

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 862 178**

51 Int. Cl.:

C13K 1/02	(2006.01)	C12P 19/14	(2006.01)
B01D 53/14	(2006.01)		
C01B 7/07	(2006.01)		
C12P 7/08	(2006.01)		
C12P 7/10	(2006.01)		
C13B 5/04	(2011.01)		
C13B 10/02	(2011.01)		
C13K 11/00	(2006.01)		
C13K 13/00	(2006.01)		
C12P 19/02	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2011** **E 18175599 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2020** **EP 3401410**

54 Título: **Métodos de producción de mezclas de azúcares**

30 Prioridad:

26.06.2010 US 35889410 P
08.07.2010 IL 20689610
29.07.2010 IL 20731310
06.02.2011 WO PCT/IL2011/000130
30.05.2011 US 201161491243 P
23.06.2011 US 201161500169 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.10.2021

73 Titular/es:

VIRDIA, LLC (100.0%)
228 Slayton Avenue
Danville, VA 24540, US

72 Inventor/es:

EYAL, AHARON;
JANSEN, ROBERT;
VITNER, ASHER y
MALI, REVITAL

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 862 178 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

Métodos de producción de mezclas de azúcares

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a azúcares y a la producción y el uso de los mismos.

Antecedentes de la invención

10 La industria de conversión de carbohidratos es grande y con un tamaño en rápido crecimiento. En la actualidad, se fermentan aproximadamente 100 millones de toneladas de carbohidratos anualmente, principalmente para proporcionar etanol como combustible. Se predice que este número se triplicará en la próxima década.

15 Cada año también se fermentan millones de toneladas de carbohidratos para proporcionar alimentos y productos alimenticios, tales como ácido cítrico y lisina. La fermentación para producir otros productos también es grande y está en crecimiento, tales como monómeros para la industria de polímeros, por ejemplo, ácido láctico para la producción de polilactida.

20 Los medios de fermentación normalmente incluyen, además de carbohidratos y/u otra fuente de carbono, otros nutrientes y factores tales como fuentes de nitrógeno, minerales, vitaminas y factores de crecimiento. En algunos casos, los medios de fermentación comprenden sustancias químicas bien identificadas. En otros casos, se incorporan varias preparaciones (por ejemplo, extracto de levadura o caldo de triptona) sin comprender completamente el efecto de cada componente sobre la preparación. Algunas de esas preparaciones son el resultado de fuentes naturales, tales como extractos. Algunas de esas preparaciones tienen un coste relativamente alto.

Con la aparición de las técnicas de biología molecular, ha surgido una nueva generación de fermentación industrial, también conocida como conversión, basada en microorganismos genomodificados. En algunos casos, estos microorganismos se basan en promotores inducibles para la inducción de un gen específico. Algunos de los promotores inducibles responden a azúcares específicos.

Aunque la conversión de material lignocelulósico en carbohidratos a través de una hidrólisis de polisacáridos catalizada por una enzima y/o catalizada por un ácido y la pirólisis del material lignocelulósico se han descrito previamente, la aplicación a escala industrial de las tecnologías propuestas ha presentado problemas técnicos que permanecen sin solucionar. La hidrólisis de la hemicelulosa es relativamente fácil, pero la hidrólisis de la celulosa (normalmente más del 50 % de los polisacáridos totales) es más difícil debido a su estructura parcialmente cristalina.

Esta solicitud se refiere a varios disolventes definidos en términos del parámetro de cohesión de Hoy Delta-P y/o Delta-H. A modo de revisión:

40 Delta-P es el componente relacionado con la polaridad del parámetro de cohesión de Hoy, y delta-H es el componente relacionado con los puentes de hidrógeno del parámetro de cohesión de Hoy.

El parámetro de cohesión, como se ha indicado anteriormente o, el parámetro de solubilidad, fue definido por Hildebrand como la raíz cuadrada de la densidad de energía cohesiva:

$$45 \quad \delta = \sqrt{\frac{\Delta E_{vap}}{V}}$$

donde ΔE_{vap} y V son la energía o el calor de vaporización y el volumen molar del líquido, respectivamente. Hansen amplió el parámetro original de Hildebrand a un parámetro de cohesión tridimensional. De acuerdo con este concepto, el parámetro de solubilidad total, delta, está separado en tres componentes diferentes, o parámetros de solubilidad parcial relativos a las interacciones intermoleculares específicas:

$$\delta^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2$$

55 en las que delta-D, delta-P y delta-H son los componentes de dispersión, de polaridad y de puentes de hidrógeno, respectivamente. Hoy propuso un sistema para estimar los parámetros de solubilidad total y parcial. La unidad usada para esos parámetros es MPa^{1/2}. Puede encontrarse una explicación detallada de ese parámetro y sus componentes en "CRC Handbook of Solubility Parameters and Other Cohesion Parameters", segunda edición, páginas 122-138. Estas y otras referencias proporcionan tablas con los parámetros para muchos compuestos. Además, se proporcionan los métodos para el cálculo de esos parámetros.

