

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 926 521**

51 Int. Cl.:

C12P 7/10 (2006.01)

C12P 7/16 (2006.01)

C12P 7/6463 (2012.01)

C12N 9/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2010** **E 10196556 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2022** **EP 2468875**

54 Título: **Un proceso integrado para producir biocombustibles**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.10.2022

73 Titular/es:

NESTE OYJ (100.0%)
Keilaranta 21
02150 Espoo, FI

72 Inventor/es:

KOSKINEN, PERTTU y
TANNER, REIJO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 926 521 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

Un proceso integrado para producir biocombustibles

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un proceso integrado para producir biocombustibles a partir de materiales lignocelulósicos.

10 **Antecedentes de la invención**

La lignocelulosa es el biopolímero más abundante en la tierra. La lignocelulosa es el principal componente estructural de las plantas leñosas y no leñosas, como la hierba. La biomasa lignocelulósica se refiere a la biomasa vegetal compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina. Grandes cantidades de residuos lignocelulósicos se producen a través de silvicultura, industrias madereras y de pulpa y papel y prácticas agrícolas (paja, rastrojo, bagazo, paja) y muchas agroindustrias. También los residuos municipales contienen fracciones que pueden considerarse como residuos de lignocelulosa, tales como residuos de papel o cartón, residuos de jardinería o residuos de madera de la construcción. Debido a su gran abundancia y bajo precio, los residuos lignocelulósicos son los materiales preferidos para la producción de biocombustibles. De manera adicional, los cultivos energéticos leñosos o herbáceos dedicados con productividad de biomasa han ganado interés como uso de biocombustibles.

La producción de biocombustibles, especialmente etanol, a partir de materiales lignocelulósicos por fermentaciones microbianas se ha estudiado ampliamente. El mayor desafío para la utilización de lignocelulósicos para la producción microbiológica de biocombustibles o materias primas para biocombustibles radica en la complejidad del material lignocelulósico y en su resistencia a la biodegradación. En la lignocelulosa, las fibras de celulosa (20-50 % del peso seco de la planta) están incrustadas en una matriz de hemicelulosa encontrada covalentemente (20-40 %), pectina (2-20 %) y lignina (10-20 %) formando una estructura muy resistente a la biodegradación. Adicionalmente, los residuos de azúcar de la hemicelulosa contienen una mezcla variable de hexosas (por ejemplo, glucosa, manosa y galactosa) y pentosas (por ejemplo, arabinosa y xilosa) dependiendo de la biomasa.

El pretratamiento de material lignocelulósico con alto rendimiento a azúcares utilizables por microorganismos representa uno de los mayores desafíos. Se necesitan reducciones de costes significativas en los costes de las enzimas necesarias en la hidrólisis de polímeros de azúcar a monómeros de azúcar que son utilizables por los microorganismos deseados. Adicionalmente, la producción económicamente factible de biocombustibles a partir de materiales lignocelulósicos requiere una conversión eficiente de todos los principales constituyentes de carbohidratos de este material complejo en biocombustibles. La producción de etanol celulósico incluye dos desafíos principales: organismos productores de etanol tradicionales tales como la levadura de cerveza (*Saccharomyces*) o *Zymomonas mobilis* (bacteria) no pueden utilizar azúcares de pentosa que son fuentes de carbono y/o energía para la producción de etanol. Esto conduce a una utilización ineficiente de los azúcares totales de las lignocelulosas en etanol. Las cepas de levadura de cerveza de tipo salvaje (*Saccharomyces*) o *Zymomonas mobilis* no puede utilizar azúcares poliméricos en la lignocelulosa como fuentes de carbono y/o energía para la producción de etanol. Las enzimas para la hidrólisis de polímeros de azúcar a monómeros deben comprarse, pero los coste de las enzimas son actualmente demasiado altos. Se han desarrollado cepas de levadura de cerveza genéticamente modificada o *Zymomonas mobilis* capaces de utilizar xilosa, pero no se ha demostrado que sean lo suficientemente sólidas para operaciones a largo plazo a gran escala. Lo mismo se aplica a la levadura de cerveza genéticamente modificada con capacidad de utilización de celulosa. Sí existen bacterias productoras de etanol que utilizan pentosa u otras levaduras *Saccharomyces*, tales como *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis* y *Candida shehate*, sin embargo, su baja tolerancia al etanol, baja solidez y la alta sensibilidad a los inhibidores han impedido su utilización comercial.

La hidrólisis enzimática generalmente se realiza en una etapa separada del proceso de producción de biocombustible mediante enzimas comerciales compradas y producidas fuera del proceso de producción de biocombustible real.

Los hidrolizados de lignocelulosa también se han utilizado en la producción de aceites unicelulares. La hidrólisis de la lignocelulosa se ha llevado a cabo normalmente pretratando el material lignocelulósico a azúcares monoméricos antes de la alimentación al bioproceso.

La publicación de patente US2009217569 describe la producción de aceite unicelular a partir de varios hidrolizados lignocelulósicos y de otros materiales, tales como paja, madera, residuos de la industria de la pulpa y el papel, fibras recicladas, residuos municipales, biomasa de algas. Para la fabricación de biocombustibles comprende el tratamiento de la materia prima con agua, ácido o álcali y poner en contacto el filtrado o precipitado con el microorganismo productor de lípidos. La publicación de patente US2009064567 describe la producción de aceite unicelular a partir de hidrolizados de material de celulosa para la producción de biodiésel y biocombustible para aviones por *Stramenopiles*. El documento US20090011480 describe la producción de aceite unicelular por algas y hongos cultivados heterotróficamente a partir de materiales lignocelulósicos despolimerizados, tales como paja, madera, residuos de la molienda de pulpa, pasto varilla. El documento CN101148630 describe la producción de aceite unicelular a partir de hidrolizados de hemicelulosa de trigo, maíz o paja de arroz, obtenido por explosión de vapor, mediante bacterias u

hongos.

Adicionalmente, en la técnica anterior se ha descrito la producción de lípidos directamente a partir de azúcares poliméricos en lignocelulosa, tales como xilano de Fall *et al.* (1984), o celulosa de Lin *et al.* (2010). El documento US2010028484 describe la producción de aceite unicelular a partir de coproductos, tales como vinaza o DDGS, de la producción de etanol a base de materia prima de maíz.

El documento WO2010042842 describe la producción de aceite unicelular a partir de hidrolizados de lignocelulosa mediante cultivo mixto de microorganismos capaces de degradar azúcares poliméricos en lignocelulosa y al menos una especie de alga. El cultivo se desarrolla en cultivos aeróbicos y anaeróbicos sucesivos, donde los ácidos grasos se producen a partir de azúcares y de productos de fermentación anaeróbica. Sin embargo, el proceso conduce a una baja eficiencia de producción de aceite a partir de lignocelulosa ya que los productos de fermentación (alcoholes, etc.) se utilizan como fuentes de carbono en la producción de lípidos.

El documento WO2010006228 describe la producción secuencial de biocombustibles a partir de lignocelulosas. En la primera etapa, la fermentación anaeróbica con organismos capaces de producir alcoholes a partir de azúcares poliméricos en hidrolizados de lignocelulosa, en la segunda etapa, el medio de cultivo gastado, que posiblemente contenga al menos un producto de fermentación, se trata con algas para acumular aceites unicelulares.

Peng Xiao-Wei et al: "Microbial oil accumulation and cellulase secretion of the endophytic fungi from oleaginous plants", *Annals of microbiology*, Distam, Milán, IT, vol. 57, n.º 2, 1 de enero de 2007 (1-01-2007), páginas 239-242, describe un método para la producción de lípidos y enzimas celulasas a partir de paja de trigo y salvado de trigo en una fermentación en estado sólido. No describe la producción de alcoholes y el uso de enzimas producidas en el proceso de producción de lípidos en un proceso de producción de alcohol.

Lin Hui et al: "Direct microbial conversion of wheat straw into lipid by a cellulolytic fungus of *Aspergillus oryzae* A-4 in solid state fermentation", *Bioresource Technology*, Elsevier BV, Reino Unido, vol. 101, n.º 19, 1 de octubre de 2010 (01-10-2010), páginas 7556-7562, describe un método para la producción de lípidos y enzimas celulasas a partir de paja de trigo en una fermentación en estado sólido. No describe la producción de alcoholes y el uso de enzimas producidas en el proceso de producción de lípidos en un proceso de producción de alcohol.

El documento WO 2010/079067 describe un proceso integrado de coproducción de butanol y biodiésel, pero no sugiere el uso de enzimas producidas en la producción de lípidos en un proceso de producción de alcohol.

Sumario

Es un objetivo de la presente invención proporcionar una solución a los problemas encontrados en la técnica anterior. Específicamente, la presente invención tiene como objetivo proporcionar una solución técnicamente beneficiosa a los problemas encontrados en los procesos de producción de biocombustibles.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar una solución técnicamente beneficiosa a los problemas encontrados en la producción a gran escala de biocombustibles. En particular, es un objetivo de la invención proporcionar una solución a los problemas encontrados en la producción a gran escala de biocombustibles por procesos microbiológicos, tales como la fermentación de alcoholes o la fermentación aeróbica de aceite unicelular.

Es un tercer objetivo de la presente invención proporcionar una solución técnicamente beneficiosa a los problemas encontrados en la producción a gran escala de etanol u otros alcoholes, o mezclas de alcoholes.

Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar una solución, lo que permite mejorar la economía de la producción de biocombustibles.

Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar una solución, lo que permite reducir la carga ambiental.

La presente invención tiene como objetivo particular resolver problemas relacionados con la fabricación de biocombustibles para el transporte tales como alcoholes, biodiésel y/o diésel renovable, gasolina o queroseno.

Para lograr estos objetivos, la invención se caracteriza por las características que se incluyen en la reivindicación independiente. Otras reivindicaciones representan las realizaciones preferidas de la invención.

La presente invención se basa en el hallazgo de que algunos microorganismos productores de lípidos producen lípidos de manera eficiente a partir de azúcares poliméricos en material lignocelulósico directamente. Sorprendentemente, se ha encontrado que en un proceso de producción de aceite unicelular se produce una cantidad significativa de exoenzimas. Se descubrió además que estas exoenzimas permanecen activas y se pueden recolectar del medio de cultivo gastado. Es más, la invención se basa en el hallazgo de que algunos organismos producen exoenzimas que tienen actividad frente a diferentes polisacáridos. En realizaciones preferidas de la invención, la fracción de hemicelulosa de lignocelulosa que contiene azúcares poliméricos se utiliza para la producción de lípidos utilizando

organismos oleaginosos que son capaces de utilizar hemicelulosa polimérica mediante la producción de exoenzimas. Las enzimas recuperadas y/o enriquecidas del medio de cultivo gastado de la producción de lípidos a partir de hemicelulosa también tienen actividad de degradación de celulosa y pueden usarse para la hidrólisis de celulosa en otro proceso.

5 En un aspecto, la presente invención proporciona un proceso integrado, que comprende un primer proceso biotécnico, que produce lípidos a partir de una materia prima que comprende materiales lignocelulósicos y utiliza un hongo seleccionado de *Aspergillus* capaz de producir lípidos y enzimas, y un segundo proceso biotécnico utilizando un microorganismo, que produce alcohol(es) a partir de una materia prima que comprende materiales lignocelulósicos. El proceso comprende que se permite que el hongo produzca lípidos y enzimas. Opcionalmente, el sobrenadante y las células de microorganismos se separan del cultivo de hongos. Los lípidos se recuperan del cultivo de hongos y/o de células de microorganismos. El cultivo de hongos, el sobrenadante o una fracción del sobrenadante enriquecida con proteínas o una dilución del sobrenadante que comprende enzima(s) catalíticamente activa(s) se introduce en el segundo o en el primer y segundo proceso biotécnico, o se usa para tratar la materia prima del segundo o el primero y segundo proceso.

La presente invención ofrece las siguientes ventajas/soluciones

- 20 - Aprovechamiento más completo de materiales lignocelulósicos para la producción de biocombustibles.
- Utilización eficiente del flujo de hemicelulosa para la producción de biocombustibles. Los productores de etanol utilizados actualmente no pueden utilizar los azúcares de pentosa de manera eficiente.
- 25 - Producción de productos valiosos, adecuados para la producción de biocombustibles junto con la producción de enzimas.
- Ahorro de costes en los costes de enzimas. Producción de enzimas requeridas en el proceso *in situ* con etanol, aceite unicelular o butanol. Reduce la necesidad de tratamiento enzimático antes de su uso, tales como la estabilización.
- 30 - El bioproceso consolidado para la producción de lípidos (digestión enzimática y fermentación) reduce los costos al disminuir o eliminar la necesidad de enzimas producidas en una refinería separada.
- 35 - El flujo de enzimas (líquido de cultivo) necesita un procesamiento mínimo ya que es un proceso aeróbico/anaeróbico, reduce el riesgo de contaminación.

Es más, la producción de enzimas para la hidrólisis de celulosa y/o hemicelulosa *in situ* es ventajosa por varias razones y mejora la economía de la producción de biocombustibles:

- 40 - costes de procesamiento aguas abajo reducidos, incluida la estabilización de agua y enzimas,
- reducción de los costes de transporte y embalaje,
- disminución de las pérdidas a través de la transferencia directa de enzimas al segundo proceso de producción de biocombustibles,
- 45 - costes de capital reducidos frente a instalaciones dedicadas (remotas),
- la utilización de la misma materia prima o materia prima de la misma fuente para la producción de enzimas y la producción de biocombustibles en la inducción directa y adaptación de enzimas a la materia prima
- 50 - control directo del proceso y ajuste de la salida y oportunidades de mejora directamente dentro de la biorrefinería en la producción de enzimas y la producción de biocombustibles.

55 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1 a 6 Esquemas de proceso

60 Figura 7 Xilosa liberada en la prueba de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato se utilizaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

Figura 8 Xilosa liberada en la prueba de hidrólisis por proteína. Como sustrato se utilizaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

65 Figura 9 Glucosa liberada en pruebas de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato se utilizó 1 g de celulosa.

Figura 10 Glucosa liberada en la prueba de hidrólisis por proteína. Como sustrato se utilizó 1 g de celulosa.

5 Figura 11 Xilosa liberada en la prueba de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato se utilizaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

Figura 12 Xilosa liberada en la prueba de hidrólisis por proteína. Como sustrato se utilizaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

10 Figura 13 Glucosa liberada en pruebas de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato se utilizó 1 g de celulosa. Se liberó algo de xilosa de la hemicelulosa procedente del caldo de cultivo utilizado.

Figura 14 Glucosa liberada en la prueba de hidrólisis por proteína. Como sustrato se utilizó 1 g de celulosa. Se liberó algo de xilosa de la hemicelulosa procedente del caldo de cultivo utilizado.

15 Figura 15 Xilosa liberada en la prueba de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato se utilizaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

20 Figura 16 Xilosa liberada en la prueba de hidrólisis por proteína. Como sustrato se utilizaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

Figura 17 Glucosa liberada en pruebas de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato se utilizó 1 g de celulosa. Se liberó algo de xilosa de la hemicelulosa procedente del caldo de cultivo utilizado.

25 Figura 18 Glucosa liberada en la prueba de hidrólisis por proteína. Como sustrato se utilizó 1 g de celulosa. Se liberó algo de xilosa de la hemicelulosa procedente del caldo de cultivo utilizado.

Descripción detallada de la invención

30 Definiciones

"Un proceso de producción de aceite unicelular" se refiere en el presente documento a un proceso, que comprende las etapas de formar o permitir la formación de un microorganismo sintetizador de lípidos y permitir que la masa del organismo así obtenida produzca y/o almacene (acumule) lípidos, recuperar las células de la fase líquida y extraer o recuperar los lípidos de las células. En determinados casos, el aceite unicelular también puede ser extracelular, como excretado o liberado de las células en el medio de cultivo durante o después del cultivo.

Como se describe en el presente documento, la presente invención utiliza un hongo seleccionado de *Aspergillus* capaz de producir tanto lípidos como enzimas.

40 El término "lípidos" se refiere a una sustancia grasa, cuya molécula generalmente contiene, como una parte, una cadena de hidrocarburo alifática, que se disuelve en disolventes orgánicos no polares pero es poco soluble en agua. Los lípidos son un grupo esencial de moléculas grandes en células vivas. Los lípidos son, por ejemplo, grasas, aceites, ceras, ésteres de cera, esteroides, terpenoides, isoprenoides, carotenoides, polihidroxialcanoatos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, alcoholes grasos, aldehídos grasos, ésteres de ácidos grasos, fosfolípidos, glucolípidos, esfingolípidos y acilgliceroles, tales como triacilgliceroles, diacilgliceroles o monoacilgliceroles.

Los lípidos preferidos en la presente invención son grasas, aceites, ceras, acilgliceroles y ácidos grasos y sus derivados, en particular triacilgliceroles y ésteres de cera.

50 En relación con la presente invención, el aceite unicelular se usa como sinónimo de lípidos y grasas.

"Recuperación de lípidos" se refiere a un proceso, en el que el lípido (lípido intracelular) se recupera por métodos mecánicos, químicos, termomecánicos o autocatalíticos o por una combinación de estos métodos a partir de células de microorganismos.

"Masa celular residual" significa una fracción de material sólido, semisólido o fluido, que contiene microorganismos tratados para la recuperación de lípidos intracelulares

60 Por el término "alcohol" se entiende cualquier compuesto orgánico en el que una función hidroxilo (-OH) está unida a un átomo de carbono. "Alcohol" se refiere en el presente documento normalmente a un compuesto orgánico que contiene un grupo hidroxilo que es producido por microorganismos. Los alcoholes típicos producidos por microorganismos incluyen, aunque sin limitaciones, etanol, n-butanol, isobutanol, propanol y/o isopropanol. Los alcoholes se producen normalmente por fermentaciones anaeróbicas. Los alcoholes se pueden producir junto con aldehídos, tales como acetona o ácidos orgánicos, tales como ácido acético y/o ácido butírico, y productos gaseosos tales como CO₂ y/o H₂.

La expresión "proceso integrado" o "integración de procesos" significa una combinación de al menos dos operaciones unitarias que explotan las interacciones entre diferentes unidades para emplear los recursos de manera efectiva, mejorar la eficiencia energética, mejorar el equilibrio de los materiales, maximizar las ganancias y/o minimizar los costes. Al menos una de las dos operaciones unitarias en proceso integrado recibe materia y/o energía y puede depender de estas, de la operación de otra unidad. La integración de procesos considera las interacciones entre diferentes operaciones unitarias desde el principio, en lugar de optimizarlos por separado. La integración de procesos no se limita al diseño de nuevas plantas, sino que también cubre el diseño de reacondicionamiento (por ejemplo, nuevas unidades que se instalarán en una planta antigua) y la operación de los sistemas existentes. Preferentemente, las operaciones unitarias se sitúan *in situ*. Sin embargo, esto no es necesario y en algunas realizaciones de la invención las operaciones unitarias se sitúan por separado.

La producción de enzimas puede iniciarse y/o mantenerse añadiendo un inductor de enzimas al cultivo de microorganismos. En general, esto da como resultado una mayor cantidad de enzimas producidas. En particular, en cultivos continuos es importante mantener la cantidad de inductores en un nivel suficiente para mantener la producción de enzimas extracelulares.

"Un medio de cultivo" se refiere en el presente documento a un medio usado para cultivar microorganismos. El medio de cultivo comprende en el presente documento í normalmente azúcares poliméricos. El medio de cultivo puede complementarse con minerales, micronutrientes, macronutrientes, factores de crecimiento y agentes tampón.

La presente invención proporciona un proceso para mejorar la eficiencia y la economía de la producción de biocombustibles a partir de materiales lignocelulósicos. La invención proporciona también un proceso para disminuir la entrada de enzimas producidas externamente para la hidrólisis de polímeros de azúcar mediante la utilización de microorganismos que producen biocombustibles que poseen la capacidad de degradar azúcares poliméricos mediante exoenzimas. Adicionalmente, la invención proporciona un proceso para producir compuestos valiosos adecuados como biocombustibles o como materias primas para la producción de biocombustibles junto con la producción de enzimas. Las enzimas se usan, preferentemente, al menos parcialmente, *in situ* y/o se vende fuera del proceso integrado.

