo de aire fresco (ml/kg/h) es 0 (este valor se estableció para que fuera 100 %).

Los datos demuestran claramente que se forman mayores cantidades de glucosa cuando la cantidad de ácido glucónico formado en el extremo de la hidrólisis se mantiene por encima de 3 g/kg de glucano en el material lignocelulósico.

Ejemplo 3*El efecto del ácido glucónico sobre la hidrólisis enzimática de la materia prima lignocelulósica*

Se incubaron 20 gramos de rastrojo de maíz pretratado en un tubo de prueba Greiner de 50 ml durante 50 horas a un nivel de materia seca de 6 % p/p, pH 4,5 a 62 °C en presencia de 5 mg de cóctel de la enzima celulasa TEC210 por gramo de materia seca y en presencia de 0, 2, 4, 6, o 8 g/l de ácido glucónico para determinar el efecto inhibitor del ácido glucónico sobre la hidrólisis del glucano en materia prima lignocelulósica. El experimento se realiza con la máxima saturación de oxígeno.

Las muestras se tomaron después de 50 horas de incubación y las muestras se centrifugaron para su posterior análisis en una centrifugadora Eppendorf tipo 5810 durante 8 minutos a 4000 rpm. La concentración de glucosa se midió en el sobrenadante de cada muestra por medio de HPLC utilizando una columna de Bio-Rad HPX87H. Los resultados se muestran en la Tabla 3. La liberación de glucosa como se presenta en la Tabla 3 es una medida directa para la hidrólisis enzimática (hidrólisis de glucano). Un nivel de ácido glucónico de 2 g/l en el sobrenadante corresponde a 89 g/kg de glucano en el material lignocelulósico. Esto se puede calcular como se ha descrito anteriormente con una densidad de 1,02 kg/l, un factor de gránulos de 2 % y un contenido de glucano de 21,6 g de glucano/kg de hidrolizado.

Los resultados indican claramente que las concentraciones más altas de ácido glucónico tienen un efecto negativo sobre la hidrólisis de glucano.

ES 2 972 390 T3

Tabla 1: Curva de calibración

Estándar	Concentración final (µg/mL)	µL de dilución de disolución estándar 1	µL de dilución de disolución estándar 2	µL de disolución de trabajo estándar interno	µL de agua
Est 1	~ 0,1		100	100	800
Est 2	~ 0,2		200	100	700
Est 3	~ 0,5	50		100	850
Est 4	~ 1	100		100	800
Est 5	~ 2	200		100	700
Est 6	~ 5	500		100	400

Tabla 2. El efecto de la adición de oxígeno en la hidrólisis enzimática de materia prima lignocelulósica.

Flujo de aire fresco (en ml/kg/h)	Cantidad de oxígeno (introducido a través del aire fresco en mmol/kg de glucano/hora)*	Ácido glucónico (en g/kg de glucano en material lignocelulósico)	Aumento de la producción de glucosa (en %)
0	0	2,96	-
3	0,36	3,33	12,5
6	0,72	3,82	34
12	1,43	3,82	31
24	2,86	4,93	28
48	5,71	6,40	41
96	11,42	8,99	53

* Oxígeno = 24,5 l/mol a 25 °C y el contenido de glucano es de 72 g/kg de hidrolizado

Tabla 3. El efecto del ácido glucónico sobre la hidrólisis enzimática.

Ácido glucónico añadido (en g/l)	Ácido glucónico (en g/kg de glucano en material lignocelulósico)	Liberación de glucosa (en %)
0	0	100
2	89	90
4	178	82
6	267	79
8	356	77

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de un producto de azúcar a partir de material lignocelulósico, que comprende los siguientes pasos:
 - (a) opcionalmente, pretratamiento del material lignocelulósico,
 - b) opcionalmente, lavado del material lignocelulósico opcionalmente pretratado,
 - c) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado utilizando una composición enzimática que comprende al menos dos celulasas y en la que la composición enzimática comprende al menos monooxigenasa lítica de polisacáridos (LPMO), en donde la cantidad de ácido glucónico formado al final de la hidrólisis enzimática por oxidación mediante LPMO del material lignocelulósico que contiene celulosa y/o celo-oligosacáridos se mantiene entre 3 y 10 g/kg de glucano presente en el material lignocelulósico añadiendo una cantidad adecuada de oxígeno durante el paso de hidrólisis enzimática (c) al material lignocelulósico, y
 - d) opcionalmente, recuperación de una composición que contiene glucosa.
2. Un proceso para la preparación de un producto de fermentación a partir de material lignocelulósico, que comprende los siguientes pasos:
 - (a) opcionalmente, pretratamiento del material lignocelulósico,
 - b) opcionalmente, lavado del material lignocelulósico opcionalmente pretratado,
 - c) hidrólisis enzimática del material lignocelulósico opcionalmente lavado y/u opcionalmente pretratado utilizando una composición enzimática que comprende al menos dos celulasas y en la que la composición enzimática comprende al menos LPMO, y opcionalmente purificación del material lignocelulósico hidrolizado,
 - d) fermentación del material lignocelulósico hidrolizado para producir un producto de fermentación, en donde la cantidad de ácido glucónico formado al final de la hidrólisis enzimática por oxidación mediante LPMO del material lignocelulósico que contiene celulosa y/o celo-oligosacáridos se mantiene entre 3 y 10 g/kg de glucano presente en el material lignocelulósico añadiendo una cantidad adecuada de oxígeno durante el paso de hidrólisis enzimática (c) al material lignocelulósico, y
 - e) opcionalmente, recuperación de un producto de fermentación.
3. El proceso de conformidad con la reivindicación 2, en donde la fermentación se lleva a cabo con un microorganismo que es capaz de fermentar al menos un azúcar C5.
4. El proceso de conformidad con la reivindicación 3, en donde el microorganismo es de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, en la que se han realizado modificaciones genéticas.
5. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el oxígeno se añade en forma de burbujas.
6. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el reactor para la hidrólisis enzimática tiene un volumen de 1 m³ o más.
7. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el tiempo de hidrólisis enzimática es de 5 a 150 horas.
8. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la composición enzimática utilizada retiene actividad durante 30 horas o más.
9. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la hidrólisis se lleva a cabo a una temperatura de 45 °C o más, preferiblemente 50 °C o más y aún más preferiblemente a una temperatura de 55 °C o más.
10. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la composición enzimática se deriva de un hongo, preferiblemente un microorganismo del género *Rasamsonia* o la composición enzimática comprende una enzima fúngica, preferiblemente una enzima *Rasamsonia*.
11. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el contenido de materia seca en el paso de hidrólisis (c) es 10 % en peso o más, preferiblemente es 14 % en peso o más, y más preferiblemente es 14 a 33 % en peso.
12. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la hidrólisis enzimática tiene lugar en un reactor de cultivo discontinuo, discontinuo alimentado y/o continuo.
13. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque la composición enzimática está en forma de un caldo de fermentación completo de un hongo.

14. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el oxígeno se introduce como un gas que contiene oxígeno, tal como el aire.