65 El documento US4237110 describe un proceso en el que un producto en bruto obtenido a partir de la hidrólisis ácida de la celulosa, producto que comprende ácido clorhídrico concentrado y los diversos azúcares obtenidos a partir de la hidrólisis ácida de la celulosa, se separa en una primera fracción que comprende ácido clorhídrico concentrado y una segunda fracción que comprende los azúcares mediante un proceso que comprende: (1) poner en contacto el producto

en bruto con un disolvente orgánico que consiste esencialmente en al menos un alcohol C5-C9, de forma que el disolvente orgánico esté enriquecido con el ácido clorhídrico concentrado, (2) separar el disolvente orgánico enriquecido del producto en bruto empobrecido en ácido clorhídrico concentrado, y (3) recuperar el ácido clorhídrico concentrado a partir del disolvente orgánico enriquecido.

El documento WO201009515 describe un método para hidrolizar un polisacárido, método que comprende las etapas de: (i) poner en contacto el polisacárido con enzimas hidrolíticas mesófilas y termófilas para producir una mezcla de reacción, (ii) incubar la mezcla de reacción a una temperatura adecuada para la actividad de las enzimas hidrolíticas mesófilas, y (iii) incubar la mezcla de reacción a una temperatura adecuada para la actividad de las enzimas hidrolíticas termófilas, en donde el polisacárido es hidrolizado por dichas enzimas hidrolíticas mesófilas y termófilas para producir dos o más fragmentos del polisacárido.

Sumario de la invención

Un aspecto de la divulgación se refiere a mezclas de azúcares heterogéneas. El término "azúcar", como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, se refiere a monosacáridos y oligosacáridos (disacáridos o superiores) solubles en agua a 25 grados centígrados. A lo largo de esta solicitud, el término disacárido se refiere a dímeros de azúcar, y "oligosacáridos superiores" o "sacárido superior" se refiere a oligómeros que comprenden tres o más unidades de azúcar. De acuerdo con varios aspectos ilustrativos de la divulgación, los dímeros pueden ser homodímeros y/o heterodímeros. Como alternativa o adicionalmente, los oligosacáridos superiores pueden incluir las mismas y/o diferentes unidades de azúcar.

En muchos aspectos ilustrativos de la divulgación, las mezclas de azúcares son el resultado de la hidrólisis ácida de sustratos lignocelulósicos o "leñosos". En algunos aspectos ilustrativos, la hidrólisis ácida se realiza con HCl, opcionalmente a una concentración del 37 % p/p de HCl/ [HCl+agua], opcionalmente al 39, al 41, al 43 o incluso al 45 % de HCl sobre la misma base. En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, la hidrólisis se realiza a unas temperaturas por debajo de 50 grados centígrados, opcionalmente por debajo de 40 grados, opcionalmente por debajo de 30 grados, opcionalmente a 25 grados o menos. En algunos aspectos ilustrativos, al menos una porción de la hidrólisis se realiza a 20 grados o menos, opcionalmente 15 grados o menos.

De acuerdo con varios aspectos ilustrativos, la mezcla de azúcares se proporciona en forma de un jarabe y/o un líquido, que opcionalmente incluye ácido residual de la hidrólisis. Las concentraciones totales de azúcar en dicho jarabe/líquido pueden ser del 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 % en peso, o unos porcentajes intermedios o superiores. Opcionalmente, la mezcla se proporciona en forma de cristales secos.

En algunos aspectos ilustrativos, un porcentaje entre oligosacáridos y sacáridos totales en la mezcla es mayor del 4, opcionalmente del 6, opcionalmente del 8, opcionalmente del 10, opcionalmente del 15 % o unos porcentajes intermedios o superiores.

En algunos aspectos ilustrativos, un porcentaje entre disacáridos y sacáridos totales en la mezcla es mayor del 3, opcionalmente del 5, opcionalmente del 7, opcionalmente del 10 % o unos porcentajes intermedios o superiores.

"Disacárido" indica dos azúcares conectados por un enlace alfa o por enlaces beta, o unidos a través de varios hidroxilos de la molécula, y combinaciones de los mismos.

En algunos aspectos ilustrativos, un porcentaje entre pentosas y sacáridos totales en la mezcla es mayor del 3, opcionalmente del 5, opcionalmente del 7, opcionalmente del 10 % o unos porcentajes intermedios o superiores. Opcionalmente, al menos una porción de la pentosa está presente como parte de un disacárido o un oligosacárido más largos.