La presente invención se refiere a la utilización eficiente de material lignocelulósico para la producción de lípidos de biocombustibles. La invención prueba un proceso de producción de biocombustibles, tales como lípidos, etanol y butanol, a partir de fracciones de celulosa y/o hemicelulosa por procesos microbiológicos en un proceso integrado. Más específicamente, proporciona un proceso para la utilización de una fracción de hemicelulosa o celulosa como materia prima para la producción de lípidos por parte de microorganismos, que son capaces de utilizar azúcares poliméricos por exoenzimas.

En un aspecto, la presente invención proporciona un proceso para producir biocombustibles, tales como lípidos, etanol y/o butanol, a partir de materiales lignocelulósicos o fracciones de los mismos, tal como a partir de fracciones de celulosa y/o hemicelulosa, por procesos microbiológicos en un proceso integrado.

Adicionalmente, la invención mejora la eficiencia general de la utilización de carbohidratos mediante el uso de diferentes microorganismos en la producción de biocombustibles a partir de diferentes fracciones de lignocelulosa (por ejemplo, celulosa y hemicelulosas o fracciones de las mismas): Los organismos utilizados para la producción de biocombustibles a partir de celulosa y hemicelulosa están optimizados en cuanto a su eficiencia de aprovechamiento de azúcares y producción de biocombustibles a partir de dicha fracción.

En una realización de la invención, la presente invención proporciona un proceso para la utilización de fracciones de lignocelulosa, en particular fracciones de hemicelulosa y/o celulosa como materia prima para la producción de lípidos por microorganismos, que son capaces de utilizar azúcares poliméricos por exoenzimas.

Otra realización de la invención utiliza microorganismos productores de alcohol para la utilización de fracciones de lignocelulosa, en particular fracciones de hemicelulosa y/o celulosa como materias primas, que son capaces de utilizar azúcares poliméricos por exoenzimas. Las exoenzimas implicadas en la utilización de azúcares poliméricos se reutilizan en la producción de biocombustibles o en la producción de materias primas para biocombustibles en un primer o antes de un segundo proceso de producción de biocombustibles. Las exoenzimas poliméricas que degradan el azúcar producidas por microorganismos (por ejemplo, celulasas, hemicelulasas, glucosidasas, xilanasas, arabinasas, galactosidasas, mananasas) que producen biocombustibles (por ejemplo, lípidos, etanol, butanol, ABE = acetona-butanol-etanol) a partir de hemicelulosa y/o celulosa en el primer bioproceso (bioproceso 1) se puede reutilizar en la producción de biocombustibles o materias primas para biocombustibles (por ejemplo, etanol, butanol, ABE, lípido) a partir de celulosa y/o hemicelulosa.

En una realización específica de la invención, las enzimas se reciclan parcialmente en el primer proceso de producción de biocombustibles que utiliza organismos capaces de producir biocombustibles y enzimas.

En una realización de la invención el proceso incluye en cualquier caso, un proceso de producción de biocombustibles,

que es un proceso de producción de lípidos, utilizando polímero de azúcar a partir de material lignocelulósico (celulosa o hemicelulosa) y un hongo seleccionado de *Aspergillus*, que es un organismo productor de lípidos que tiene la capacidad de utilizar estos polímeros de azúcar. Otra realización de la invención utiliza microorganismos productores de alcohol para la utilización de fracciones de lignocelulosa, en particular fracciones de hemicelulosa y/o celulosa como

5 materias primas, que son capaces de utilizar azúcares poliméricos por exoenzimas. De manera adicional, las exoenzimas capaces de hidrolizar azúcares se reutilizan en otro bioproceso para la producción de biocombustibles. Las enzimas se pueden reutilizar, por ejemplo, para sacarificar azúcares poliméricos antes del segundo proceso de producción de biocombustible o en (durante) el segundo proceso de producción de biocombustible. El segundo proceso de producción de biocombustibles puede ser un proceso de producción de etanol, butanol o ABE.

10 Los procesos están integrados (biorrefinería) y opcionalmente las enzimas producidas en el primer proceso de producción de biocombustibles se pueden recolectar, purificar y vender al exterior para su uso en la producción de biocombustibles a partir de materiales lignocelulósicos.

15 En una realización de la invención, el primer proceso de producción de biocombustible (proceso 1) utiliza materia prima que comprende materiales lignocelulósicos que contienen azúcares poliméricos. El proceso 1 utiliza un hongo seleccionado de *Aspergillus* que sea capaz de utilizar azúcares poliméricos por exoenzimas y capaz de producir biocombustibles en el mismo proceso. El proceso 1 produce lípidos. El proceso 1 es, preferentemente, un proceso aerobio o aireado que produce lípidos. El proceso 1 usa preferentemente un hongo seleccionado de *Aspergillus* que es capaz de utilizar tanto hemicelulosa como celulosa mediante la producción de exoenzimas. Las exoenzimas producidas en el proceso 1 se recuperan y reutilizan en la hidrólisis de azúcares poliméricos para el segundo proceso de producción de biocombustibles (proceso 2) o en el proceso 2.

20 En un ejemplo, el proceso 2 utiliza microorganismos que son capaces de producir biocombustibles seleccionados de alcoholes a partir de azúcares monoméricos pero no son capaces de producir exoenzimas para utilizar azúcares poliméricos. El proceso 2 produce etanol, butanol, o acetona-butanol-etanol. El proceso 2 es preferentemente un proceso anaeróbico que produce etanol, butanol o acetona-etanol-butanol.

25 Opciones típicas de proceso y materias primas, las materias primas pueden contener otros componentes de la lignocelulosa tales como lignina y/o pectina además de hemicelulosa y/o celulosa:

Caso 1: El proceso 1 usa hemicelulosa; el proceso 2 usa celulosa

Caso 2: El proceso 1 usa celulosa; el proceso 2 usa hemicelulosa

Caso 3: El proceso 1 usa celulosa; el proceso 2 usa celulosa

Caso 4: El proceso 1 usa hemicelulosa; el proceso 2 usa hemicelulosa

Caso 5: Proceso 1: usa una mezcla de hemicelulosa y celulosa (cualquier mezcla); Proceso 2: usa una mezcla de hemicelulosa y celulosa (cualquier mezcla)

Caso 6: Proceso 1: usa una mezcla de hemicelulosa y celulosa (cualquier mezcla); el proceso 2 usa celulosa

Caso 7: Proceso 1: usa una mezcla de hemicelulosa y celulosa (cualquier mezcla); el proceso 2 usa hemicelulosa.

30 En un ejemplo preferido, las enzimas capaces de hidrolizar azúcares poliméricos se producen en un bioproceso aeróbico o aireado que también produce biocombustibles o un material de partida para biocombustibles, que son lípidos. El bioproceso aeróbico permite la producción eficiente de enzimas.

45 De acuerdo con una realización preferida de la invención, la hidrólisis y la producción de biocombustibles o materias primas para biocombustibles se llevan a cabo en una sola etapa utilizando microorganismos que son capaces tanto de producir enzimas capaces de hidrólisis de azúcares oligoméricos como de producción de biocombustibles en forma de lípidos. Este tipo de enfoque que presenta la producción de celulosa (y/o hemicelulosa), la hidrólisis y fermentación de celulosa (y/o hemicelulosa) en una sola etapa a menudo se denomina bioprocesamiento consolidado. El bioprocesamiento consolidado ofrece el potencial de menor coste y mayor eficiencia que los procesos que presentan producción de celulosa (y/o hemicelulosa) dedicada. Esto da como resultado la evitación de costes de capital, sustrato y otras materias primas, y utilidades asociadas a la producción de celulosa. De manera adicional, ofrece la posibilidad de obtener tasas de hidrólisis más altas y, por lo tanto, reducir el volumen del reactor y la inversión de capital, mediante bioprocesamiento consolidado. El bioprocesamiento consolidado reduce significativamente los costes al eliminar o al

50 menos disminuir la necesidad de enzimas producidas en un bioproceso separado.

55 En un ejemplo, la producción de enzimas y la producción de aceite unicelular ocurren simultánea o secuencialmente en cualquier orden. Por lo general, la producción de enzimas se inicia antes. La enzima producida degrada la biomasa polimérica en el medio de cultivo produciendo así componentes para el crecimiento del microorganismo.

60 En un ejemplo, las fracciones de celulosa o hemicelulosa se dividen en dos partes. Una parte de la celulosa o hemicelulosa puede usarse para cultivar organismos productores de biocombustibles que poseen capacidades enzimáticas para la degradación de azúcares poliméricos. Las enzimas pueden recuperarse del medio de cultivo gastado o el medio de cultivo gastado que comprende enzimas puede reutilizarse para la producción de biocombustible a partir de la segunda parte de celulosa o hemicelulosa. En un ejemplo preferente, los lípidos y los alcoholes son producidos por procesos microbiológicos, tales como azúcar polimérico que utilizan microorganismos capaces de

65

acumular lípidos se utilizan para una parte de celulosa o hemicelulosa. Los alcoholes se producen a partir de otra parte de la celulosa o hemicelulosa tratada con enzimas recuperadas del medio de cultivo gastado del primer proceso utilizando productores de lípidos con capacidad para utilizar azúcares poliméricos. En una realización de la invención, se producen lípidos y etanol, lípidos y butanol o lípidos y acetona-butanol-etanol (ABE). De forma similar, se pueden producir ABE y lípidos, ABE y etanol, etanol y ABE o etanol y lípidos.

El proceso como se describe en el presente documento no se limita al uso en la producción de biocombustibles únicamente. Se puede combinar con cualquier tipo de fermentación aeróbica o anaeróbica a partir del uso de polisacáridos como fuentes de carbono y/o energía.

En una realización de la invención, una mezcla de celulosa y hemicelulosa se utiliza para la producción de biocombustibles por microorganismos que poseen capacidades enzimáticas para degradar azúcares poliméricos. Las enzimas se pueden recuperar del medio de cultivo gastado o el medio de cultivo gastado, incluidas las enzimas, se puede reutilizar para hidrolizar celulosa o hemicelulosa para la producción de biocombustibles usando organismos que no son capaces de usar azúcares poliméricos. En una realización preferida de la invención, los lípidos y el etanol se producen mediante procesos microbiológicos, tales como azúcar polimérico que utilizan microorganismos capaces de acumular lípidos se utilizan para una parte de celulosa o hemicelulosa. El etanol se produce a partir de otra parte de la celulosa o hemicelulosa mediante tratamiento con enzimas recuperadas del medio de cultivo gastado del primer proceso utilizando productores de lípidos con capacidad para utilizar azúcares poliméricos. De forma similar, en aún otra realización de la invención, se producen lípidos y butanol o lípidos y ABE. De forma similar, se pueden producir ABE y lípidos, ABE y etanol, etanol y ABE o etanol y lípidos.

En un ejemplo, la materia prima del proceso contiene azúcares poliméricos tanto de hemicelulosa como de celulosa (cualquier mezcla) y utiliza microorganismos capaces de producir exoenzimas para la hidrólisis de azúcares poliméricos y biocombustibles (Proceso 1). Las exoenzimas que se encuentran en el medio de cultivo gastado se recuperan y reutilizan en la sacarificación de azúcares poliméricos tanto de hemicelulosa como de celulosa antes o en otro bioproceso (Proceso 2) que produce biocombustibles utilizando organismos que no son capaces de utilizar azúcares poliméricos. A modo de ejemplo, los hidrolizados que contienen azúcares poliméricos de hemicelulosa y celulosa se dividen en dos fracciones, una fracción utilizada para el Proceso 1 y otra fracción para el Proceso 2.

En un ejemplo, los azúcares utilizados para el Proceso 1 consisten principalmente en hemicelulosa, pero también algunos azúcares celulósicos en forma polimérica, normalmente del 0,5 al 20 % (p/p), normalmente del 0,5 al 10 % en (p/p). Por ejemplo, la corriente que contiene azúcares poliméricos de hemicelulosa se complementa con una corriente que contiene azúcares poliméricos de celulosa. En otro ejemplo más, los azúcares utilizados para el Proceso 1 consisten principalmente en celulosa, pero también algunos azúcares hemicelulósicos en forma polimérica, normalmente del 0,5 al 30 % (p/p), normalmente del 1 al 20 % (p/p), por ejemplo, la corriente que contiene azúcares poliméricos de celulosa se complementa con una corriente que contiene azúcares poliméricos de hemicelulosa.

En otro ejemplo, los microorganismos que utilizan azúcar polimérico producen conjuntos de enzimas que tienen la capacidad de utilizar tanto hemicelulosa como celulosa.

En un ejemplo, el organismo capaz de utilizar azúcares poliméricos y producir biocombustibles o materia prima para biocombustibles y otro organismo capaz de producir biocombustibles o materia prima para biocombustibles pero incapaz de utilizar los azúcares poliméricos, se añaden en el mismo reactor (cultivo mixto).

En un ejemplo, se eliminan las células del proceso de producción de biocombustibles utilizando azúcares poliméricos, y el medio de cultivo gastado como tal, incluyendo enzimas capaces de hidrolizar polímeros de azúcar, se alimentan a otro proceso de producción de biocombustibles con organismos que no son capaces de utilizar azúcares poliméricos.

No es necesario separar por completo el sobrenadante y las células. En algunos 2 ejemplos, el sobrenadante comprende del 1 % al 30 % de las células del cultivo de microorganismos original. En algunos 2 ejemplos, el sobrenadante comprende del 2 al 15 %, en algunos ejemplos del 3 al 10 %, en algunos ejemplos del 5 al 8 % de las células del cultivo de microorganismos original.

En un ejemplo, el mismo microorganismo se utiliza en la producción de lípidos y etanol a partir de material lignocelulósico. La producción de lípidos se obtiene en un proceso aireado (cultivo aeróbico) y la producción de etanol se obtiene en cultivo anaeróbico o microaeróbico.

Mediante la integración de bioprocesos aeróbicos y anaeróbicos se pueden obtener reducciones significativas en los costos de materias primas y químicos y aumentos en la productividad total de los biocombustibles en comparación con las unidades que operan de forma independiente.

Combinando la producción aeróbica de lípidos como primer bioproceso (Proceso 1) y alcoholes como segundo bioproceso (Proceso 2) es posible transformar la mayor parte del material lignocelulósico en compuestos adecuados para aplicaciones de biocombustibles (alcoholes, disolventes de cadena de C corta y lípidos). La integración de un bioproceso productor de lípidos y enzimas a una destilería de combustible que produce etanol, butanol o ABE puede

aumentar la capacidad de producción total de alcohol junto con la capacidad de producción de lípidos.

En un ejemplo, el proceso aeróbico suministra agua de proceso al proceso anaeróbico y viceversa. La recirculación del agua de proceso entre bioprocesos aeróbicos y anaeróbicos disminuye el riesgo de contaminación microbiana ya que el oxígeno es muy tóxico para las cepas microbianas anaeróbicas y, por otro lado, los microorganismos aeróbicos no crecen bien en condiciones anaeróbicas.

Después del proceso anaeróbico (Proceso 1 o 2), los disolventes se separan tradicionalmente de la fracción de agua por destilación y los sólidos en suspensión se separan del agua por decantación después de la destilación. En una realización de la invención, la biomasa celular y los polímeros celulósicos residuales (y las proteínas si se ha utilizado materia prima que contiene proteínas como materia prima) se hacen circular al proceso aeróbico. El medio de cultivo gastado, que posiblemente contiene azúcares restantes, tales como oligómeros intactos, pentosas y celobiosa, diarabinosa y xilobiosa, también se puede recircular al proceso aeróbico. Si el proceso anaeróbico utiliza levaduras *Saccharomyces* de tipo salvaje para la producción de etanol no se utilizan estos azúcares. En la producción basada en *Clostridium* de ABE, la bacteria puede utilizar pentosas similares a organismos normalmente productores de lípidos en procesos aeróbicos.

En un ejemplo, los biocombustibles se producen en un bioproceso integrado en el que el material lignocelulósico se divide en dos fracciones, una que contiene celulosa y otra que contiene hemicelulosa. El fraccionamiento de lignocelulosa en fracción de celulosa y hemicelulosa se puede realizar mediante cualquier método adecuado. La fracción de hemicelulosa y/o celulosa puede contener algo de lignina o residuos de lignina y/o pectina. En un ejemplo, se producen biocombustibles (lípidos, etanol, butanol o ABE) a partir de hemicelulosa polimérica utilizando organismos que poseen capacidades enzimáticas para la degradación de azúcares poliméricos. Las enzimas se pueden recuperar del medio de cultivo usado o el medio de cultivo usado, incluidas las enzimas, se puede reutilizar en la hidrólisis de celulosa polimérica para bioprocesos secundarios que producen biocombustibles (etanol, butanol, ABE, lípido). Como alternativa, en otro ejemplo más, los biocombustibles se producen a partir de celulosa polimérica mediante la utilización de organismos que poseen capacidades enzimáticas para la degradación de azúcares poliméricos. Las enzimas pueden recuperarse del medio de cultivo gastado o el medio de cultivo gastado, incluidas las enzimas, puede reutilizarse en la hidrólisis de hemicelulosa polimérica para la producción de biocombustibles en un segundo bioproceso.

En la práctica, la eficiencia de separación de la hemicelulosa de la celulosa no es del 100 % y la fracción de celulosa contiene algo de hemicelulosa. Los restos de hemicelulosa en la fracción de celulosa pueden ser hidrolizados por enzimas recuperadas del medio de cultivo usado del primer bioproceso (Proceso 1). Adicionalmente, en la práctica, la fracción de hemicelulosa puede contener algo de celulosa polimérica y si se utilizan organismos que pueden utilizar tanto hemicelulosa polimérica como celulosa, las enzimas tanto hemicelulosa como celulosa pueden recuperarse del medio de cultivo gastado y reutilizarse en el segundo proceso de producción de biocombustible (Proceso 2).

Adicionalmente, la degradación de la hemicelulosa y la celulosa puede implicar a las mismas enzimas, tales como, pero sin limitación, celobiasas. Por lo tanto, las enzimas útiles del medio de cultivo gastado del cultivo en hemicelulosa polimérica pueden recuperarse y reutilizarse en la hidrólisis de celulosa polimérica.

La figura 1 describe una realización de la invención en la que se integran la producción de lípidos aeróbicos y la producción de alcohol anaeróbicos. En este concepto, la materia prima lignocelulósica para ambos bioprocesos puede ser pretratada para formar fracciones de celulosa y hemicelulosa mediante cualquier tecnología, tales como, pero sin limitaciones, extracción con agua caliente, o métodos organosolv. El proceso de producción de lípidos aeróbicos utiliza hemicelulosa como materia prima, mientras que la producción de alcohol utiliza celulosa como materia prima. Para el proceso de producción de lípidos aeróbicos (proceso 1), se eligen microorganismos productores de lípidos que producen al menos hemicelulasas, preferentemente tanto hemicelulasas como celulasas.

Según la realización de la invención descrita en la figura 1, la producción de lípidos aeróbica y la producción de alcohol anaeróbica están integradas. El segundo bioproceso (Proceso 2) comprende que la fermentación alcohólica anaeróbica es más rápida, si se añade la enzima celobiasa. La enzima celobiasa se obtiene preferentemente, al menos parcialmente, a partir del medio de cultivo gastado del proceso de producción de lípidos aerobios, o como alternativa o además se puede utilizar celobiasa comercial.

En el segundo bioproceso que comprende (proceso 2) el bioproceso de producción de alcohol, se pueden usar cepas de producción que no son capaces de utilizar pentosas o disacáridos lignocelulósicos, tales como levaduras *Saccharomyces*. También se pueden utilizar organismos capaces de utilizar pentosas y/o azúcares poliméricos, tales como *Clostridia* para la producción de etanol o ABE. Potencialmente, el medio de cultivo gastado y/o del Proceso 2 después de la recuperación del producto se puede reciclar al bioproceso de producción de lípidos. La vinaza, es decir, LA fracción sólida procedente de la fermentación alcohólica, del proceso anaeróbico puede tratarse potencialmente en el mismo proceso de pretratamiento o proceso de hidrólisis que la lignocelulosa antes de alimentar a la producción de lípidos aeróbicos. Adicionalmente, la vinaza y/o el líquido de cultivo gastado (fase líquida) del proceso anaeróbico puede contener restos de celulosa, tales como oligómeros de celulosa, que puede actuar como inductor de la producción de celulosa en el proceso de producción de lípidos utilizando organismos que tienen actividad

de celulosa. Adicionalmente, el líquido de cultivo gastado del proceso anaeróbico (proceso 2) puede contener otros compuestos orgánicos, tales como ácidos orgánicos, alcoholes, glicerol, que se pueden convertir en lípidos en un bioproceso anaeróbico.