De acuerdo con varios aspectos ilustrativos, la mezcla incluye al menos una diglucosa unida por alfa y/o al menos una diglucosa unida por beta. Opcionalmente, al menos una porción de las diglucosas están presentes como partes de oligosacáridos superiores.

En algunos aspectos ilustrativos, puede haber ácido residual (por ejemplo, HCl) en la mezcla. Varios aspectos ilustrativos de la divulgación están relacionados con las formas de eliminar este ácido residual. Opcionalmente, dicha eliminación contribuye a un valor añadido para su uso en los procesos posteriores (por ejemplo, la fermentación). En algunos aspectos ilustrativos, la eliminación del ácido residual implica la extracción con un extractante que contiene un alcohol. Opcionalmente, se realizan dos o más extracciones. En algunos aspectos ilustrativos, al menos una de las extracciones emplea una mezcla de dos tipos de disolventes.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a la hidrólisis de un sustrato lignocelulósico en HCl para formar un hidrolizado que comprende sacáridos totales con respecto a (sacáridos totales + agua) de al menos el 20 %, opcionalmente el 25 %, opcionalmente el 30 % en peso, y la desacidificación del hidrolizado mientras se aumenta la concentración de azúcar. Opcionalmente, la concentración de azúcar se aumenta hasta el 35, 40, 45 o 50 % o unos porcentajes mayores o intermedios. En algunos aspectos ilustrativos, los disacáridos en el hidrolizado desacidificado son al menos el 5 %,

opcionalmente el 10 %, opcionalmente el 20 %, opcionalmente el 30 % de los sacáridos totales o unos porcentajes intermedios o mayores. Opcionalmente, una porción de los sacáridos del hidrolizado desacidificado puede digerirse enzimáticamente.

- 5 Otro aspecto de la divulgación se refiere a fermentar dicha mezcla de azúcares en un fermentador para producir un producto de fermentación deseado o "producto de conversión". Opcionalmente, el producto de fermentación puede incluir uno o más de alcoholes, ácidos carboxílicos, aminoácidos, monómeros para la producción de polímeros y proteínas de importancia industrial. En algunos aspectos ilustrativos, se produce un producto de fermentación y a continuación se convierte en el monómero (por ejemplo, el ácido 3-hidroxi-propiónico se convierte en ácido acrílico, que a continuación se polimeriza). En otros aspectos ilustrativos, el monómero es producido directamente (por ejemplo, ácido láctico como fuente de polilactida).

- 15 Opcionalmente, las proteínas son proteínas heterólogas producidas por microorganismos genomodificados. Dichas proteínas heterólogas incluyen, pero no se limitan a, hormonas, enzimas (por ejemplo, celulasas), factores de crecimiento, citocinas y anticuerpos. Opcionalmente, los anticuerpos son proteínas de fusión que incluyen un dominio que no es de inmunoglobulina.

- Un aspecto adicional de la divulgación se refiere a la hidrólisis enzimática de una porción de los azúcares de la mezcla. Para los fines de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, el término "enzima" indica una única enzima o una mezcla que incluye dos o más enzimas. Opcionalmente, se proporciona una enzima en forma de una preparación en bruto (por ejemplo, un extracto celular) caracterizado por un tipo y/o un nivel de actividad, por oposición a una definición molecular precisa. De acuerdo con varios aspectos ilustrativos, se usan enzimas capaces de hidrolizar enlaces alfa y/o beta. Opcionalmente, la especificidad para un tipo de enlace deseado puede conseguirse mediante la apropiada selección de la enzima y/o la selección de las condiciones de reacción adecuadas. En algunos aspectos ilustrativos, al menos el 10 % de los disacáridos de la mezcla se convierten en monosacáridos mediante este tratamiento enzimático. Como alternativa o adicionalmente, al menos el 10 % de los oligosacáridos de la mezcla se hidrolizan enzimáticamente para liberar monosacáridos adicionales. En algunos aspectos ilustrativos, las enzimas están inmovilizadas. Opcionalmente, la inmovilización puede ser sobre microesferas y/o una membrana. En algunos aspectos ilustrativos, la inmovilización contribuye a un aumento en el rendimiento de un producto de la hidrólisis enzimática por unidad de enzima.

- Para los fines de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, y donde no se defina adicionalmente, un "disolvente S1" o "S1" es un disolvente orgánico con una solubilidad en agua menor del 15 % caracterizado por un componente relacionado con la polaridad del parámetro de cohesión de Hoy ($\delta\text{-P}$) de entre 5 y 10 MPa^{1/2} y/o por un componente relacionado con los puentes de hidrógeno del parámetro de cohesión de Hoy ($\delta\text{-H}$) de entre 5 y 20 MPa^{1/2}. En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, el HCl tiende a transferirse selectivamente a un disolvente S1 tras el contacto con el mismo.

- Para los fines de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, y donde no se defina adicionalmente, un "disolvente S2" o "S2" es un disolvente orgánico que tiene una solubilidad en agua de al menos el 30 % y se caracteriza por un $\delta\text{-P}$ mayor de 8 MPa^{1/2} y/o un $\delta\text{-H}$ mayor de 12 MPa^{1/2}. En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, el HCl tiende a transferirse selectivamente a un extractante, incluyendo ambos disolventes S1 y S2, tras el contacto con el mismo.

- 45 Para los fines de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, "extracto" y "extracción" indican poner un extractante en contacto con un sustrato, y a continuación separar un extracto de un sustrato extraído.

- De acuerdo con varios aspectos ilustrativos de la divulgación, una extracción puede ser en una corriente o fracción indicada *per se* o en una corriente o fracción modificada. Algunas modificaciones opcionales incluyen, pero no se limitan a, dilución, concentración, mezcla con otra corriente o fracción, ajuste de la temperatura, y filtración. Opcionalmente, pueden realizarse dos o más modificaciones antes de la extracción.

- Los "materiales leñosos" o "materiales lignocelulósicos" son un sustrato atractivo y respetuoso con el medio ambiente para la producción de azúcar, dado que se obtienen a partir de fuentes renovables. Muchos materiales lignocelulósicos no alimenticios son fuentes potenciales de carbohidratos solubles. Estos materiales lignocelulósicos incluyen, pero no se limitan a, madera y subproductos del procesamiento de la madera (por ejemplo, virutas, serrín y astillas), así como material vegetal residual de productos agrícolas y subproductos de la industria papelera (por ejemplo, residuos que contienen celulosa y/o pulpa de papel).

- 60 El material vegetal residual de productos agrícolas incluye el procesamiento de subproductos y de restos del campo.

- El procesamiento de subproductos incluye, pero no se limitan a, mazorcas de maíz, bagazo de caña de azúcar, pulpa de remolacha azucarera, racimos vacíos de frutas de la producción de aceite de palma, paja (por ejemplo, de trigo o arroz), cáscaras de soja, harinas residuales de la industria de aceites vegetales (por ejemplo, soja, cacahuete, maíz o colza), salvado de trigo y los residuos de fermentación de las industrias cervecera y vinícola.

Los restos del campo incluyen, pero no se limitan a, rastrojos de maíz, plantas de algodón poscosecha, arbustos de soja poscosecha y plantas de colza poscosecha.

Los materiales lignocelulósicos también incluyen "cultivos energéticos" tales como pasto varilla y hierba de escoba, que crecen rápidamente y generan biomasa de bajo coste específicamente como fuente de carbohidratos.

Estas fuentes lignocelulósicas de carbohidratos contienen celulosa, hemicelulosa y lignina como sus componentes principales, y también contienen sales minerales (cenizas) y compuestos orgánicos lipófilos, tales como aceites de resina. El grado y el tipo de estos materiales no carbohidratos pueden crear problemas técnicos en la producción de carbohidratos solubles.

Los materiales lignocelulósicos contienen normalmente un 65-80 % de celulosa y hemicelulosas sobre la base de sustancia seca. La celulosa y la hemicelulosa son polisacáridos que, si se hidrolizan, pueden liberar carbohidratos adecuados para la fermentación y/o la conversión química en productos de interés. La lignina normalmente es resistente a la hidrólisis ácida.

Se apreciará que los diversos aspectos descritos anteriormente se refieren a la solución de problemas técnicos asociados con la obtención de relaciones específicas entre disacáridos y/u oligómeros superiores con respecto a los sacáridos totales producidos por la hidrólisis ácida de un sustrato lignocelulósico.

Como alternativa o adicionalmente, se apreciará que los diversos aspectos descritos anteriormente se refieren a la solución de problemas técnicos asociados con la necesidad de mezclas de azúcares definidas que contienen disacáridos específicos y/u oligómeros superiores. En muchos casos, esta "necesidad" está definida por una aplicación específica posterior.

En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, se proporciona una mezcla de azúcares que incluye: (i) monosacáridos; (ii) oligosacáridos en una relación con respecto a los sacáridos totales $\geq 0,06$; (iii) disacáridos en una relación con respecto a los sacáridos totales $\geq 0,05$; (iv) pentosa en una relación con respecto a los sacáridos totales $\geq 0,05$; (v) al menos una diglucosa unida por alfa; y (vi) al menos una diglucosa unida por beta.

Opcionalmente, la mezcla tiene oligosacáridos superiores en una relación con respecto a los sacáridos totales $\leq 0,2$.

Opcionalmente, la mezcla tiene una relación de al menos una de la unida por alfa y la diglucosa unida por beta con respecto a los sacáridos totales es $\geq 0,01$.