- 5 El medio de cultivo gastado del proceso de producción de lípidos aeróbicos (Proceso 1) se puede recuperar o concentrar para enriquecer las enzimas o se puede usar como agua de dilución del hidrolizado de celulosa entrante al proceso 2.

10 La figura 2 describe una realización de la invención en la que se integran la producción de lípidos aeróbicos y la producción de alcohol anaeróbicos. El proceso de producción de lípidos aeróbicos utiliza celulosa como materia prima, mientras que la producción de alcohol utiliza hemicelulosa como materia prima. El proceso de producción de lípidos aeróbicos (proceso 1), se eligen microorganismos productores de lípidos que producen al menos celulasas, preferentemente tanto hemicelulasas como celulasas. Las enzimas hemicelulasa y/o celulasa son 10 recuperadas y reutilizadas para la hidrólisis de celulosa en otro bioproceso que *contiene* fermentación anaeróbica de alcoholes, tales como etanol, butanol o ABE, preferentemente, producción de etanol o butanol.

15 En un ejemplo, las fracciones de celulosa o hemicelulosa se dividen en dos partes. Una parte de la celulosa o hemicelulosa puede usarse para cultivar organismos productores de biocombustibles que poseen capacidades enzimáticas para la degradación de azúcares poliméricos. Las enzimas pueden recuperarse del medio de cultivo gastado o el medio de cultivo gastado que incluye enzimas puede reutilizarse para la producción de biocombustible a partir de la segunda parte de celulosa o hemicelulosa. En un ejemplo preferente, los lípidos y el etanol son producidos por procesos microbiológicos, tales como azúcar polimérico que utilizan microorganismos capaces de acumular lípidos se utilizan para una parte de celulosa o hemicelulosa. El etanol se produce a partir de otra parte de la celulosa o hemicelulosa mediante tratamiento con enzimas recuperadas del medio de cultivo gastado del primer proceso utilizando productores de lípidos con capacidad para utilizar azúcares poliméricos. De forma similar, en aún otra 20 realización de la invención, se producen lípidos y butanol o lípidos y acetona-butanol-etanol. De forma similar, se puede producir acetona-butanol-etanol y etanol.

25 La figura 3 describe un ejemplo de producción de biocombustibles a partir de celulosa, mediante una integración de dos bioprocesos. El primer bioproceso comprende la producción de lípidos aeróbicos que también produce exoenzimas capaces de degradar celulosa polimérica. Las enzimas se reutilizan para la hidrólisis de celulosa en otro bioproceso que utiliza celulosa que comprende la fermentación anaeróbica de alcoholes, tales como etanol, butanol o ABE, preferentemente, producción de etanol o butanol. La figura 4 describe un bioproceso similar integrado para la bioproducción de biocombustibles, pero el proceso utiliza hemicelulosa como materia prima. Preferentemente, el primer bioproceso es la producción de lípidos y el segundo bioproceso es la producción de butanol o ABE.

30 Por lo tanto, cualquier combinación: lípido + etanol; lípido + butanol; lípido + ABE, butanol + etanol; ABE + etanol; etanol + etanol, etc., en cualquier orden, se puede utilizar en varios ejemplos.

40 Según un ejemplo, las materias primas que comprenden celulosa o hemicelulosa se dividen en dos fracciones.

El proceso como se describe en el presente documento no se limita al uso en la producción de biocombustibles únicamente. Se puede combinar con cualquier tipo de fermentación aeróbica o anaeróbica a partir del uso de polisacáridos como fuentes de carbono y/o energía.

45 En una realización de la invención, una mezcla de celulosa y hemicelulosa se utiliza para la producción de biocombustibles por microorganismos que poseen capacidades enzimáticas para degradar azúcares poliméricos. La celulosa y la hemicelulosa pueden derivar del mismo material o ser fracciones de diferentes materias primas. La mezcla también puede contener algo de lignina o restos o productos de degradación de lignina y/o pectina. En un bioproceso, se utilizan preferentemente tales organismos que producen biocombustible y también hemicelulasas y celulasas. Las enzimas se pueden recuperar del medio de cultivo gastado o el medio de cultivo gastado, incluidas las enzimas, se puede reutilizar para hidrolizar celulosa o hemicelulosa para la producción de biocombustibles usando organismos que no son capaces de usar azúcares poliméricos. En un ejemplo preferido, los lípidos y el etanol se producen mediante procesos microbiológicos, tales como azúcar polimérico que utilizan microorganismos capaces de acumular lípidos se utilizan para una parte de celulosa o hemicelulosa. Alcoholes, tales como etanol, butanol o ABE, se producen a partir de otra parte de celulosa o hemicelulosa tratada con enzimas recuperadas del medio de cultivo gastado del primer proceso utilizando productores de lípidos con capacidad para utilizar azúcares poliméricos. De forma similar, en otro ejemplo más, se producen lípidos y butanol o lípidos y acetona-butanol-etanol. De forma similar, se pueden producir acetona-butanol-etanol y etanol, ABE y lípidos, etanol y ABE, etanol o lípidos.

50 En una realización de la invención, la materia prima para el proceso comprende azúcares poliméricos tanto de hemicelulosa como de celulosa y utiliza microorganismos capaces de producir exoenzimas para la hidrólisis de azúcares poliméricos y biocombustibles (Proceso 1). Las exoenzimas en el medio de cultivo gastado se recuperan y reutilizan en la sacarificación de azúcares poliméricos tanto de hemicelulosa como de celulosa antes o en otro bioproceso (Proceso 2) que produce biocombustibles utilizando organismos que pueden no ser capaces de utilizar azúcares poliméricos. A modo de ejemplo, los hidrolizados que contienen azúcares poliméricos de hemicelulosa y 60

celulosa se dividen en dos fracciones, una fracción utilizada para el Proceso 1 y otra fracción para el Proceso 2. En la figura 5 se muestra una realización específica de la invención que utiliza una mezcla de celulosa y hemicelulosa de materia prima lignocelulósica. En esta realización de la invención, el proceso de producción de lípidos aeróbica que incluye organismos capaces de utilizar azúcares poliméricos en celulosa y hemicelulosa se integra con el proceso de producción de alcohol anaeróbica, tal como el proceso de producción de etanol, butanol o ABE (Proceso 2). La vinaza y/o el líquido de cultivo gastado se pueden reciclar del proceso de producción de alcohol al proceso de producción de lípidos, que pueden contener azúcares poliméricos que pueden actuar como inductores de la producción de hemicelulasas y celulasas en el proceso de producción de lípidos. Adicionalmente, el líquido de cultivo gastado del proceso anaeróbico (Proceso 2) puede contener otros compuestos orgánicos, tales como ácidos orgánicos, alcoholes, glicerol, que se pueden convertir en lípidos en un bioproceso anaeróbico. Por otra parte, el medio de cultivo gastado o la vinaza del Proceso 2 pueden contener enzimas que son beneficiosas para el Proceso 1.

En un ejemplo, los azúcares utilizados para el primer bioproceso (Proceso 1) comprenden principalmente azúcares poliméricos de hemicelulosa, pero también algunos azúcares celulósicos en forma polimérica. Por ejemplo, la corriente que contiene azúcares poliméricos de hemicelulosa se complementa con una corriente que contiene azúcares poliméricos de celulosa. El primer bioproceso utiliza microorganismos capaces de producir exoenzimas para la hidrólisis de azúcares poliméricos y biocombustibles. El segundo bioproceso (Proceso 2) utiliza materia prima que comprende celulosa y microorganismos que son capaces de producir biocombustibles a partir de azúcares en celulosa, pero que no son necesariamente capaces de utilizar azúcares poliméricos. Las exoenzimas del medio de cultivo gastado del Proceso 1 se usan se recuperan y reutilizan en la sacarificación de azúcares poliméricos tanto de hemicelulosa como de celulosa antes o en el segundo bioproceso (bioproceso 2). La figura 6 describe un ejemplo de tal bioproceso integrado donde el primer bioproceso es aeróbico, proceso de producción de lípidos microbianos y segundo bioproceso es un proceso de fermentación alcohólica anaeróbica. Mucho más preferentemente, el segundo bioproceso es el proceso de fermentación de etanol o butanol.

En otro ejemplo más, los azúcares utilizados para el primer bioproceso (Proceso 1) consisten principalmente en azúcares poliméricos de celulosa, pero también algunos azúcares hemicelulósicos en forma polimérica. Por ejemplo, la corriente que contiene azúcares poliméricos de celulosa se complementa con una corriente que contiene azúcares poliméricos de hemicelulosa. El primer bioproceso utiliza microorganismos capaces de producir exoenzimas para la hidrólisis de azúcares poliméricos y biocombustibles. El segundo bioproceso (Proceso 2) utiliza materia prima que comprende hemicelulosa y microorganismos que son capaces de producir biocombustibles a partir de azúcares en hemicelulosa, pero que no son necesariamente capaces de utilizar azúcares poliméricos. Las exoenzimas del medio de cultivo gastado del Proceso 1 se recuperan y reutilizan en la sacarificación de azúcares poliméricos tanto de hemicelulosa como de celulosa antes o en el segundo bioproceso (bioproceso 2). La figura 7 describe un ejemplo de tal bioproceso integrado donde el primer bioproceso es un proceso de producción de lípidos microbianos aeróbico y el segundo bioproceso es un proceso de fermentación alcohólica anaeróbica. Mucho más preferentemente, el segundo bioproceso es el proceso de fermentación de butanol y/o ABE.

En otro ejemplo, los microorganismos que utilizan azúcar polimérico producen conjuntos de enzimas que tienen la capacidad de utilizar tanto hemicelulosa como celulosa.

En un ejemplo, el organismo capaz de utilizar azúcares poliméricos y producir componentes para biocombustibles y otro organismo capaz de producir componentes para biocombustibles, pero no es capaz de utilizar, los azúcares poliméricos se añaden en el mismo reactor (cultivo mixto).

En un ejemplo, se eliminan las células del proceso de producción de biocombustibles con azúcares poliméricos y el medio de cultivo gastado como tal, incluyendo enzimas capaces de hidrolizar polímeros de azúcar, se alimentan a otro proceso de producción de biocombustibles con organismos que no son capaces de utilizar azúcares poliméricos. Más específicamente, en una realización de la invención se utilizan microorganismos, tales como aquellos capaces de acumular lípidos o producir alcoholes, tales como etanol, butanol o ABE, que pueden utilizar azúcares de pentosa aumentando así la eficiencia de la utilización de lignocelulosa. Adicionalmente, los organismos, tales como los organismos acumuladores de lípidos o los organismos productores de alcohol, también pueden utilizar azúcares poliméricos en celulosa y/o en hemicelulosa mediante exoenzimas. Las enzimas pueden recuperarse del medio de cultivo gastado y utilizarse para la hidrólisis de azúcares poliméricos en los procesos de producción de biocombustibles, donde los microorganismos no son capaces de utilizar azúcares poliméricos. En una realización específica de la invención, ambos bioprocesos utilizan microorganismos que pueden utilizar azúcares poliméricos y producir biocombustibles o material de partida para biocombustibles.

En un ejemplo, el mismo microorganismo se utiliza en la producción de lípidos y alcohol, en particular etanol a partir de material lignocelulósico. La producción de lípidos se obtiene en un proceso aireado (cultivo aerobio), cuyo alcohol, en particular, la producción de etanol, se obtiene en cultivos anaeróbicos o microaeróbicos.

Un ejemplo específico incluye un proceso integrado de uno de los bioprocesos en donde el proceso integrado es un bioproceso mesófilo que produce biocombustibles y posiblemente enzimas, con temperatura de funcionamiento inferior a 45 °C, preferentemente inferior a 40 °C, mientras que otro bioproceso es un proceso termófilo que produce biocombustibles, y posiblemente enzimas, con temperatura de funcionamiento superior a 45 °C, preferentemente

superior a 55 °C. Un ejemplo de dicho proceso integrado es la producción de lípidos aeróbicos mesófilos con alcohol(es) anaeróbico(s) termófilo(s), tal como proceso de producción de etanol. La combinación de procesos mesófilos y termófilos puede ser beneficiosa para el reciclado y la reutilización de enzimas entre bioprocesos. A modo de ejemplo, el sobrenadante que comprende enzimas, que probablemente también comprende algunas células, producido en el medio en proceso mesófilo se reutiliza en un proceso termófilo. Las enzimas del proceso mesófilo pueden ser termoestables para tolerar la temperatura en el proceso termófilo, mientras que las células residuales en el sobrenadante se inactivan y, por lo tanto, no pueden crecer en el proceso termofílico. Como alternativa, viceversa, los organismos que crecen en el intervalo de temperatura termófila, no crecen bien en el intervalo de temperatura mesófila en el siguiente bioproceso y no contaminan el proceso.

Reciclado de efluentes y biomasa

La invención permite el reciclado de efluentes de un bioproceso a otro bioproceso. En realizaciones preferentes de la invención, el integrado utiliza al menos un bioproceso aeróbico y otro anaeróbico para la producción de biocombustibles. Esto reduce el riesgo de contaminación al reciclar efluentes del proceso aeróbico al proceso anaeróbico. El bioproceso aeróbico que produce lípidos puede utilizar compuestos de efluentes que se originan en bioprocesos anaeróbicos como fuentes de carbono y nutrientes. El bioproceso anaeróbico puede ser, por ejemplo fermentación de etanol, fermentación de butanol o fermentación de acetona-butanol-etanol (fermentación ABE). Estos bioprocesos normalmente dan como resultado ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido butírico o acetaldehído en efluentes de fermentación.

Además de las enzimas, el reciclado de biomasa y/o medio de cultivo gastado entre los bioprocesos proporciona nutrientes, minerales y/o factores de crecimiento, tales como proteínas, aminoácidos, vitaminas, metabolitos, coenzimas, que disminuyen la necesidad de anabolismo en los microorganismos y, por lo tanto, aumentan la producción de biocombustibles microbianos, especialmente la producción de lípidos, que es una etapa del proceso aeróbico. De manera adicional, las células microbianas del proceso anaeróbico contienen lípidos, tales como los lípidos de membrana, que pueden ser utilizados por los organismos productores de lípidos, por ejemplo, incorporados o transformados en triacilgliceroles productores de lípidos. Los organismos productores de lípidos pueden utilizar los alcoholes residuales del caldo de fermentación del proceso de producción de alcohol después de la recuperación del producto. En un ejemplo, los alcoholes de la fermentación de alcoholes no se recuperan y el caldo de fermentación, que contienen alcoholes y posibles enzimas activas, se alimenta al proceso de producción de lípidos aeróbicos donde se convierten en lípidos.

El sobrenadante de la producción de lípidos en un bioproceso aeróbico o de la producción de alcohol en un bioproceso anaeróbico se puede recolectar en diferentes momentos para optimizar la cantidad de enzimas para su reutilización en otro bioproceso. En un ejemplo, la biomasa y/o el sobrenadante se eliminan parcialmente del bioproceso aeróbico durante la fermentación para optimizar la actividad de las enzimas para su reutilización y el contenido de lípidos en la biomasa.

En un ejemplo, el residuo celular y otros residuos sólidos de la producción de lípidos es después de la recuperación de lípidos o la biomasa de la producción de alcohol anaeróbico pueden ser tratados (termo)mecánica, química o enzimáticamente antes de reciclar de nuevo al proceso de producción de lípidos o al bioproceso de producción de alcohol anaeróbico. Si se usa un sistema en cascada, la biomasa se puede reciclar a cualquiera o todos los reactores en un sistema en cascada. También es posible reciclar la biomasa y/o el caldo de fermentación entre los fermentadores en cascada, con o sin el tratamiento de células en el medio. Esto puede acortar el tiempo de fermentación al aumentar la cantidad de biomasa o de microorganismos activos y/o enzimas.

En una realización de la invención, los residuos sólidos o biomasa, el medio de cultivo gastado y/o las enzimas recuperadas o enriquecidas a partir del medio de cultivo se reciclan parcialmente en el mismo bioproceso. Esto puede mejorar la producción de enzimas y/o biocombustibles en el bioproceso.

El reciclado de la biomasa y/o el medio de cultivo gastado puede dar como resultado la acumulación de minerales, materiales inertes y otros compuestos y conducen a inhibiciones. Por lo tanto, la cantidad de recirculación se optimiza y una cierta cantidad de biomasa y/o medio de cultivo gastado se elimina de vez en cuando.

Pretratamiento de la lignocelulosa antes de la fermentación

El pretratamiento de la lignocelulosa con el fin de mejorar la digestibilidad de las enzimas poliméricas que hidrolizan el azúcar se puede realizar mediante cualquier método conocido. El pretratamiento puede incluir el fraccionamiento (separación) de hemicelulosa y celulosa y posible lignina por cualquier método conocido. La elección del método de pretratamiento correcto depende en gran medida del tipo de materia prima lignocelulósica que se utilizará en el proceso. Hay varios métodos/tecnologías que solo son adecuados para un determinado tipo de materia prima. Preferentemente, la separación de hemicelulosa y/o celulosa se realiza con un método que produce hidrolizados que no inhiben el crecimiento de microorganismos productores de lípidos. Las fracciones de hemicelulosa y celulosa pueden contener azúcares principalmente o al menos parcialmente en forma polimérica. Un ejemplo es usar extracción con agua caliente para extraer hemicelulosa. Además de la hemicelulosa, la extracción con agua caliente puede

eliminar los minerales de los materiales lignocelulósicos que son preferibles en la fermentación y esto reduce la necesidad de adiciones de minerales en el medio de cultivo. En otro ejemplo, se realiza un pretratamiento con ácido orgánico, tal como el tratamiento con ácido acético, ácido fórmico, acetato de etilo, ácido láctico o ácido málico o cualquier combinación de los mismos. En otro ejemplo más, se realiza pretratamiento con ácido, tal como ácido sulfúrico. También se utiliza explosión de vapor con o sin catalizador ácido. También se pueden usar métodos tales como el pretratamiento organosolv, tal como tratamiento con, tal como el uso de etanol metanol, acetona o cualquier mezcla de los mismos, posiblemente complementado con un catalizador ácido como ácido sulfúrico o dióxido de azufre (SO₂). También se pueden usar otros métodos tales como pretratamiento asistido por amoníaco, expansión de fibra de amoníaco, percolación de reciclado de amoníaco o pretratamientos con cal. El material lignocelulósico puede ser tratado (termo)mecánicamente, por ejemplo tamaño de partícula reducido con cualquier método, tales como, aunque sin limitación, trituración o molienda, antes o entre el pretratamiento.

La purificación y/o separación de las fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina puede no ser necesaria antes de alimentar biomasa a un proceso que produce exoenzimas capaces de hidrolizar azúcares poliméricos en materiales lignocelulósicos y produce biocombustibles, tales como lípidos.

Reciclado de biomazas

Las biomazas microbianas (células), o residuos de biomasa, tal como la biomasa después de la recuperación de lípidos, puede reciclarse del primer bioproceso al segundo bioproceso. Además, o como alternativa, las biomazas microbianas o los residuos de biomasa pueden reciclarse del segundo bioproceso al primer bioproceso. Las biomazas microbianas pueden reciclarse potencialmente con el sobrenadante. La biomasa microbiana se puede tratar (termo)mecánicamente, enzimática y/o químicamente antes de alimentar al bioproceso. En una realización de la invención, la biomasa microbiana para reciclar se trata en la misma operación unitaria donde se trata la biomasa lignocelulósica. En una realización de la invención, la biomasa microbiana para reciclar se somete al mismo tratamiento que la biomasa lignocelulósica antes de alimentar a un bioproceso, es decir, alimentación para la producción microbiana de biocombustibles o materia prima para la producción de biocombustibles. La biomasa microbiana reciclada contiene nutrientes que pueden ser beneficiosos para el bioproceso del que se alimentará. El primer bioproceso puede ser la producción de lípidos o alcohol, mientras que el segundo bioproceso puede ser la producción de alcohol o lípidos.