Opcionalmente, la mezcla tiene una relación de al menos una de la diglucosa unida por alfa y la diglucosa unida por beta con respecto a los sacáridos totales es $\geq 0,03$.

Opcionalmente, la diglucosa unida por alfa incluye al menos un miembro del grupo que consiste en maltosa, isomaltosa y trehalosa.

Opcionalmente, la diglucosa unida por beta incluye al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en gentiobiosa, soforosa y celobiosa.

En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, se proporciona un método que incluye (a) hidrólisis un material lignocelulósico en un medio que contiene HCl en una relación con respecto a (HCl + agua) $\geq 0,37$ para formar un hidrolizado que incluye sacáridos totales en una relación con respecto a (sacáridos totales + agua) $\geq 0,20$ en peso; (b) desacidificar el hidrolizado para formar un hidrolizado desacidificado que incluye: (i) sacáridos totales en una relación con respecto a los (sacáridos totales + agua) $\geq 0,35$ y; (ii) disacáridos totales en una relación con respecto a los sacáridos totales $\geq 0,05$; y (c) ajustar una composición del hidrolizado desacidificado para formar una mezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, se proporciona un método que incluye (a) hidrólisis un material lignocelulósico en un medio que contiene HCl en una relación con respecto a (HCl + agua) $\geq 0,37$ en peso para formar un hidrolizado que incluye sacáridos totales en una relación con respecto a (sacáridos totales + agua) $\geq 0,20$ en peso; (b) desacidificar el hidrolizado para formar un hidrolizado desacidificado que incluye una mezcla como se describió anteriormente.

Opcionalmente, la hidrólisis se realiza en un modo de funcionamiento a contracorriente.

Opcionalmente, la hidrólisis se realiza a una temperatura menor de 25 °C.

Opcionalmente, el material lignocelulósico incluye madera blanda, por ejemplo, pino.

Opcionalmente, la desacidificación incluye la extracción selectiva de HCl y agua con un extractante que incluye alcohol.

Opcionalmente, la desacidificación se realiza a una temperatura menor de 80 °C.

En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, se proporciona un método que incluye: (i) proporcionar una preparación que incluye HCl y una mezcla de azúcares de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y (ii) desacidificar la preparación para formar una preparación desacidificada.

Opcionalmente, la desacidificación incluye la extracción selectiva de HCl con un extractante que incluye alcohol.

Opcionalmente, la desacidificación se realiza a una temperatura menor de 80 °C.

En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, se proporciona un método que incluye: (a) proporcionar un fermentador; y (b) fermentar un medio que incluye una mezcla de azúcares como se describió anteriormente en el fermentador para producir un producto de fermentación.

En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, se proporciona un método que incluye: (a) proporcionar un fermentador; y (b) fermentar un medio que incluye un hidrolizado desacidificado como se describió anteriormente o una preparación desacidificada como se describió anteriormente para producir un producto de fermentación.

Opcionalmente, el producto de fermentación incluye al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en alcoholes, ácidos carboxílicos, aminoácidos, monómeros para la industria de polímeros y proteínas.

Opcionalmente, el método incluye procesar el producto de fermentación para producir un artículo de consumo seleccionado del grupo que consiste en detergente, productos basados en polietileno, productos basados en polipropileno, productos basados en poliolefina, productos basados en ácido poliláctico (polilactida), productos basados en polihidroxialcanoato y productos basados en poliacrílico.

Opcionalmente, el detergente incluye un tensioactivo basado en azúcar, un tensioactivo basado en un ácido graso, un tensioactivo basado en un alcohol graso o una enzima derivada de un cultivo celular.

Opcionalmente, el producto basado en poliacrílico se selecciona entre plásticos, abrillantadores para suelos, alfombras, pinturas, recubrimientos, adhesivos, dispersiones, floculantes, elastómeros, vidrio acrílico, artículos absorbentes, pañales de incontinencia, compresas higiénicas, productos de higiene femenina y pañales.

Opcionalmente, los productos basados en poliolefina se seleccionan entre jarras de leche, botellas de detergente, tarrinas de margarina, cubos de basura, tuberías de agua, artículos absorbentes, pañales, no tejidos, juguetes de HDPE y envases de detergente de HDPE.

Opcionalmente, los productos basados en polipropileno se seleccionan entre artículos absorbentes, pañales y no tejidos.

Opcionalmente, los productos basados en ácido poliláctico se seleccionan entre envases de productos agrícolas y de productos lácteos, botellas de plástico, productos biodegradables y desechables.

Opcionalmente, los productos basados en polihidroxialcanoato se seleccionan entre envases de productos agrícolas, botellas de plástico, papeles recubiertos, artículos moldeados o extruidos, productos de higiene femenina, aplicadores de tampón, artículos absorbentes, no tejidos desechables y paños, prendas médicas quirúrgicas, adhesivos, elastómeros, películas, recubrimientos, dispersantes acuosos, fibras, intermedios de productos farmacéuticos y aglutinantes.