Las biomazas microbianas, los residuos de biomasa, tales como la biomasa después de la recuperación del aceite, y los sobrenadantes de los bioprocesos pueden reciclarse entre los bioprocesos. El sobrenadante y las células de los bioprocesos contienen nutrientes y/o enzimas que pueden reciclarse entre bioprocesos y son ventajosos para el bioproceso. El reciclado de biomazas o sobrenadantes puede mejorar el rendimiento general del producto en bioprocesos y disminuir la necesidad de comprar minerales o nutrientes externos y, por lo tanto, puede mejorar la economía de los procesos de biocombustibles.

En una realización de la invención, al menos parte del sobrenadante y al menos parte de la biomasa microbiana, o residuos de biomasa, del bioproceso 1 se alimenta al bioproceso 2.

En una realización de la invención, al menos una parte del sobrenadante y/o al menos una parte de las células y/o los residuos celulares del bioproceso 2 pueden reciclarse de nuevo al bioproceso 1.

Si el bioproceso 1 es un proceso aeróbico, tal como producción microbiana de lípidos, puede utilizar residuos orgánicos, tales como ácidos orgánicos, alcoholes o aldehídos, en el sobrenadante de un proceso de producción de alcohol.

En una realización de la invención, el agua de proceso o parte de ella del segundo proceso biotécnico después de la separación del biocombustible se recicla al agua de dilución de la materia prima del primer proceso biotécnico y/o del segundo proceso biotécnico, preferentemente al primer proceso biotecnológico.

En una realización de la invención, el sobrenadante o efluente de o después de la recuperación de alcohol del proceso de producción de etanol o butanol se recicla a un proceso de producción de lípidos. El proceso de producción de lípidos puede utilizar restos de etanol o butanol en el sobrenadante o efluente para el crecimiento microbiano y/o la producción de lípidos. Por lo tanto, la recuperación de etanol o butanol no necesita ser completa, ya que el etanol o butanol restante se puede utilizar para la producción de lípidos en el proceso posterior de producción de biocombustibles mediante la recirculación del efluente. Esto es ventajoso, ya que la muy alta eficiencia de eliminación (rendimiento) de los productos (etanol o butanol) normalmente da como resultado un mayor costo operativo o de capital. Permitir un rendimiento de recuperación de producto ligeramente menor puede reducir los costes operativos o de capital.

En un ejemplo, el sobrenadante o efluente de o después de la recuperación de ABE del proceso de fermentación de ABE se recicla a un proceso de producción de lípidos. El proceso de producción de lípidos puede utilizar restos de ABE, en el sobrenadante o efluente para el crecimiento microbiano y/o la producción de lípidos. Por lo tanto, la recuperación de etanol no necesita ser completa, ya que el ABE restante se puede utilizar para la producción de lípidos

en el proceso posterior de producción de biocombustibles mediante el reciclado del efluente.

Materias primas

5 El método se puede aplicar a cualquier material lignocelulósico, incluidas plantas leñosas o no leñosas, plantas herbáceas u otros materiales que contengan celulosa y/o hemicelulosa: Los materiales pueden ser residuos agrícolas (tales como paja de trigo, paja de arroz, tamo, cáscaras, rastrojo de maíz, bagazo de caña de azúcar), cultivos energéticos dedicados (tales como pasto varilla, *Miscanthus*, alpieste arundináceo, sauce, jacinto de agua), materiales o residuos de madera (incluidos los residuos o fracciones de aserraderos y de fábricas de pulpa y/o papel, tal como hemicelulosa, líquido de sulfito gastado, residuos de fibra y/o lodos primarios), musgo o turba, microorganismos o residuos de papel municipal. También se pueden usar materiales con un contenido bajo de lignina, tales como biomasa de macroalgas o microalgas. De manera adicional, los materiales pueden ser también fracciones de hemicelulosa o celulosa de prácticas industriales. La invención puede utilizar cualquier tipo de fracción de celulosa. La invención puede utilizar cualquier tipo de fracciones de hemicelulosa que contengan, por ejemplo, pero sin limitaciones, galactoglucomanano, xilano o arabinoxilano como fracciones principales. Las materias primas o determinadas fracciones, tales como hemicelulosa y/o celulosa, de materias primas de distinto origen, las especies de plantas o los procesos industriales pueden mezclarse entre sí y usarse como materias primas para los bioprocesos según la invención.

20 La fracción de hemicelulosa y/o celulosa que contiene azúcares poliméricos se puede alimentar al bioproceso que produce exoenzimas capaces de hidrolizar azúcares poliméricos en materiales lignocelulósicos y produce lípidos en cualquier forma, es decir, forma sólida o forma disuelta o como forma parcialmente sólida y parcialmente disuelta.

25 En un ejemplo, la biomasa lignocelulósica se añade en forma sólida en el bioproceso que produce exoenzimas capaces de hidrolizar azúcares poliméricos en materiales lignocelulósicos y produce lípidos. En un ejemplo, la lignocelulosa sólida puede haber sido tratada mecánicamente para obtener un tamaño de partícula más pequeño, por ejemplo, mediante molienda o trituración, pero no ha sido pretratada para separar las fracciones de celulosa, hemicelulosa o lignina antes de la fermentación. En otro ejemplo, la fracción sólida de lignocelulosa es, además del tratamiento mecánico para reducir el tamaño de las partículas, tratada con métodos que han abierto o aflojado la estructura de la lignocelulosa antes de su alimentación al bioproceso que produce exoenzimas capaces de degradar azúcares poliméricos y biocombustibles (Proceso 1). Tal fracción sólida de lignocelulosa puede contener celulosa y/o hemicelulosa y lignina en forma polimérica.

35 La fracción de lignina, si se fracciona a partir de lignocelulosa, puede usarse para cualquier propósito conocido, tal como, aunque sin limitaciones, la producción de energía y calor, a la producción de productos bioquímicos (bioplásticos, resinas), a biomateriales estructurales, a la pirólisis a la hidroxilación o a la gasificación y la síntesis de Fischer-Tropsch de compuestos que pueden utilizarse como productos químicos, biocombustibles y/o lubricantes.

40 La ventaja de la invención es que el proceso produce las exoenzimas necesarias por sí mismo (*in situ*) sin necesidad, o con menor necesidad, de la adición de otras enzimas no producidas por las cepas utilizadas en el proceso descrito. Las exoenzimas producidas en un proceso que produce lípidos a partir de celulosa y/o hemicelulosa se recuperan del medio de cultivo y se utilizan en un proceso integrado para producir biocombustible o materia prima para biocombustible con organismos que no pueden utilizar azúcares poliméricos. En otra realización de la invención, el medio de cultivo, de la producción de lípidos a partir de azúcares poliméricos que contienen exoenzimas capaces de degradar los azúcares poliméricos, después de la recuperación celular se concentra en enzimas o se usa sin enriquecimiento como medio de cultivo para la producción de biocombustibles o materias primas para biocombustibles a partir de azúcares poliméricos por parte de organismos que no pueden usar azúcares poliméricos.

50 Las materias primas para la producción de biocombustibles según la invención incluyen aquellas que contienen preferentemente al menos algunos azúcares poliméricos.

55 En la realización más preferida de la invención, la materia prima es biomasa lignocelulósica o cualquiera de sus fracciones.

En otra realización de la invención, el material de materia prima que comprende materiales lignocelulósicos contiene almidón.

60 Algunos ejemplos de materiales que contienen almidón incluyen, pero sin limitación, maíz, granos tales como trigo y cebada, tapioca, mandioca, arroz, patata, batata, malanga y microalgas.

65 De acuerdo con la invención, el primer bioproceso utiliza materias primas que comprenden materiales lignocelulósicos que contienen almidón mediante el uso de microorganismos que pueden utilizar azúcares poliméricos en almidón y producir biocombustibles en forma de lípidos. Las enzimas que hidrolizan el almidón en el sobrenadante del primer bioproceso se alimentan al segundo bioproceso para la producción microbiana de biocombustibles para hidrolizar el almidón de azúcares poliméricos. El segundo bioproceso utiliza microorganismos que no pueden utilizar azúcares

poliméricos en el almidón o, como alternativa, utilizan microorganismos que pueden utilizar azúcares poliméricos en el almidón. La introducción de enzimas con actividad de hidrólisis hacia el almidón mejorará la hidrólisis del almidón para el segundo bioproceso.

5 Hidrólisis de lignocelulosa

10 La celulosa normalmente no se disuelve en agua en la naturaleza. La hidrólisis de la celulosa sólida requiere normalmente tres tipos diferentes de enzimas: Endoglucanasas, exoglucanasas y 13-glucosidasas endoglucanasas (CE 3.2.1.4), operadas principalmente en la parte amorfa de la celulosa, atacan aleatoriamente lagos internos de macromolécula de celulosa. Las exoglucanasas o celobiohidrolasas (CE 3.2.1.91) atacan el final de la cadena de celulosa hidrolizando principalmente una unidad de celobiosa a la vez. Las exoglucanasas también pueden hidrolizar el polímero de celulosa cristalina. Finalmente, la hidrólisis de celobiosa a monómeros de glucosa la realiza la 13-glucosidasa (CE 3.2.1.21).

15 La hidrólisis de celulosa normalmente necesita la cooperación de muchas celulasas diferentes. La cantidad de diferentes glicosilhidrolasas analizadas es muy alta, ya se han enumerado más de 90 enzimas diferentes (incluso más en estudio) en 14 familias diferentes como dominios de celobiohidrolasa de ejemplo (CBH I, II), dominios endoglucanosa (EG I, II, III, IV, V) y dominios betaglucosidasa (BGL I, II).

20 Para la hidrólisis enzimática total de la hemicelulosa (xilanos, arabinoxilanos y glucomananos) se necesitan varias enzimas diferentes, que debe activarse aproximadamente al mismo tiempo. El primer ataque lo realizan normalmente enzimas como las endoxilanasas (1,4-13-D-xilan xilanohidrolasas), endoarabinasas y endomananasas (1,4-13-D-mananomananohidrolasas). Por ejemplo *Trichoderma reesei* tiene al menos 4 endoxilanasas diferentes y una endomananasa.

25 Las enzimas capaces de hidrolizar oligómeros de hemicelulosa después de la operación de endohemicelulasas son, por ejemplo, 13-xilosidasa, 13-arabinosidasa, 13-manosidasa y 13-glucosidasa (CE 33.2.1.21). Para romper los enlaces laterales residuales incluidos en los oligómeros se necesitan α -glucuronidasa (CE 3.2.1.139), α -arabinodasa (CE 3.2.1.55) y α -D-galactosidasa (CE. 3.2.1.22). Para la eliminación de los constituyentes de acetilo es necesaria la operación de esterases (CE 3.2.1.72).

30 Adicionalmente, la hidrólisis enzimática de la lignina requiere la actividad de enzimas oxidativas como lignina peroxidasa (LiP CE 1.11.1.14), peroxidasa dependiente de manganeso (MnP CE 1.11.1.13) y lacasa (CE 1.10.3.2). La modificación de la lignina necesita la cooperación de muchas enzimas, coenzimas y sistema de transporte de electrones entre donantes y aceptores finales. La estructura química y la unión de la lignina a la celulosa y hemicelulosa es más importante que la cantidad de lignina.

35 "Fermentación de ABE" o "producción de ABE" se refiere a un proceso en el que una mezcla de acetona, butanol (n-butanol) y etanol se produce por fermentación bacteriana. En algunos casos, se produce isopropanol en lugar de acetona, según la cepa bacteriana.

40 Un proceso para la producción de alcoholes normalmente comprende el cultivo anaeróbico de microorganismos en un biorreactor, normalmente en un fermentador. Se permite que el microorganismo produzca alcohol. El alcohol se recoge del caldo de fermentación, normalmente por destilación. El alcohol, tal como etanol y/o butanol, recuperado puede usarse como biocombustible. Por lo general, el etanol debe deshidratarse hasta una concentración del 99,5 % antes de usarse como biocombustible, por ejemplo como mezclas de gasolina y etanol en vehículos.

Microorganismos

50 Para el bioproceso (Proceso 1) que contiene alimento que comprende materiales lignocelulósicos, se usa un hongo seleccionado de *Aspergillus* capaz de producir lípidos y enzimas. Dichos hongos pueden utilizar azúcares poliméricos y producir compuestos adecuados para propósitos de biocombustibles. En realizaciones preferentes de la invención, los hongos productores de lípidos seleccionados de *Aspergillus* puede utilizar azúcares poliméricos en hemicelulosa y/o celulosa. Estos hongos pueden incluir *A. niger*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. nidulans* u hongos seleccionados de *Apergillus* que se modifican genéticamente para poder utilizar azúcares poliméricos en celulosa y/o hemicelulosa, o que se modifican genéticamente para mejorar la producción de lípidos.

55 En la realización más preferible de la invención, se usan hongos productores de lípidos seleccionados de *Aspergillus* que pueden utilizar azúcares poliméricos tanto de hemicelulosa como de celulosa, es decir, tienen actividad tanto de hemicelulosa como de celulasa. Dichos organismos se seleccionan de los hongos filamentosos del género *Aspergillus*, tal como *Aspergillus terreus*.

60 Para el segundo bioproceso (Proceso 2), que produce alcohol(es) a partir de una materia prima que comprende materiales lignocelulósicos, los organismos utilizados para la producción de etanol se pueden seleccionar de un grupo de bacterias, cianobacterias, hongos como levaduras y mohos (hongos filamentosos) y microalgas, más preferentemente bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Los microorganismos pueden producir fácilmente etanol

o han sido modificados genéticamente para acumular etanol o mejorar la acumulación de etanol. Los organismos productores de etanol incluyen organismos que son capaces de utilizar azúcares monoméricos o poliméricos en materiales lignocelulósicos. Los organismos productores de etanol incluyen, pero sin limitación, los siguientes organismos:

5 Hongos tales como levaduras pertenecientes a los siguientes géneros *Saccharomyces*, como *S. cerevisiae* o *S. uvarum*, *Candida*, como *C. shehatae*, *Pachysolen*, como *P. tannophilus*, *Pichia*, como *P. stipitis* y *Schizosaccharomyces*, como *S. pombe*.

10 Hongos filamentosos pertenecientes a los siguientes géneros tales como *Aurobasidium*, como *A. pullulans* y *Fusarium*, como *F. avenaceum* o *F. oxysporum*.

15 Bacterias pertenecientes a los siguientes géneros tales como *Bacteroides*, *Geobacillus*, *Clostridium* como *C. thermocellum* o *C. saccharolyticum*, *Erwinia*, como *E. chrysanthemi*, *Escherichia*, como *E. coli*, *Klebsiella*, como *K. oxytoca*, *Sarcina*, *Raoultella*, *Ruminococcus*, espiroquetas, *Thermoanaerobacter*, como *T. etanolicus*, *T. mathranii*, *T. thermohydrosulfuricus*, *Thermoanaerobacterium*, *T. aciditolerans*, *T. acetarioense*, *T. polysaccharolyticum*, *T. thermosaccharolyticum*, *T. zeae*, *Thermobrachium* como *T. cekere* y *Zymomonas* como *Z. mobilis*.

20 Los organismos utilizados para la producción de butanol, o acetona-butanol-etanol, o iso-butanol-etanol-acetona pueden seleccionarse entre un grupo de bacterias, cianobacterias, hongos como levaduras y mohos (hongos filamentosos) y microalgas, más preferentemente bacterias, hongos filamentosos y levaduras, más preferentemente bacterias. Butanol o acetona-butanol-etanol incluyen organismos productores que son capaces de utilizar azúcares monoméricos o poliméricos en materiales lignocelulósicos. Los organismos productores de butanol o acetona-butanol-etanol incluyen, pero sin limitación, los siguientes organismos:

25 Bacterias pertenecientes a los siguientes géneros tales como *Clostridium*, como *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. aurantibutyricum*, *C. saccharoperbutylacetonicum* y *Escherichia*, como *E. coli*.

"Microorganismo oleaginoso" se refiere en el presente documento a un microorganismo que acumula al menos el 15 % (p/p) de su biomasa como lípido cuando se cultiva en condiciones adecuadas u óptimas para la producción de lípidos.

30 "Masa unicelular que contiene lípidos" significa una masa unicelular formada autotrófica, heterotrófica y/o mixotróficamente y micelio celular con un contenido de lípidos de al menos un 3 %, preferentemente al menos un 10 %, preferentemente al menos un 15 % (p/p) o más de materia seca del microorganismo.

35 Enzimas

Las enzimas que se emplean en el proceso de la invención incluyen especialmente aquellas que son capaces de convertir azúcares en microorganismos utilizables. Normalmente tales enzimas son enzimas hidrolíticas, tales como los que pueden convertir polímeros de azúcar en monómeros de azúcar. Por lo general, esto no lo realiza una sola enzima sino un grupo de enzimas. Como alternativa, las enzimas capaces de convertir azúcares en formas utilizables para microorganismos incluyen isomerasas.

45 "Celulasa" o "enzima celulolítica" se refiere a un grupo de enzimas producidas principalmente por hongos, tales como hongos filamentosos o levaduras, bacterias, plantas o por animales que catalizan la hidrólisis de la celulosa, también llamada celulólisis. El número CE para las enzimas celulasa es CE 3.2.1.4. Se conocen varios tipos diferentes de celulasas, que difieren estructural y mecánicamente. El general de las celulasas incluye, según el tipo de reacción catalizada, endocelulasas, exocelulasas, celobiasas o beta-glucosidasas, celulasas oxidativas y fosforilasas de celulosa.

50 "Hemicelulasa" se refiere a un grupo de enzimas producidas principalmente por hongos, tales como hongos filamentosos o levaduras, bacterias, plantas o por animales que catalizan la hidrólisis de la hemicelulosa. Por ejemplo, las enzimas implicadas en la hidrólisis del xilano incluyen endoxilanasas, acetil-xilanesterasas, α -D-glucuronidasas, α -L-arabinofuranosidasas, esterasas de ácido ferúlico y β -xilosidasas. De manera adicional, las enzimas implicadas en la hidrólisis de galactoglucomanano incluyen endomananasas, acetil-mananesterasas, α -galactosidasas, β -glucosidasas, β -manosidasas. Además, las enzimas implicadas en la hidrólisis de arabinogalactano incluyen β -galactosidasa y endo- α -L-arabinanasa. Estas enzimas se pueden encontrar con los siguientes números CE: CE 3.2.1.8, CE 3.2.1.37, CE 3.2.1.55, CE 3.2.1.99, CE 3.2.1.139, CE 3.2.1.78, CE 3.2.1.25, CE 3.2.1.22, CE 3.2.1.21, CE 3.2.1.89, CE 3.1.1.72, CE 3.1.1.6, CE 3.1.1.73.

60 "Hemicelulosa" se refiere a un grupo de carbohidratos complejos que se encuentran en un material lignocelulósico que, con otros carbohidratos (por ejemplo, pectinas), rodean las fibras de celulosa de las células vegetales. La composición de las hemicelulosas depende del tipo de planta. Los tipos más comunes de hemicelulosas incluyen xilano, glucoronoxilano, glucomanano, galactoglucomanano, arabinoxilano, xiloglucano y arabinogalactano.

65 "Material lignocelulósico" o "biomasa lignocelulósica" se refiere a la biomasa compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina o cualquiera de sus fracciones.

"Sacarificación" se refiere a la hidrólisis de azúcares poliméricos a monómeros de azúcar. La sacarificación se logra normalmente mediante el uso de enzimas capaces de hidrolizar azúcares poliméricos.