Opcionalmente, el producto de fermentación incluye al menos un miembro del grupo que consiste en etanol, butanol, isobutanol, un ácido graso, un éster de ácido graso, un alcohol graso y biodiésel.

Opcionalmente, el método incluye procesar el producto de fermentación para producir al menos un producto seleccionado del grupo que consiste en un producto de condensación de isobuteno, combustible para reactores, gasolina, gasohol, combustible diésel, combustible directo, aditivo de combustible diésel y un precursor de los mismos.

Opcionalmente, el gasohol es gasolina enriquecida en etanol o gasolina enriquecida en butanol.

Opcionalmente, el producto se selecciona del grupo que consiste en combustible diésel, gasolina, combustible para reactores y combustibles directos.

En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, se proporciona un artículo de consumo, un precursor de un artículo de consumo o un ingrediente de un artículo de consumo producido a partir de un producto de fermentación como se describió anteriormente.

En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, se proporciona un artículo de consumo, un precursor de un artículo

- de consumo o un ingrediente de un artículo de consumo que incluye al menos un producto de fermentación producido mediante un método como se describió anteriormente, en donde el producto de fermentación se selecciona entre ácidos carboxílicos y grasos, ácidos dicarboxílicos, ácidos hidroxilcarboxílicos, ácidos hidroxil dicarboxílicos, ácidos hidroxilgrasos, metilglioxal, mono-, di- o polialcoholes, alcanos, alquenos, aromáticos, aldehídos, cetonas, ésteres, biopolímeros, proteínas, péptidos, aminoácidos, vitaminas, antibióticos y productos farmacéuticos.
- Opcionalmente, el producto es gasolina enriquecida en etanol, combustible para reactores o biodiésel.
- En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, se proporciona un artículo de consumo, un precursor de un artículo de consumo o un ingrediente de un artículo de consumo como se describió anteriormente, en donde el artículo de consumo tiene una relación entre carbono-14 y carbono-12 de aproximadamente $2,0 \times 10^{-13}$ o mayor.
- Opcionalmente, el artículo de consumo incluye un ingrediente como se describió anteriormente y un ingrediente adicional producido a partir de materias primas distintas a material lignocelulósico.
- Opcionalmente, el ingrediente y el ingrediente adicional producidos a partir de materias primas distintas a material lignocelulósico tienen esencialmente la misma composición química.
- Opcionalmente, el producto consumible incluye una molécula marcadora a una concentración de al menos 100 ppb.
- Opcionalmente, la molécula marcadora se selecciona del grupo que consiste en furfural, hidroximetil furfural, productos de condensación de furfural o de hidroximetilfurfural, compuestos coloreados derivados de la caramelización de azúcar, ácido levulínico, ácido acético, metanol, ácido galcturónico y glicerol.
- En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, se proporciona un método que incluye: (a) desacidificación de un hidrolizado ácido que incluye sacáridos totales en una relación con respecto a (sacáridos totales + agua) $\geq 0,20$ en peso para producir una mezcla de azúcares con sacáridos totales en una relación con respecto a la relación (sacáridos totales + agua) $\geq 0,35$; incluyendo la mezcla monosacáridos, teniendo la mezcla disacáridos en una relación con respecto a los sacáridos totales $\geq 0,05$; y (b) hidrolizar enzimáticamente la mezcla con una enzima capaz de catalizar la hidrólisis de los enlaces alfa en la mezcla de forma que al menos un 10 % de los disacáridos se conviertan en monosacáridos; y (c) convertir al menos una porción de los sacáridos en un producto de conversión.
- Opcionalmente, la mezcla de azúcares incluye oligosacáridos superiores.
- Opcionalmente, al menos un 10 % de los oligosacáridos superiores están hidrolizados.
- Opcionalmente, el hidrolizado ácido es el resultado de una hidrólisis a contracorriente.
- Opcionalmente, el hidrolizado ácido es el resultado de una hidrólisis realizada a una temperatura menor de 25 °C.
- Opcionalmente, la desacidificación incluye la extracción con un extractante que incluye un alcohol.
- Opcionalmente, la desacidificación se realiza a una temperatura menor de 80 °C.
- Opcionalmente, la hidrólisis enzimática incluye el uso de una enzima capaz de catalizar la hidrólisis de enlaces beta.
- Opcionalmente, la enzima incluye al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en amilasas celulasas, hemicelulasas, transglucosidasas, glucoamilasas, alfa-glucosidasas y pululanases.
- Opcionalmente, la hidrólisis enzimática incluye el uso de una enzima inmovilizada.
- Opcionalmente, al menos una porción de la conversión se realiza simultáneamente con la hidrólisis enzimática.
- Opcionalmente, la relación entre los sacáridos totales y (sacáridos totales + agua) es $\geq 0,15$ durante la hidrólisis enzimática.
- Opcionalmente, la hidrólisis enzimática incluye la incubación de la mezcla con un microorganismo.
- Opcionalmente, la conversión incluye una fermentación.
- Opcionalmente, la mezcla de azúcares incluye al menos una pentosa en una relación con respecto a los sacáridos totales $\geq 0,05$.
- Opcionalmente, la desacidificación incluye la extracción del hidrolizado con un primer extractante que incluye un disolvente S1 para formar un primer extracto portador de HCl y una solución de azúcar empobrecida en HCl.

Opcionalmente, la desacidificación incluye la inclusión de una separación cromatográfica de la solución de azúcar empobrecida en HCl para producir un corte de monómero enriquecido en monosacárido y un corte de ácido enriquecido en disacáridos y oligosacáridos superiores.

- 5 Opcionalmente, la desacidificación incluye la posterior extracción de la solución de azúcar empobrecida en HCl con un segundo extractante que incluye S1 y un segundo disolvente (S2).

Opcionalmente, el S1 de la extracción y de la posterior extracción incluye cada uno independientemente al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en alcoholes, cetonas y aldehídos que tienen al menos 5 átomos de carbono y combinaciones de los mismos.

Opcionalmente, el segundo extractante se caracteriza por al menos uno de:

- 15 un delta-P mayor que el delta-P del primer extractante en al menos $0,2 \text{ MPa}^{1/2}$; y
un delta-H mayor que el delta-H del primer extractante en al menos $0,2 \text{ MPa}^{1/2}$.

Opcionalmente, S2 incluye al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en mono- o polialcoholes C1-C4, aldehídos y cetonas.

- 20 Opcionalmente, una relación entre el HCl y los sacáridos totales en la mezcla de azúcares es $\leq 0,03$ en peso.

Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Como se usa en el presente documento, los términos "que comprende" y "que incluye" o las variantes gramaticales de los mismos deben tomarse como una inclusión específica de las características, los números enteros, las acciones, las relaciones o los componentes establecidos sin excluir la adición de una o más características números enteros, acciones, relaciones, componentes o grupos adicionales de los mismos. Este término es más amplio que, e incluye, los términos "que consiste en" y "que consiste esencialmente en" como se define en el Manual of Patent Examination Procedure of the United States Patent and Trademark Office.

El término "método" se refiere a las formas, los medios, las técnicas y los procedimientos para realizar una tarea dada, incluyendo, pero no se limitan a, las formas, los medios, las técnicas y los procedimientos conocidos o desarrollados fácilmente a partir de las formas, los medios, las técnicas y los procedimientos de los profesionales de arquitectura y/o ciencias de la computación.

Los porcentajes (%) y/o las relaciones de los azúcares (sacáridos) con respecto a una mezcla total, así como las relaciones de diversos azúcares entre sí (por ejemplo, monosacáridos con respecto a disacáridos) son en p/p (peso por peso) salvo que se indique de otro modo. Los porcentajes (%) y/o las relaciones de HCl también se expresan como p/p (peso por peso) salvo que se indique de otro modo.

Específicamente, la presente invención proporciona lo siguiente:

[1] Un método que comprende:

- 45 (a) hidrólisis de un material lignocelulósico en un medio que contiene HCl en una relación con respecto a (HCl + agua) $\geq 0,37$ en peso para formar un hidrolizado que comprende sacáridos totales en una relación con respecto a (sacáridos totales + agua) $\geq 0,20$ en peso; y
(c) desacidificación de dicho hidrolizado para formar un hidrolizado desacidificado que comprende: (i) monosacáridos, en donde los monosacáridos comprenden una pentosa en una relación con respecto a los sacáridos totales $\geq 0,05$; y (ii) oligosacáridos en una relación con respecto a los sacáridos totales $\geq 0,06$, en donde los oligosacáridos comprenden disacáridos en una relación con respecto a los sacáridos totales $\geq 0,05$, en donde los disacáridos comprenden al menos una diglucosa unida por alfa y al menos una diglucosa unida por beta;
- 50 en donde dicha desacidificación comprende (i) extraer el hidrolizado con un primer extractante que incluye un disolvente S1 para formar un primer extracto portador de HCl y una solución de azúcar empobrecida en HCl, y que comprende además la eliminación del HCl residual en dicha solución de azúcar empobrecida en HCl mediante al menos una de (ii-a) una separación cromatográfica y (ii-b) una extracción con un segundo extractante que incluye S1 y un segundo disolvente S2;
- 60 en donde el disolvente S1 es un disolvente orgánico con una solubilidad en agua menor del 15 % y caracterizado por un componente relacionado con la polaridad del parámetro de cohesión de Hoy (delta-P) de entre 5 y $10 \text{ MPa}^{1/2}$ y/o por un componente relacionado con los puentes de hidrógeno del parámetro de cohesión de Hoy (delta-H) de entre 5 y $20 \text{ MPa}^{1/2}$, y que es un disolvente seleccionado del grupo que consiste en alcoholes, cetonas y aldehídos que tienen al menos 5 átomos de carbono; y
- 65 en donde el disolvente S2 es un disolvente orgánico con una solubilidad en agua de al menos el 30 % y caracterizado por un delta-P mayor de $8 \text{ MPa}^{1/2}$ y/o un delta-H mayor de $12 \text{ MPa}^{1/2}$, y que es un disolvente