Bioprocesos

5 La producción de lípidos microbianos se puede realizar con cualquier método conocido o un método desarrollado en el futuro. Normalmente, el proceso de producción de lípidos microbianos incluye el cultivo de microorganismos en biorreactores aireados en cultivo sumergido. Los microorganismos se cultivan en un medio de cultivo líquido que comprende fuentes de carbono y energía, tales como azúcares de hemicelulosa y/o celulosa, y macro y micronutrientes. El cultivo se puede realizar, por ejemplo, como cultivo por lotes, cultivo alimentado por lotes, cultivo continuo. El cultivo también se puede realizar en un proceso en cascada. En el cultivo, se deja que los microorganismos crezcan y acumulen lípidos intracelularmente. Algunos microorganismos también pueden excretar los lípidos al medio de cultivo.

15 El proceso de producción de lípidos microbianos se puede llevar a cabo también en reactores, donde la cantidad de agua libre es baja o donde la producción se lleva a cabo sobre una superficie sólida o semisólida. La masa celular u otra biomasa que no se disuelve en agua se puede extraer con soluciones acuosas para obtener enzimas en forma soluble.

20 Producción microbiana de etanol, butanol o acetona-etanol-butanol realizada con cualquier método conocido o un método desarrollado en el futuro. Normalmente, los microorganismos se cultivan en un fermentador en cultivo sumergido. Los microorganismos se cultivan en un medio de cultivo líquido que consta de fuentes de carbono y energía, tales como azúcares de hemicelulosa y/o celulosa, y macro y micronutrientes. El cultivo se puede realizar, por ejemplo, como cultivo por lotes, cultivo alimentado por lotes, cultivo continuo. El cultivo también se puede realizar en un proceso en cascada.

Recuperación de enzimas del medio de cultivo gastado

30 El sobrenadante y/o las células de microorganismos pueden separarse del cultivo de microorganismos y utilizarse como preparación enzimática o como fuente de enzimas. El sobrenadante representa una fracción sustancialmente libre de células, que comprende el medio de cultivo gastado. El sobrenadante también se puede llamar "líquido de fermentación", "una fase líquida" o "ambos cultivos" o "caldo de cultivo".

35 La separación del sobrenadante y las células se puede realizar por cualquier método adecuado manteniendo la actividad catalítica de las enzimas.

40 Un método preferido para la recuperación de enzimas es un método por el cual el cultivo de microorganismos, el sobrenadante o cualquier combinación de los mismos puede ser tratado por un experto en la materia para lograr la recuperación de las enzimas manteniendo su actividad catalítica.

45 Las enzimas se pueden recuperar del cultivo de microorganismos, el medio de cultivo gastado, el sobrenadante y las células de microorganismos por cualquier método conocido y adecuado o por cualquier método adecuado desarrollado en el futuro. Lo mismo se aplica también a los métodos mediante los cuales las enzimas pueden separarse en fracciones con las actividades enzimáticas deseadas.

50 Un método mediante el cual se recupera el cultivo de microorganismos o el sobrenadante o la fracción proteica enriquecida que comprende enzimas catalíticamente activas puede basarse en su tamaño molecular, comportamiento iónico, solubilidad en agua, solubilidad en diferentes solutos o solubilidad en mezclas de solutos que contienen un factor tampón o un factor activo de superficie o un compuesto activo de superficie o una sal.

55 Las enzimas se pueden recuperar del medio de cultivo por varios procedimientos, incluyendo, pero sin limitaciones, procedimientos tales como centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

Si es necesario, las enzimas pueden purificarse o aislarse mediante varios procedimientos que incluyen, entre otros, cromatografía, procedimientos electroforéticos, solubilidad diferencial, SDS-PAGE o extracción.

Las enzimas pueden estabilizarse, por ejemplo, con sal, azúcar o glicerol.

60 Es más, las enzimas pueden formularse para la aplicación deseada. Las "enzimas extracelulares" son enzimas excretadas al medio de cultivo o liberadas por lisis celular desde las células al medio de cultivo. Las enzimas extracelulares pueden recuperarse del sobrenadante.

65 En una realización de la invención, la fracción proteica se enriquece en el sobrenadante. El enriquecimiento se puede realizar de forma sencilla, por ejemplo, concentrando el sobrenadante.

La fracción proteica podrá estar enriquecida al menos un 10 %, normalmente al menos un 20 %, en varias

realizaciones al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, en comparación con la fase líquida original. Los ejemplos de métodos adecuados son los métodos basados en las propiedades iónicas de las proteínas, tamaño de la molécula, solubilidad, propiedades superficialmente activas o interacciones hidrofóbicas. Preferentemente, la recuperación de la fracción enzimática se lleva a cabo en condiciones, cuando la temperatura es de 70 °C o inferior.

En un ejemplo, la fracción de proteína en el sobrenadante se enriquece al menos 1 vez (1x), normalmente al menos 2 veces (2x), preferentemente al menos 3 veces (3x). En otros ejemplos, la fracción de proteína en la fase acuosa del cultivo de microorganismos o en el sobrenadante se enriquece al menos 5 veces, en algunas realizaciones al menos 10 x, o 20 x o 30 x, o 40 x, o 50 x, o 60 x, o 70 x, u 80 x, o 90 x, o 100 x calculado como la actividad enzimática por volumen y /o por proteína total.

Es más, en algunas realizaciones, el sobrenadante puede diluirse antes de su uso en el proceso integrado.

15 Producción de biocombustibles a partir de lípidos

"Biocombustible" se refiere a combustible sólido, líquido o gaseoso derivado principalmente de biomasa o biorresiduos y es diferente de los combustibles fósiles, que se derivan de los restos orgánicos de plantas y animales prehistóricos.

20 De acuerdo con la directiva de la UE 2003/30/UE, "biodiésel" se refiere a un éster metílico producido a partir de aceite vegetal o aceite animal, de calidad diésel para su uso como biocombustible. De manera más amplia, biodiésel se refiere a ésteres de alquilo de cadena larga, tal como metilo, ésteres etílicos o propílicos, a partir de aceite vegetal o aceite animal de calidad diésel. El biodiésel también se puede producir a partir de lípidos de microorganismos, por lo que el lípido de un microorganismo puede originarse a partir de una bacteria, un hongo (una levadura o un moho), un alga u otro microorganismo.

30 "Diésel renovable" se refiere a un combustible que se produce mediante un tratamiento con hidrógeno de los lípidos de origen animal, vegetal o de microorganismos, o sus mezclas, por lo que el lípido de un microorganismo puede originarse a partir de una bacteria, un hongo (una levadura o un moho), un alga u otro microorganismo. El diésel renovable también se puede producir a partir de ceras derivadas de biomasa por gasificación y síntesis de Fischer-Tropsch. Opcionalmente, además del tratamiento con hidrógeno, se puede realizar la isomerización u otras etapas de procesamiento. El proceso de diésel renovable también se puede utilizar para producir combustible para aviones y/o gasolina. La producción de diésel renovable se ha descrito en las publicaciones de patente EP 1396531, EP1398364, EP 1741767 y EP1741768.

35 El biodiésel o el diésel renovable pueden mezclarse con combustibles fósiles. Aditivos adecuados, tales como conservantes y antioxidantes pueden añadirse al producto combustible.

40 "Lubricante" se refiere a una sustancia, tal como grasa, lípido o aceite, que reduce la fricción cuando se aplica como un recubrimiento de superficie a las piezas móviles. Otras dos funciones principales de un lubricante son la eliminación de calor y la disolución de impurezas. Las aplicaciones de los lubricantes incluyen, pero sin limitaciones, usos en motores de combustión interna como aceites de motor, aditivos en combustibles, en dispositivos accionados por aceite como bombas y equipos hidráulicos, o en diferentes tipos de cojinetes. Por lo general, los lubricantes contienen un 75-100 % de aceite base y el resto son aditivos. Los aditivos adecuados son, por ejemplo, detergentes, estabilizadores de almacenamiento, antioxidantes, inhibidores de la corrosión, desempañadores, demulsionantes, agentes antiespumantes, codisolventes y aditivos lubricantes (véase, por ejemplo, el documento US 7.691.792). El aceite base para lubricante puede provenir de aceite mineral, aceite vegetal, aceite animal o de una bacteria, hongos (una levadura o un moho), un alga u otro microorganismo. El aceite base también puede proceder de ceras derivadas de biomasa por gasificación y síntesis de Fischer-Tropsch. El índice de viscosidad se utiliza para caracterizar el aceite base. Normalmente se prefiere un índice de viscosidad alto.

55 Los lípidos producidos de acuerdo con el método descrito en la presente invención pueden usarse como materia prima para la producción de biodiésel, diésel renovable, combustible para aviones o gasolina. El biodiésel consiste en ésteres metílicos de ácidos grasos y normalmente se produce por transesterificación. En la transesterificación, los acilglicerolos se convierten en ésteres alquílicos (metílicos, etílicos o propílicos) de ácidos grasos de cadena larga. El diésel renovable se refiere al combustible que se produce mediante el tratamiento con hidrógeno (desoxigenación, hidrogenación o hidropocesamiento) de los lípidos. En el tratamiento de hidrógeno, los acilglicerolos se convierten en los correspondientes alcanos (parafinas). Los alcanos (parafinas) pueden modificarse aún más por isomerización o por otras alternativas de proceso. El proceso de diésel renovable también se puede utilizar para producir combustible para aviones y/o gasolina. De manera adicional, el craqueo de lípidos se puede realizar para producir biocombustibles. Adicionalmente, los lípidos se pueden usar como biocombustibles directamente en ciertas aplicaciones.

65 Los lípidos producidos con el método se pueden usar como aceites base para lubricantes (aceites lubricantes) o como materia prima para la producción de aceites base para lubricantes. El término "lípido" se refiere a una sustancia grasa, cuya molécula generalmente contiene, como una parte, una cadena de hidrocarburo alifática, que se disuelve en disolventes orgánicos no polares pero es poco soluble en agua. Los lípidos son un grupo esencial de moléculas

grandes en células vivas. Los lípidos son, por ejemplo, grasas, aceites, ceras, ésteres de cera, esteroides, terpenoides, isoprenoides, carotenoides, polihidroxicanoatos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos, fosfolípidos, glucolípidos, esfingolípidos y acilglicerol.

- 5 El término "acilglicerol" se refiere a un éster de glicerol y ácidos grasos. Los acilglicerol se producen naturalmente como grasas y aceites grasos. Los ejemplos de acilglicerol incluyen triacilglicerol (TAG, triglicéridos), diacilglicerol (diglicéridos) y monoacilglicerol (monoglicéridos).

Recuperación de aceite

- 10 Los microorganismos que contienen lípidos pueden separarse del medio de cultivo por cualquier método conocido, como el uso de técnicas de filtración o decantación. Como alternativa, se puede utilizar centrifugación con centrifugas comerciales a escala industrial de gran capacidad de volumen para separar los productos deseados.

- 15 Los aceites, o precursores de aceites, pueden recuperarse de biomasa celular o caldo de cultivo utilizando cualquier método conocido en la técnica o desarrollado en el futuro. Dichos métodos, incluyen, pero sin limitaciones, extracción con disolventes orgánicos. Las células de los microorganismos pueden romperse para facilitar la separación del aceite y otros componentes. Se puede utilizar cualquier método conocido para la rotura celular, tal como ultrasonidos, choque osmótico, fuerza cortante mecánica, prensa en frío, choque térmico, autólisis catalizada por enzimas o autodirigida.

- 20 El residuo celular extraído del aceite se puede utilizar para la producción de energía, por ejemplo quemados o tratados con procesos de digestión anaeróbica, o utilizados como alimento para animales. El residuo celular extraído con aceite, o una fracción del residuo celular, también se puede reciclar de nuevo a los bioprocesos para su uso como fuente de nutrientes.

- 25 Recuperación de alcoholes (etanol, butanol, ABE)

- La recuperación de etanol del caldo de fermentación se puede realizar por cualquier método. Tradicionalmente se utiliza destilación. Cuando se utiliza la destilación como tecnología de separación de productos alcohólicos, es posible obtener ahorros combinando los procesos de la unidad de recuperación de producto, tal como destilación para el proceso de producción de alcohol y la extracción de aceite para el proceso de producción de lípidos, incluida la regeneración del disolvente de extracción de aceite, energéticamente juntos. Los procesos de recuperación pueden regenerar el calor del proceso que puede utilizarse en otro proceso unitario en la integración de la producción, tal como en el enriquecimiento o la concentración de hidrolizados o en otros fines.

- 35 Los alcoholes del proceso de producción de alcohol anaeróbico pueden usarse opcionalmente como solvente de extracción posiblemente junto con otros disolventes en la extracción de lípidos de células microbianas. Por ejemplo, el etanol del proceso de fermentación anaeróbica se usa junto con un disolvente no polar, tal como hexano para extraer lípidos de células ricas en aceite formadas en el proceso de producción de lípidos aeróbicos.

- 40 En la recuperación de alcoholes, en lugar de destilación, que destruye la actividad de la mayoría de las enzimas, incluso el alto vacío es durante la destilación, se pueden utilizar otros métodos tales como pervaporación o tecnología de membranas. La recuperación de alcohol se puede realizar con estos métodos a partir de caldo de fermentación que contiene enzimas activas y biomasa durante las últimas etapas de la fermentación en cascada o después de la fermentación por lotes. Esto permite mantener la actividad enzimática en medios de cultivo agotados o ligados a oligómeros de azúcar para recuperar, enriquecerlos para su reutilización, tal como reciclarlos al bioproceso de hidrólisis de biomasa lignocelulósica. Con la tecnología de membranas es posible controlar el tamaño molecular de las moléculas, tales como enzimas, para recuperación, enriquecimiento y reutilización. La recuperación y reutilización de enzimas puede mejorar la eficiencia y el rendimiento del producto en todo el sistema integrado para la producción de biocombustibles.

- A las etapas del proceso usando temperatura elevada, tales como las etapas destilación, se pueden añadir etapas de modificación, tal como modificación catalítica del agua de proceso e hidrólisis de amonio o ácidos débiles para la biomasa separada (aumentar el rendimiento, acelerar la fermentación).

- 55 Separación de butanol o ABE

- La recuperación de butanol y/o una mezcla de acetona-butanol-etanol del caldo de fermentación puede realizarse por cualquier método conocido o cualquier método desarrollado en el futuro. Tradicionalmente, el butanol se ha recuperado del caldo de fermentación de la fermentación ABE por destilación, que es intensivo en cuando a energía. Los métodos alternativos incluyen, pero sin limitaciones, cristalización por congelación del caldo de fermentación, extracción de gas, pervaporación, extracción de membrana, ósmosis inversa, adsorción o extracción líquido-líquido.

- 65 En la recuperación de productos del proceso de fermentación de alcohol, se pueden aplicar tecnologías que permiten el mantenimiento de una concentración de producto no inhibitorio y una alta productividad y alta densidad celular (concentración de biomasa celular). Por ejemplo, la recuperación de alcohol se puede realizar durante la fermentación

o a partir de una corriente de reciclado en una fermentación, o mediante cualquier otro método.

Se prefieren métodos de recuperación de productos tales que no destruyan la actividad de las enzimas hidrolíticas en el caldo de cultivo y, por lo tanto, permitan la reutilización de las enzimas.

5

Referencias

Baer SH, Blaschek HP, Smith TL. 1987. Effect of Butanol Challenge and Temperature on Lipid Composition and Membrane Fluidity of Butanol-Tolerant *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 2854-2861.

10

Fall R, Phelps P, Spindler D. 1984. Bioconversion of xylan to triglycerides by oil-rich yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*. 47:1130-1134.

Lin H, Chang W, Ding H-T, Chen X-J, Zhou Q-F, Zhao Y-Hu. 2010. Direct microbial conversion of wheat straw into lipid by a cellulolytic fungus of *Aspergillus oryzae* A-4 in solid-state fermentation. *Bioresource Technology* 101:7556-7562.

15

Lynd LR, van Zyl WH, McBride JE, Laser M. 2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: actualización. *Current Opinion in Biotechnology* 16:577-583. Suutari M, Liukkonen K, Laakso S. 1990. Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids. *Journal of General Microbiology* 136: 1469-1474.

20 Ejemplos

Las actividades enzimáticas en caldo de cultivo gastado de cultivos de hongos filamentosos productores de grasa se determinaron mediante pruebas de hidrólisis con celulosa pura y xilano como sustratos.

25 Métodos

Definición de azúcar:

Para definir la concentración de azúcar de una solución, la solución se transformó en una dilución adecuada que se filtró a través de 0,2 µm antes de un análisis por HPLC.

30

La columna utilizada en la definición de azúcar fue el intercambiador de iones Shodex Sugar SP 0810 en forma de plomo (en fase estacionaria). Las dimensiones de la columna fueron 8,0 mm (DI) x 300 mm. El eluyente fue agua (caudal de 0,6 ml/min) y la temperatura de la columna fue de 60 °C. El detector fue RI Shimadzu RID 10A y la bomba fue A6 y el automuestreador fue Shimadzu SIL 20A. El procesamiento de los resultados se realizó con el software Class-VP.

35

Análisis de ácidos grasos:

La composición de ácidos grasos de las muestras se determinó según el método descrito por Suutari *et al.* (1990). Los lípidos de las muestras se hidrolizaron primero en ácidos grasos libres, que se saponificaron en sales de sodio de los mismos y luego se metilaron en ésteres metílicos. Los ésteres metílicos de ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía de gases.

40

45 Análisis de concentración de proteínas:

La concentración de proteína de los caldos de cultivo se analizó después de la filtración del caldo a través de papel de filtro Whatman3. La concentración de proteínas se analizó de acuerdo con el ensayo de proteínas Bio-Rad (basado en el método de Bradford).

50

Pruebas de hidrólisis:

El caldo de cultivo se filtró a través de papel de filtro Whatman3 antes de la prueba de hidrólisis.

55

La actividad de xilanasa se determinó como sigue. Se utilizó un matraz Erlenmeyer de 100 ml como recipiente de reacción. Se llenó con 20 ml de solución de xilano de madera de abedul al 1 % (Sigma) en tampón de fosfato (0,02 M, pH 5) como sustrato, 10 ml de caldo de cultivo filtrado y 20 ml de tampón fosfato (0,02 M, pH 5). La reacción de hidrólisis se realizó en un baño de agua agitado (140 rpm) a 50 °C. Se tomaron muestras de 1 ml del recipiente de reacción directamente después de la adición del caldo de cultivo y después de 1, 3, 5, 21/23 horas. La reacción de hidrólisis se detuvo en la muestra de 1 ml disminuyendo el pH mediante la adición de 50 µl de ácido sulfúrico 1,33 M. Los azúcares liberados se analizaron por HPLC (ver Definición de azúcar) con manitol como patrón.

60

La actividad de celulasa se determinó con 1 g de papel de filtro Whatman como sustrato de celulosa en lugar de xilano. El volumen de reacción fue de 50 ml que contenían 1 g de papel de filtro Whatman en círculos de igual tamaño (aprox. 5 mm de diámetro) como sustrato, 10 ml de caldo de cultivo filtrado y 40 ml de tampón fosfato (0,02 M, pH 5). Por lo demás, el experimento se realizó como con xilano.

65

Cepas de microorganismos:

5 Los microorganismos productores de lípidos están disponibles para el público a partir de una pluralidad de colecciones de cultivos microbianos reconocidas, tales como ATCC, DSM, etc. Varias realizaciones de la invención se tratan en los siguientes ejemplos usando cepas de microorganismos como sigue. *Aspergillus oryzae* DSM 1861, *Arroz Aspergillus* DSM 1864 y *Aspergillus terreus* DSM 1958.

Ejemplo 1

10 Este ejemplo muestra la actividad enzimática formada en el caldo de cultivo durante el cultivo de *Aspergillus oryzae* con material a base de celulosa como fuente de carbono para la producción de lípidos.

15 *Aspergillus oryzae* se cultivó para la producción de lípidos en diferentes materiales de lignocelulosa a base de celulosa. La base del medio de cultivo contenía por litro de agua 40 g de material lignocelulósico como fuente de carbono, 0,5 g de extracto de levadura, 1 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g de K_2HPO_4 , 1 g de KH_2PO_4 y 0,2 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ y se complementó con fuente de nitrógeno y metales traza.

20 Los experimentos 1-4 se realizaron como cultivos en matraz. En los experimentos 1-3, la base del medio se complementó con 3 g de $NaNO_3$ y 0,02 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ por litro y en el experimento 4 se complementó el medio base con 1 g de $(NH_4)_2SO_4$ por litro. Se realizaron cultivos paralelos en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50-100 ml de medio de cultivo. Los medios de cultivo se inocularon con 1 % (v/v) de suspensión de esporas de *Aspergillus oryzae*. Los cultivos se incubaron a 28 °C de temperatura en agitador orbital (160 rpm) durante 6 días.

25 Los experimentos 5-6 se realizaron como fermentaciones en biorreactor.

30 En el experimento 5 se complementó el medio de cultivo base con 6,5 g de peptona, 0,00015 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,0001 g de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ y 0,00625 g de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ por litro base de medio de cultivo. La fuente de carbono fue celulosa que se añadió al cultivo para dar una concentración final de 55 g/l. Para la inoculación, se preparó una suspensión de esporas aplicando un total de 24 ml de agua estéril en dos cultivos en placas de Petri PDA de *A. oryzae* en esporulación. Las esporas se suspendieron con un esparcidor y se inoculó 1 l de medio de cultivo con la suspensión. La fermentación se realizó a 28 °C de temperatura con 0,6 l/min de aireación y 350-450 rpm de agitación. El pH del cultivo fue de 5,7 y se ajustó con NaOH 3M durante el cultivo. Las actividades enzimáticas se determinaron después de 233 horas de incubación.

35 En el experimento 6, la base del medio de cultivo se complementó con 1,46 g de peptona, 0,00015 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,0001 g de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ y 0,00625 g de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ por litro. La fuente de carbono fue celulosa que se añadió al cultivo para dar una concentración final de 50 g/l. El medio de cultivo se inoculó con 50 ml de suspensión de *Aspergillus oryzae* precultivada durante 48 horas. La fermentación se realizó en un volumen de medio de cultivo de 1 L a una temperatura de 28 °C con una aireación de 0,8 l/min y una agitación de 350-450 rpm. El pH del cultivo fue de 5,7 y se ajustó con NaOH 3M durante el cultivo. Las actividades enzimáticas se determinaron después de 188 horas de incubación.

45 Los caldos de cultivo se separaron y se ensayaron la concentración de proteína y la actividad de xilanasas y celulasas como se ha descrito anteriormente.

Tabla 1. La fuente de nitrógeno y carbono, el volumen de cultivo, así como la concentración de proteína determinada.

Exp.	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	Volumen de cultivo (ml)	Concentración de proteína (mg/ml)
1	Pañuelos de mano ¹ , molidos con un molinillo pulverizador Fritsch	$NaNO_3$	50	0,19
2	SolkaFloc (celulosa purificada)	$NaNO_3$	100	0,11
3	Celulosa ² , tratado por trituración de Wiley, Tamiz alpino 0.3, Tamiz alpino 0.2	$NaNO_3$	100	0,06
4	Harina de abedul (molida con un Görgens Turborotor)	$(NH_4)_2SO_4$	100	0,18
5	Celulosa ² , mismo trato que en el exp. 3	Peptona	1000	0,49 ³

(continuación)

Exp.	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	Volumen de cultivo (ml)	Concentración de proteína (mg/ml)
6	Celulosa ² , mismo trato que en el exp. 3	Peptona/(NH ₄) ₂ SO ₄	1000	0,11

¹ Pañuelo Lotus Professional Hand Standard, materia prima de fibra: fibra reciclada, Georgia-Pacific Nordic.
² UPM, Wisabetula, Sulfato de madera dura blanqueada de abedul 790388 15-04-2008 Wisapulp. Hemicelulosa aprox. 15 %.
³ Caldo concentrado tres veces por ultrafiltración (filtro de 10 000 Da en una celda de ultrafiltración agitada Amicon Ultra 8200 de Millipore)

En el experimento 6, se midió que el contenido de lípidos era del 4 %.

- 5 El azúcar liberado durante las pruebas de hidrólisis como miligramo por mililitro de caldo de cultivo y miligramo por miligramo de proteína en función del tiempo se presenta en las Figuras 7 a 10. La figura 7 muestra la xilosa liberada en la prueba de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato se utilizaron 200 mg de xilano de madera de abedul. La figura 8 muestra la xilosa liberada en la prueba de hidrólisis por proteína. Como sustrato se utilizaron 200 mg de xilano de madera de abedul. La figura 9 muestra la glucosa liberada en las pruebas de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato se utilizó 1 g de celulosa. La figura 10 muestra la glucosa liberada en la prueba de hidrólisis por proteína. Como sustrato se utilizó 1 g de celulosa.

15 Los seis caldos de cultivo probados de los cultivos mostraron una actividad de xilanasa significativa. Solo tres de los seis caldos de cultivo mostraron signos de actividad de celulasa, lo que indica una capacidad débil para producir estas enzimas en condiciones específicas.

Este ejemplo muestra que *Aspergillus oryzae* puede producir enzimas lignocelulolíticas en el caldo de cultivo. El ejemplo muestra que *A. oryzae* puede tener actividad de degradación tanto de xilano como de celulosa.

20 La producción de enzimas degradaba selectivamente el xilano en la mayoría de los casos, tres de los cultivos mostraron actividad de celulasa débil La reutilización de enzimas hidrolíticas producidas por *A. oryzae* en la producción de lípidos puede reducir la cantidad de enzimas comerciales necesarias en la hidrólisis de lignocelulosa o fracciones de la misma.

25 Ejemplo 2

Este ejemplo muestra la actividad enzimática formada en el caldo de cultivo durante el cultivo de *Aspergillus terreus* con material a base de hemicelulosa como fuente de carbono para la producción de lípidos.

30 *Aspergillus terreus* se cultivó para la producción de lípidos en hemicelulosa de paja de trigo como sustrato de carbono en un volumen de 2 litros en un biorreactor. El medio de cultivo comprendía 50 ml de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y sulfato de amonio (Difco) 10 x solución madre suspendida en 2 l de agua y suplementada con por litro: 1,0 g de extracto de levadura, 1 g de (NH₄)₂SO₄, 1 g de MgSO₄·7H₂O, 0,5 g de K₂HPO₄, 1 g de KH₂PO₄, 0,2 g de CaCl₂·2H₂O y 2 g de celulosa. El medio de cultivo se inoculó con 150 ml de cultivo de *A. terreus* precultivado durante 35 24 horas. La fermentación se realizó a 35 °C de temperatura con 3,0 l/min de aireación y 200-4 30 rpm de agitación. El pH del cultivo fue de 5,7 y se ajustó con NaOH 3M durante el cultivo. Durante el cultivo, se alimentó solución de hemicelulosa al fermentador. Las actividades enzimáticas se determinaron después de 165 horas de incubación.

40 El caldo de cultivo se separó y se concentró parcialmente por ultrafiltración en una celda de ultrafiltración agitada Amicon con filtro de 10 000 Da (Millipore). La concentración de proteínas y lípidos y la actividad de xilanasa y celulasa se ensayaron como se ha descrito anteriormente.

45 El contenido de lípidos en la biomasa que contiene micelio fúngico, la hemicelulosa residual y la celulosa fue del 15 % por peso seco. La concentración de proteína fue de 0,72 mg/ml en el caldo de cultivo no concentrado y de 2,15 mg/ml en el caldo concentrado.

50 El azúcar liberado durante las pruebas de hidrólisis como miligramo por mililitro de caldo de cultivo y miligramo por miligramo de proteína en función del tiempo se presenta en las figuras 11 a 14. La figura 11 muestra la xilosa liberada en la prueba de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato se utilizaron 200 mg de xilano de madera de abedul. La figura 12 muestra la xilosa liberada en la prueba de hidrólisis por proteína. Como sustrato se utilizaron 200 mg de xilano de madera de abedul. La figura 13 muestra la glucosa liberada en las pruebas de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato se utilizó 1 g de celulosa. Se liberó algo de xilosa de la hemicelulosa procedente del caldo de cultivo utilizado. La figura 14 muestra la glucosa liberada en la prueba de hidrólisis por proteína. Como sustrato se utilizó 1 g de celulosa. Se liberó algo de xilosa de la hemicelulosa procedente del caldo de cultivo utilizado.

Este ejemplo indica que *Aspergillus terreus* puede producir tanto lípidos intracelularmente como enzimas hidrolíticas en el caldo de cultivo. El ejemplo muestra que *A. terreus* producir enzimas y excretarlas al medio de crecimiento, que tienen actividad de degradación tanto de xilano como de celulosa. Esta enzima se puede separar, concentrar y utilizar en la hidrólisis de material lignocelulósico, tal como material que contiene celulosa polimérica y/o hemicelulosa. La reutilización de enzimas producidas por *A. terreus* en la producción de lípidos puede reducir la cantidad de enzimas comerciales necesarias en la hidrólisis de lignocelulosa o fracciones de la misma.

Ejemplo 3

El ejemplo muestra la integración de la producción de etanol con la producción de lípidos. El etanol se produce a partir de celulosa hidrolizada por enzimas en medio de cultivo gastado obtenido de la producción de lípidos por moho.

En el Ejemplo 3 se demostró que el medio de cultivo gastado del cultivo y la producción de lípidos de *Aspergillus terreus* en hemicelulosa de paja de trigo suplementada con celulosa contienen enzimas, xilanasas y celulasas capaces de hidrólisis de materiales lignocelulósicos.

El medio de cultivo gastado se utiliza en este cultivo para hidrolizar celulosa. Se añade celulosa pura o celulosa de paja de trigo al medio de cultivo agotado, tratado por ultrafiltración en una celda de ultrafiltración agitada Amicon con un filtro de 10 000 Da (Millipore), del cultivo y la producción de lípidos de *A. terreus* sobre hemicelulosa de paja de trigo suplementada con celulosa. La solución se incuba a 30 - 70 °C durante 16 - 200 h para la sacarificación de la celulosa. Después de la sacarificación, se añaden nutrientes (NH₄)₂HPO₄ (0,5 g/l), MgSO₄·7 H₂O (0,025 g/l) y extracto de levadura (1,0 g/l) a la solución y se inocula la solución con levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* se cultiva de 48 a 120 horas a 36 °C manteniendo el pH entre 5,0 y 6,5 en anaerobiosis. Después del cultivo (fermentación), las células se eliminan del medio de cultivo mediante filtración a través de un filtro de 0,2 µm o 0,45 µm y/o mediante centrifugación a 5000xg durante 5 minutos. La concentración de etanol del medio de cultivo se puede medir mediante cromatografía de gases o cromatografía líquida como HPLC.

Ejemplo 4

El ejemplo muestra la integración de procesos de producción de acetona-etanol-butanol (ABE) y lípidos. El ABE se produce a partir de hemicelulosa de paja de trigo y/o celulosa hidrolizada por enzimas en medio de cultivo gastado obtenido de la producción de lípidos por moho.

La hemicelulosa y/o fracción de paja de trigo se divide en dos fracciones. Una fracción se utiliza para producir lípidos por el moho *A. terreus* como se describe en el ejemplo 3. Otra fracción se utiliza para producir ABE con bacterias *Clostridium acetobutylicum*.

En el Ejemplo 3 se demostró que el medio de cultivo gastado del cultivo y la producción de lípidos de *Aspergillus terreus* en hemicelulosa de paja de trigo suplementada con celulosa contienen enzimas, xilanasas y celulasas capaces de hidrólisis de materiales lignocelulósicos.

El medio de cultivo gastado se utiliza en este cultivo para hidrolizar hemicelulosa de trigo. Se añade hemicelulosa de paja de trigo al medio de cultivo agotado, tratado por ultrafiltración en una celda de ultrafiltración agitada Amicon con un filtro de 10 000 Da (Millipore), del cultivo y la producción de lípidos de *A. terreus* sobre hemicelulosa de paja de trigo suplementada con celulosa. La solución se incuba a 30 - 70 °C durante 16 - 200 h para la sacarificación de la hemicelulosa. Después de la sacarificación, se añade extracto de levadura (1,0 g/l) a la solución y la solución se esteriliza a 121 °C durante 15 min. Después de esterilizar y enfriar a temperatura ambiente, se añaden minerales, tampón y vitaminas al medio, por ejemplo, de acuerdo con el medio P2 que se describe en Baer *et al.* (1987). El medio se coloca en una botella o frasco anaeróbico y se inocula con bacterias *Clostridium acetobutylicum*. El cultivo se incuba de 34 a 90 horas a 35 °C manteniendo el pH entre 5,0 y 5,5. Después del cultivo (fermentación), las células se eliminan del medio de cultivo mediante filtración a través de un filtro de 0,2 µm o 0,45 µm y/o mediante centrifugación a 5000xg durante 5 minutos. Las concentraciones de acetona, butanol y etanol del medio de cultivo se pueden medir mediante cromatografía de gases o cromatografía líquida como HPLC.

Ejemplo 5

Este ejemplo muestra la actividad enzimática formada en el caldo de cultivo durante el cultivo de *Aspergillus oryzae* con material a base de hemicelulosa como fuente de carbono para la producción de lípidos.

Aspergillus oryzae se cultivó para la producción de lípidos en hemicelulosa de paja de trigo como sustrato de carbono en un volumen de 2 litros en un biorreactor. El medio de cultivo comprendía 50 ml de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y sulfato de amonio (Difco) 10 x solución madre suspendida en 2 l de agua y suplementada con por litro: 1,0 g de extracto de levadura, 1 g de (NH₄)₂SO₄, 1 g de MgSO₄·7H₂O, 0,5 g de K₂HPO₄, 1 g de KH₂PO₄, 0,2 g de CaCl₂·2H₂O.

5 El medio de cultivo se inoculó con 200 ml de cultivo de *A. oryzae* precultivado 72 horas. La fermentación se realizó en un volumen de medio de cultivo de 2 l a una temperatura de 30 °C con una aireación de 3,0 l/min y una agitación de 200-410 rpm. El pH del cultivo fue de 5,7 y se ajustó con NaOH 3M durante el cultivo. Durante el cultivo, se alimentó solución de hemicelulosa al fermentador. Las actividades enzimáticas se determinaron después de 144 horas de incubación.

10 El caldo de cultivo se separó y se ensayaron la concentración de proteína y la actividad de xilanasas y celulasas como se ha descrito anteriormente. El contenido de lípidos en la biomasa contenía micelio fúngico y hemicelulosa residual al 21 % por peso seco. La concentración de proteína fue de 0,61 mg/ml en el caldo de cultivo no concentrado y de 1,65 mg/ml en el caldo concentrado.

15 El azúcar liberado durante las pruebas de hidrólisis como miligramo por mililitro de caldo de cultivo y miligramo por miligramo de proteína en función del tiempo se presenta en las figuras 12 a 15. La figura 12 muestra la xilosa liberada en la prueba de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato se utilizaron 200 mg de xilano de madera de abedul. La figura 13 muestra la xilosa liberada en la prueba de hidrólisis por proteína. Como sustrato se utilizaron 200 mg de xilano de madera de abedul. La figura 14 muestra la glucosa liberada en las pruebas de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato se utilizó 1 g de celulosa. Se liberó algo de xilosa de la hemicelulosa procedente del caldo de cultivo utilizado. La figura 15 muestra la glucosa liberada en la prueba de hidrólisis por proteína. Como sustrato se utilizó 1 g de celulosa. Se liberó algo de xilosa de la hemicelulosa procedente del caldo de cultivo utilizado.

20 Este ejemplo muestra que *Aspergillus oryzae* puede producir lípidos y como producto secundario un caldo de cultivo con actividades hidrolíticas que pueden reutilizarse en la hidrólisis de material lignocelulósico.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso integrado que comprende

- 5 - un primer proceso biotécnico, que produce lípidos a partir de una materia prima que comprende materiales lignocelulósicos y utiliza un hongo seleccionado de *Aspergillus* capaz de producir lípidos y enzimas, y
 - un segundo proceso biotécnico que utiliza un microorganismo, que produce alcohol(es) a partir de una materia prima que comprende materiales lignocelulósicos,

10 en donde el proceso comprende las etapas de

- cultivar dicho hongo y producir lípidos y enzimas,
 - opcionalmente, separar el sobrenadante y las células de microorganismos del cultivo de hongos,
 15 - separar lípidos del cultivo de hongos o de células de microorganismos,
 - introducir el cultivo de hongos, el sobrenadante o una fracción del sobrenadante enriquecida con proteínas o una dilución del sobrenadante que comprende enzima(s) catalíticamente activa(s) en el segundo o en el primer y el segundo proceso biotécnico, o el tratamiento de la materia prima del segundo proceso o del primer y el segundo proceso usando el cultivo de hongos, el sobrenadante o una fracción del sobrenadante enriquecida con proteínas o una dilución del sobrenadante que comprende enzima(s) catalíticamente activa(s).

20 2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los lípidos y alcoholes se recuperan utilizando un método que conserva la actividad catalítica de las enzimas, preferentemente enzimas hidrolíticas, en el sobrenadante.

25 3. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el alcohol comprende etanol, butanol, isopropanol-butanol-etanol y/o acetona-butanol-etanol.

30 4. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la materia prima que comprende materiales lignocelulósicos que se alimenta al proceso de producción de lípidos comprende al menos un 50 % de lignocelulosa o una fracción de lignocelulosa, que comprende preferentemente al menos un 10 % de azúcares poliméricos de la fracción de azúcar.

5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde al menos parte de la materia prima que comprende materiales lignocelulósicos alimentada al proceso de producción de lípidos comprende almidón.

35 6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el microorganismo en el primer proceso usa hemicelulosa, o celulosa, ambos o una mezcla de hemicelulosa y celulosa o fracciones de las mismas.

40 7. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el microorganismo en el segundo proceso usa hemicelulosa, o celulosa, ambos o una mezcla de hemicelulosa y celulosa o fracciones de las mismas.

8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde las enzimas comprenden exoenzimas, preferentemente enzimas asociadas a hemicelulosa y/o hidrólisis de celulosa.

45 9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde las enzimas comprenden hemicelulasas, xilanasas, mananasas, arabinasas, galactosidasas, glucosidasas, manosidasas, xilosidasas, arabinofuranosidasa, esterasas, celulasas, endocelulasas, exocelulasas, celobiasas o beta-glucosidasas, celulasas oxidativas o celulosa fosforilasa o cualquiera de sus mezclas.

50 10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde los microorganismos en el primer proceso biotécnico son capaces de producir tanto hemicelulasas como celulasas.

11. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la biomasa o parte de ella del primer proceso biotécnico se recicla al segundo proceso biotécnico.

55 12. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la biomasa o parte de ella, el sobrenadante y/o las enzimas del primer proceso biotécnico o parte del mismo se reciclan al primer proceso biotécnico.

60 13. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la biomasa, el sobrenadante y/o las enzimas del segundo proceso biotécnico o parte de él/ellas se reciclan de nuevo al primer proceso biotécnico.

65 14. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el agua de proceso o parte de ella del segundo proceso después de la separación del o de los alcoholes se recicla al agua de dilución de la materia prima del primer proceso biotécnico y/o del segundo proceso biotécnico, preferentemente al primer proceso biotecnológico.

15. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde los lípidos producidos en el

proceso se utilizan como biocombustible, como componente de biocombustibles o como materia prima para la producción de biocombustibles.

5 16. El proceso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el biocombustible es biodiésel o diésel renovable, gasolina y/o combustible para aviones.

10 17. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el o los alcoholes producidos en el proceso se utilizan como biocombustible, como componente de biocombustibles o como materia prima para la producción de biocombustibles.

18. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde las enzimas producidas en el proceso se usan en un proceso de producción de alcohol como preparación enzimática o como fuente de enzimas.

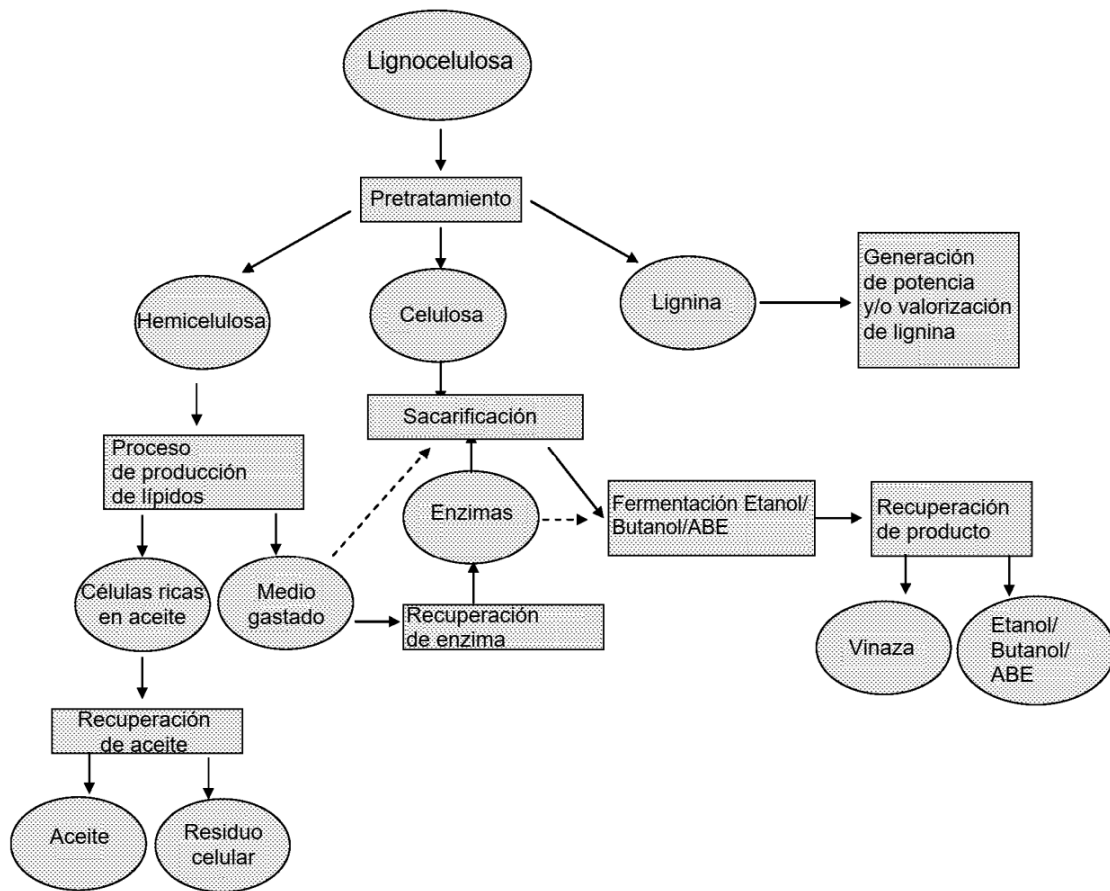


Fig 1.

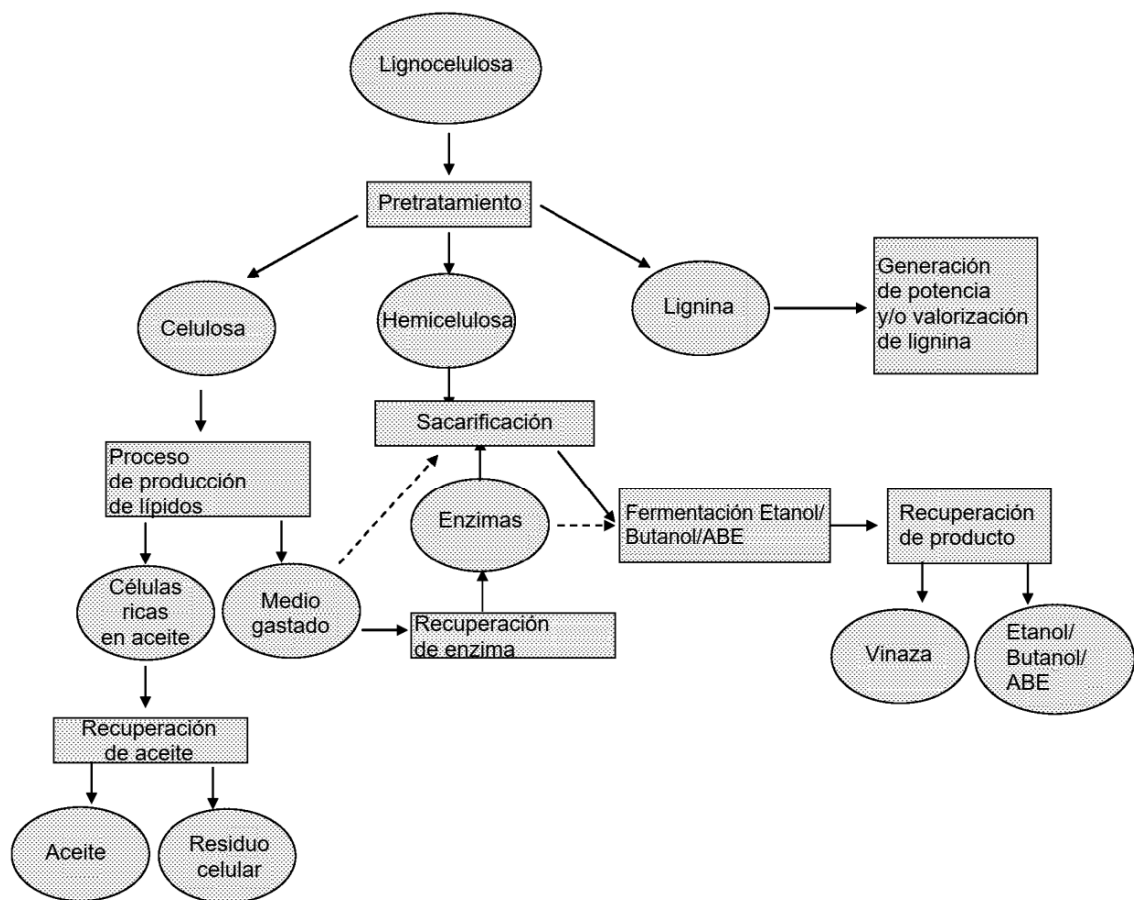


Fig 2.

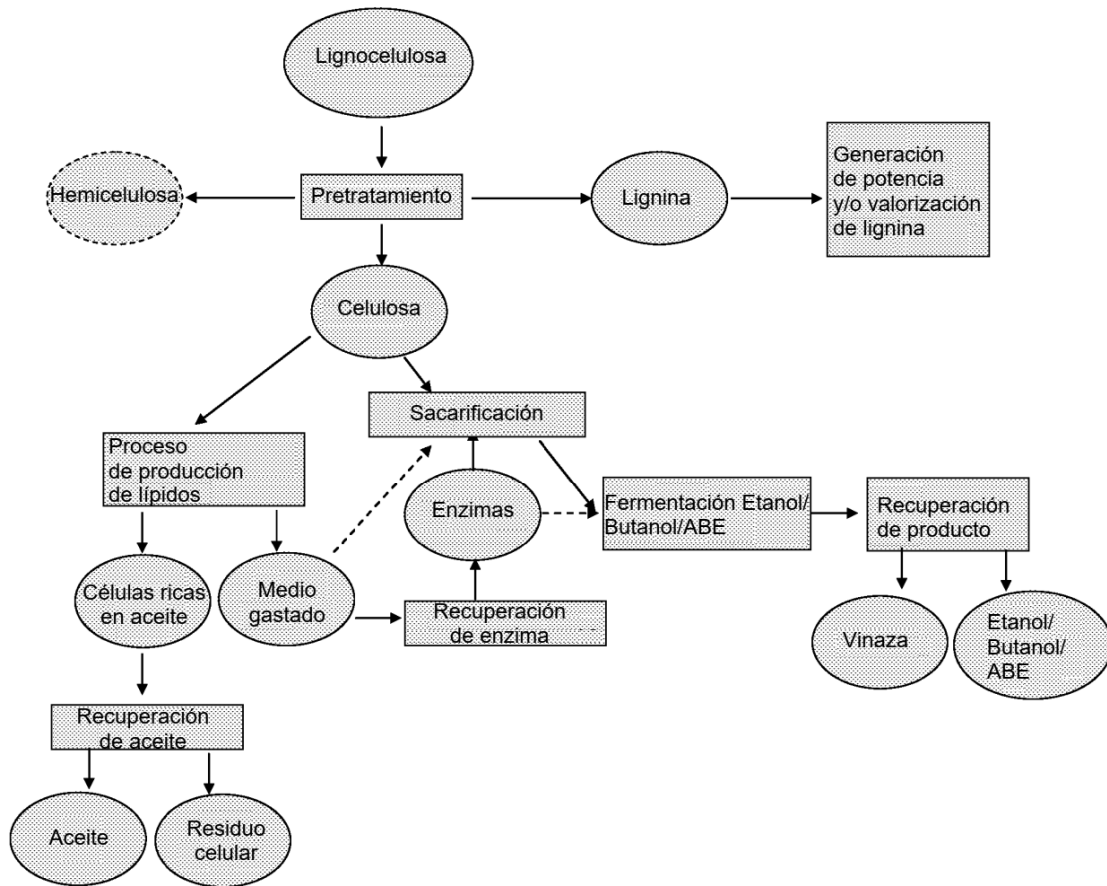


Fig 3.

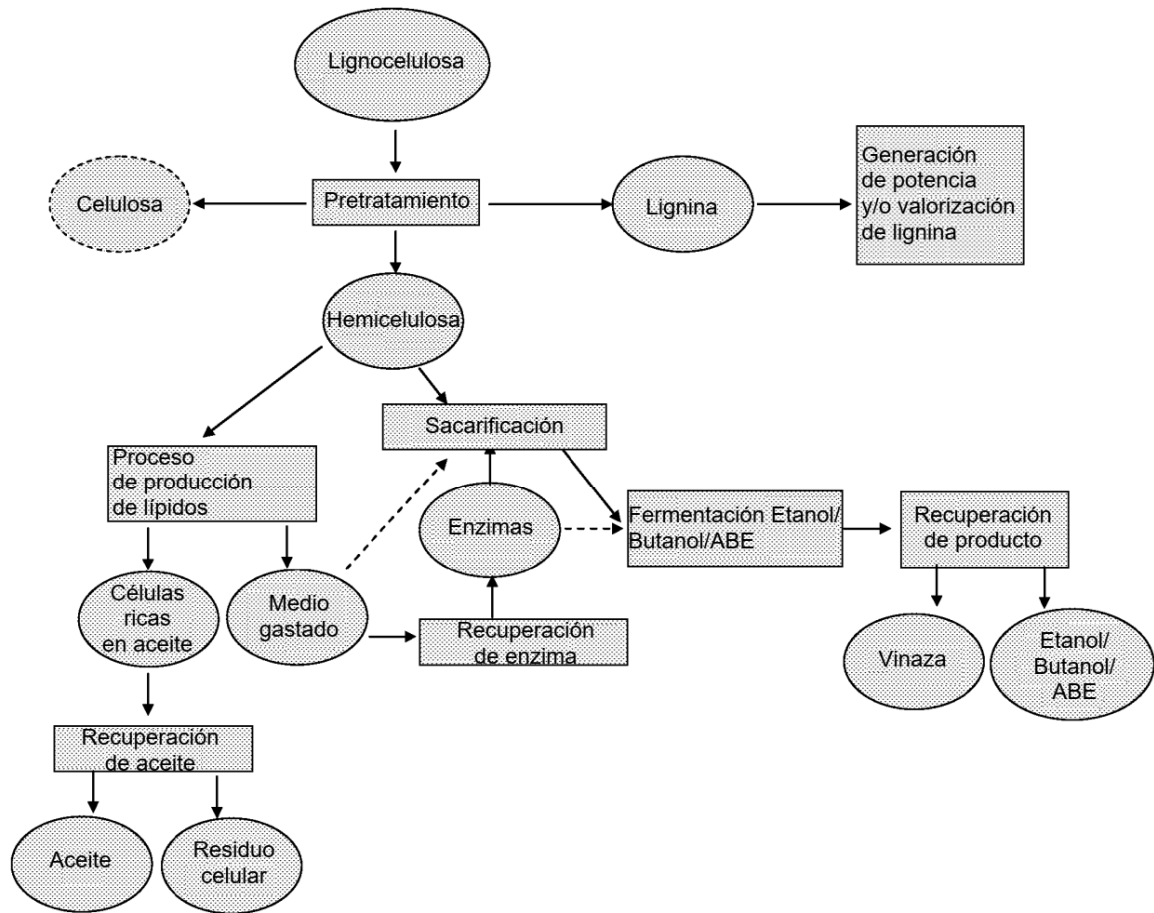


Fig. 4

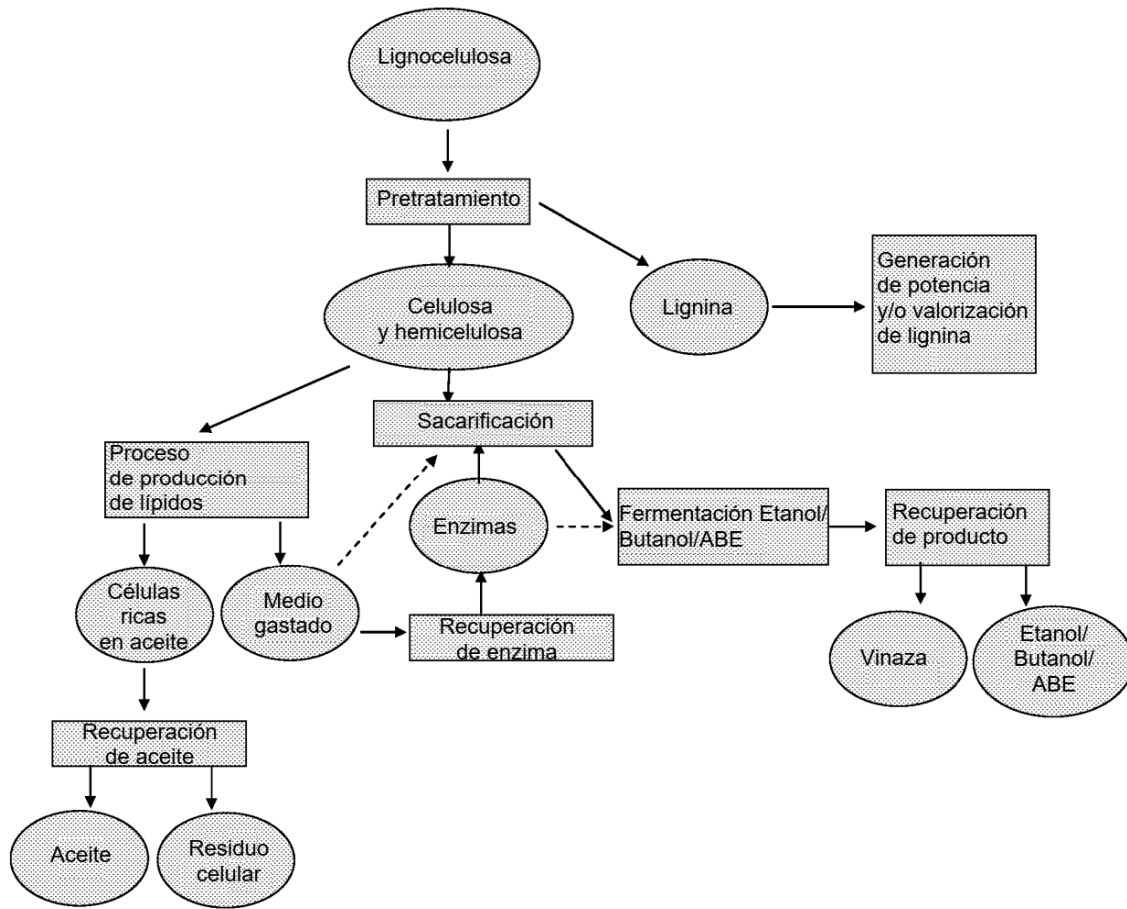


Fig 5.

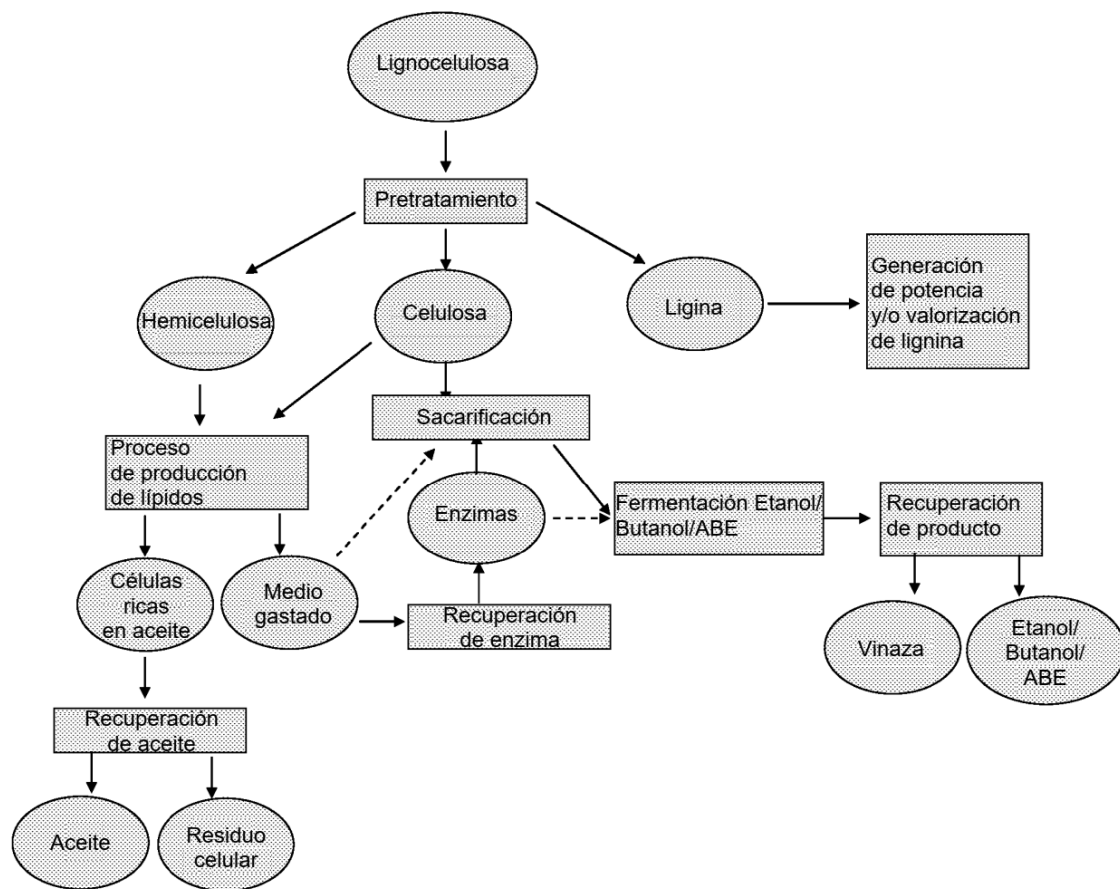


Fig 6.

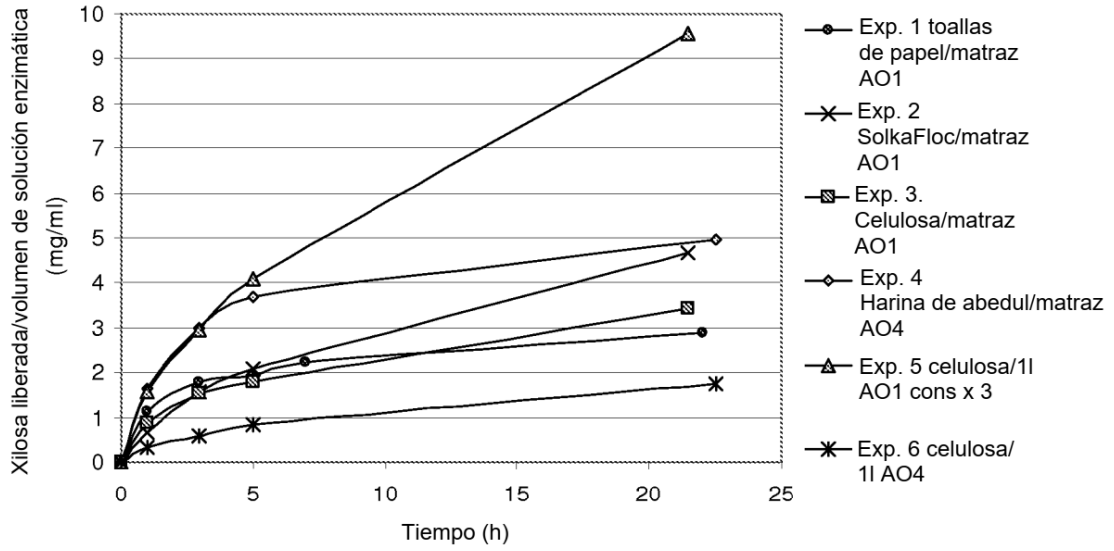


Fig. 7

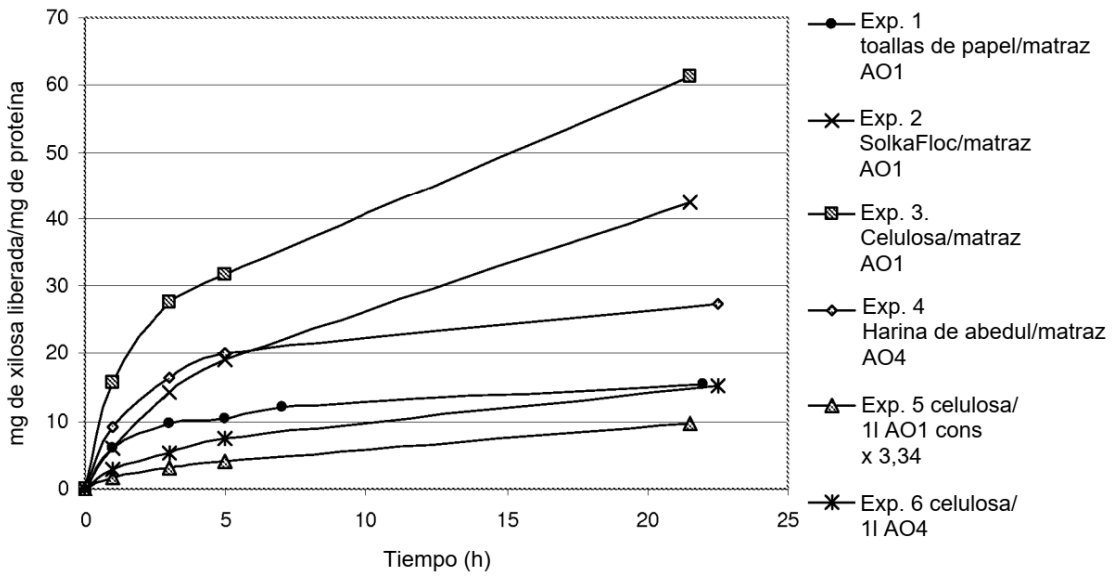


Fig.8

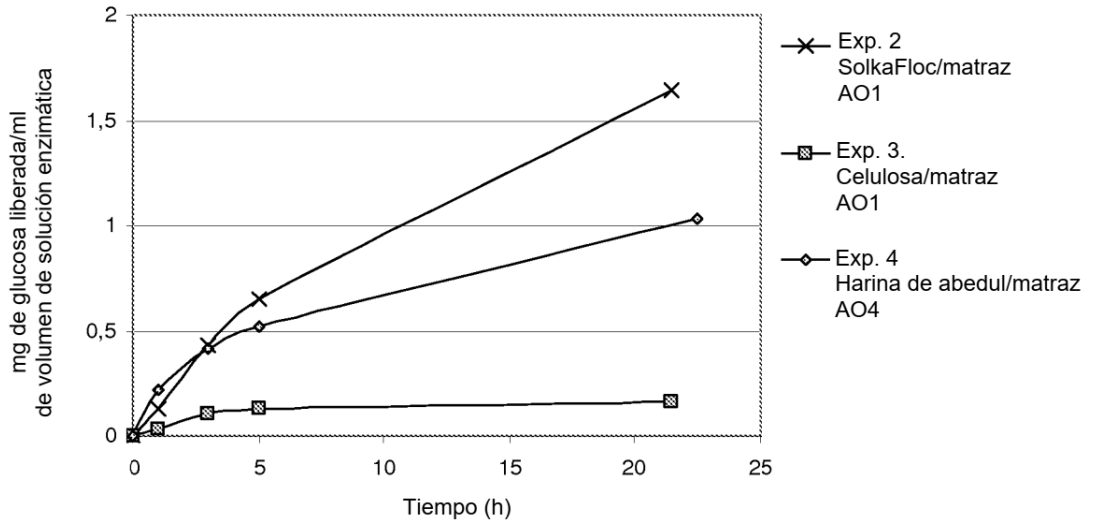


Fig. 9

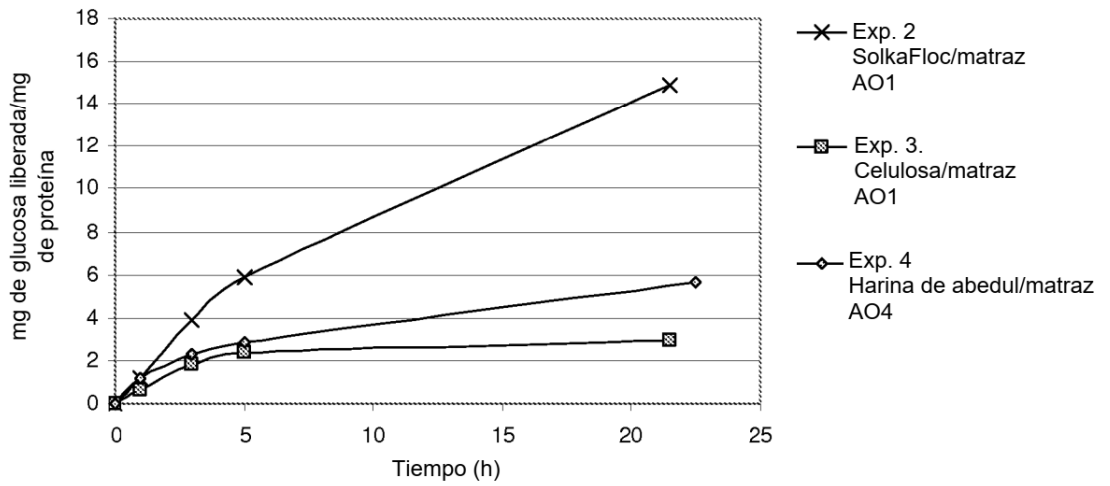


Fig. 10

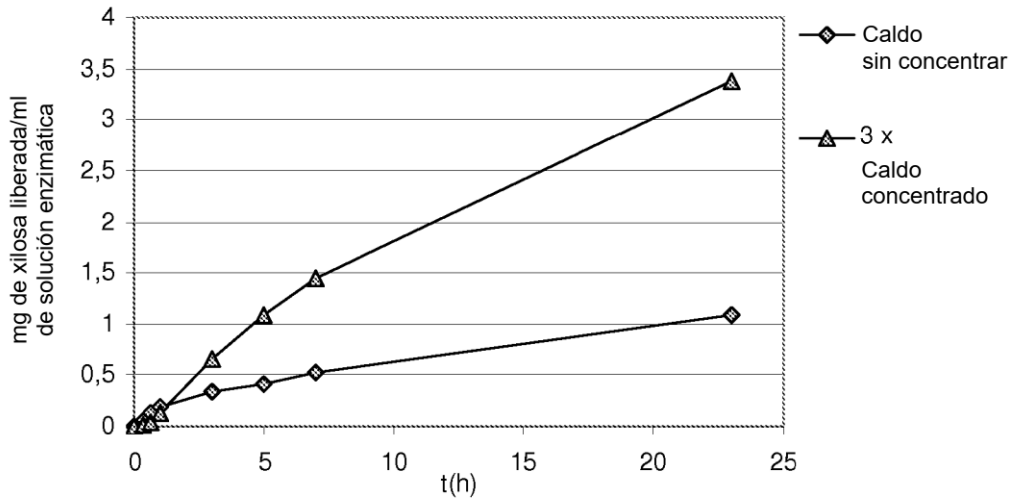


Fig. 11

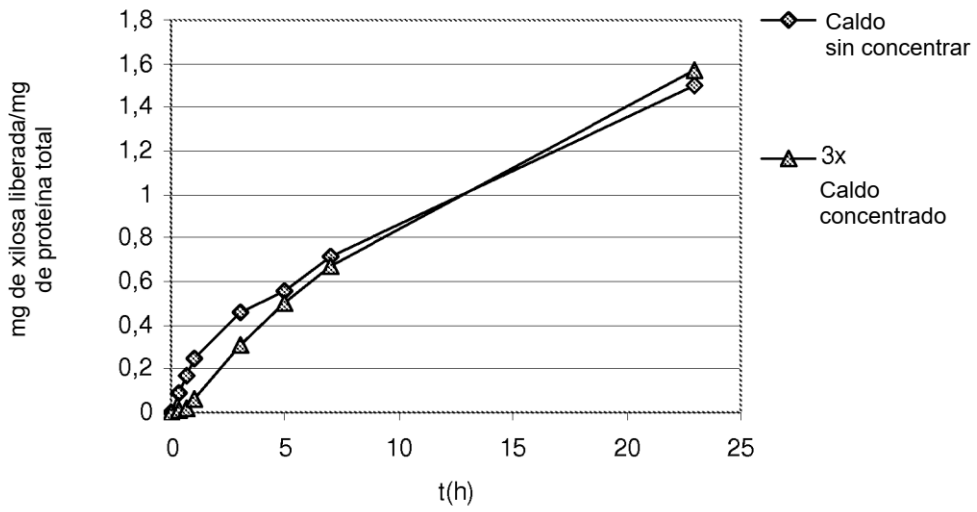


Fig. 12

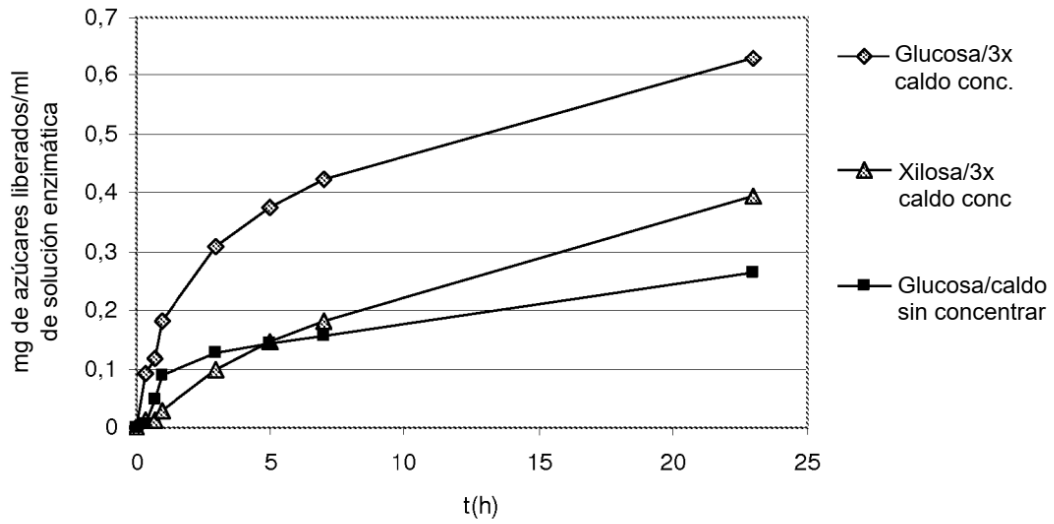


Fig. 13

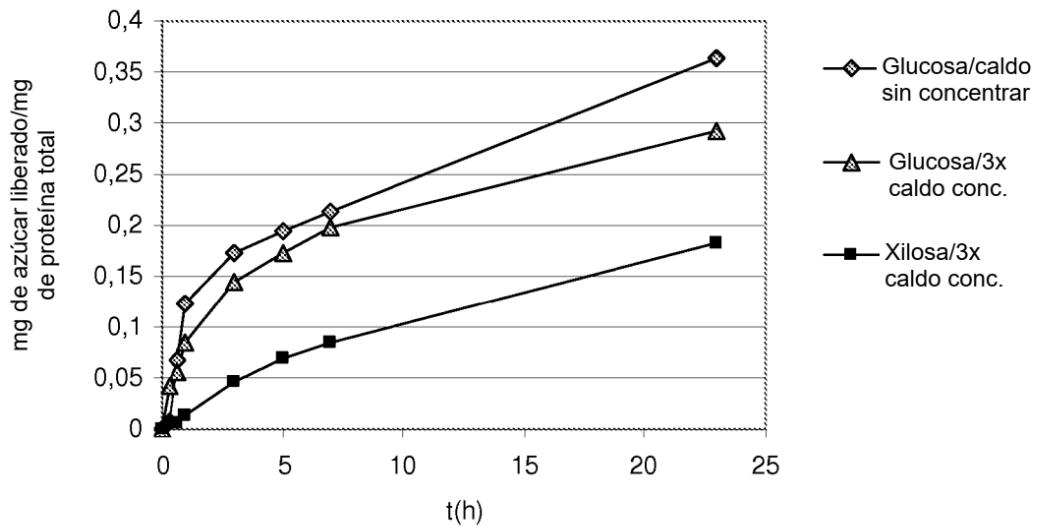


Fig. 14

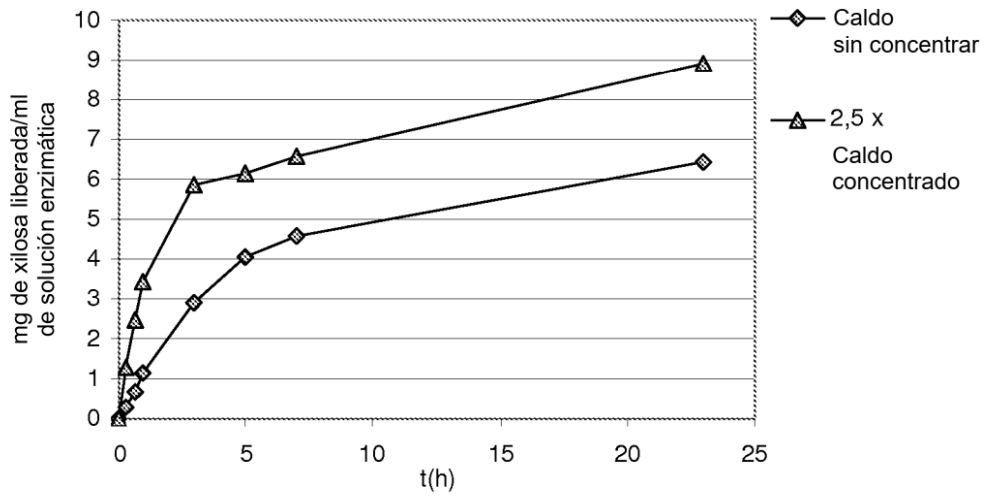


Fig. 15

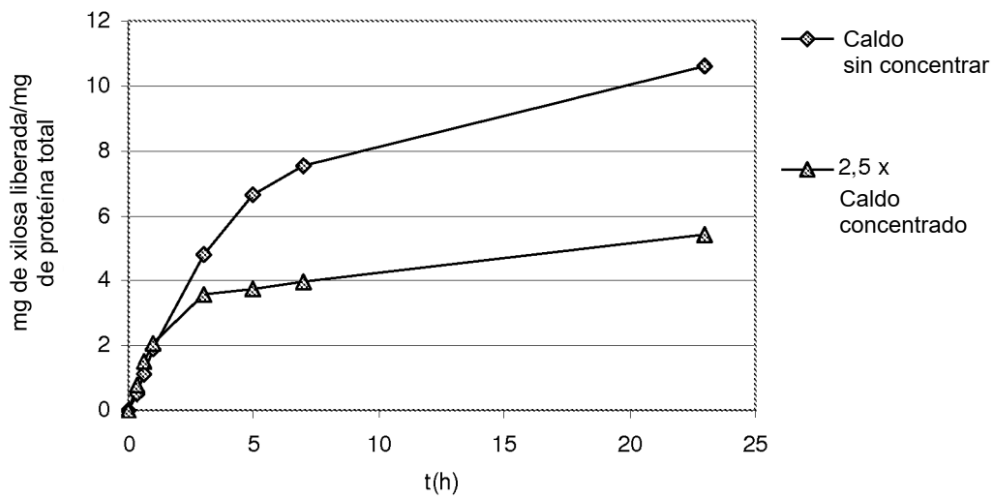


Fig. 16

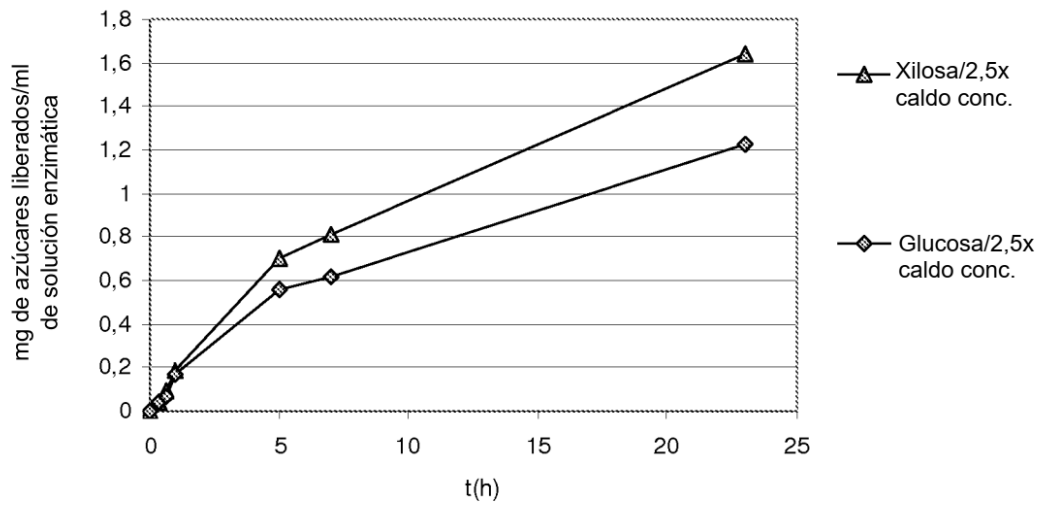


Fig. 17

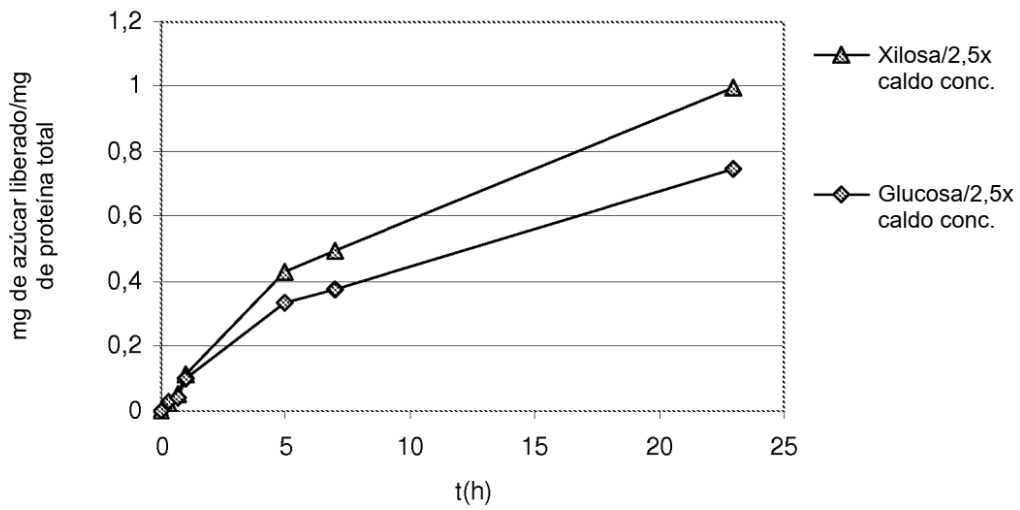


Fig. 18