seleccionado del grupo que consiste en mono- o polialcoholes C1-C4, aldehídos y cetonas.

[2] El método de acuerdo con [1], en donde el hidrolizado desacidificado comprende sacáridos totales en una relación con respecto a (sacáridos totales + agua) $\geq 0,35$.

[3] El método de acuerdo con [1] o [2], en donde el hidrolizado desacidificado tiene una relación entre el HCl y los sacáridos totales de $\leq 0,03$ en peso.

[4] El método de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], en donde el hidrolizado desacidificado tiene oligosacáridos superiores en una relación con respecto a los sacáridos totales $\leq 0,2$.

[5] El método de acuerdo con [1] o [4], en donde una relación de al menos una de dicha diglucosa unida por alfa y dicha diglucosa unida por beta con respecto a los sacáridos totales es (i) $> 0,01$ en el hidrolizado desacidificado o (ii) $> 0,03$ en el hidrolizado desacidificado.

[6] El método de acuerdo con [1] o [5], en donde dicha diglucosa unida por alfa incluye al menos una de maltosa, isomaltosa y trehalosa.

[7] El método de acuerdo con [1] o [6], en donde dicha diglucosa unida por beta incluye al menos una de gentiobiosa, soforosa y celobiosa.

[8] El método de acuerdo con [1] o [7], en donde el disolvente S1 es hexanol o 2-etilhexanol.

[9] El método de acuerdo con [1] o [8], que comprende la eliminación del HCl residual en la solución de azúcar empobrecida en HCl mediante (ii-a) una separación cromatográfica.

[10] El método de acuerdo con [1] o [9], donde dicha etapa de hidrólisis (a) forma dicho hidrolizado y lignina residual, y dicho método comprende además:

(b) separar dicho hidrolizado de dicha lignina residual antes de dicha etapa de desacidificación (c).

[11] El método de acuerdo con [1] o [10], que comprende además

(d) hidrolizar enzimáticamente el hidrolizado desacidificado con una enzima capaz de catalizar la hidrólisis de los enlaces alfa en la mezcla de forma que al menos un 10 % de los disacáridos se conviertan en monosacáridos.

[12] El método de acuerdo con [1] o [11], que comprende además

(e) proporcionar un fermentador; y

(f) fermentar un medio que comprende el hidrolizado desacidificado en dicho fermentador para producir un producto de fermentación.

[13] El método de acuerdo con [12], en donde dicho método comprende además:

(g1) procesar dicho producto de fermentación para producir un artículo de consumo seleccionado del grupo que consiste en detergente, productos basados en polietileno, productos basados en polipropileno, productos basados en poliolefina, productos basados en ácido poliláctico (polilactida), productos basados en polihidroxialcanoato y productos basados en poliacrílico; o (g2) producir un artículo de consumo que comprende el producto de fermentación, en donde dicho producto de fermentación es al menos uno seleccionado entre ácidos carboxílicos y grasos, ácidos dicarboxílicos, ácidos hidroxilcarboxílicos, ácidos hidroxil dicarboxílicos, ácidos hidroxilgrasos, metilglioxal, mono-, di- o polialcoholes, alcanos, alquenos, aromáticos, aldehídos, cetonas, ésteres, biopolímeros, proteínas, péptidos, aminoácidos, vitaminas, antibióticos y productos farmacéuticos; o

(g3) producir un artículo de consumo que comprende el producto de fermentación, en donde dicho artículo de consumo es gasolina enriquecida en etanol, combustible para reactores o biodiésel.

Breve descripción de los dibujos

Con el fin de comprender la invención y descubrir cómo puede llevarse a cabo en la práctica, a continuación se describirán realizaciones, a modo de ejemplo no limitado únicamente, haciendo referencia a las figuras adjuntas. En las Figuras, las estructuras idénticas y similares, los elementos o las partes de los mismos que aparecen en más de una figura generalmente están marcados con referencias iguales o similares en las figuras en las que aparecen. Las dimensiones de los componentes y las características mostradas en las figuras se eligen por conveniencia y claridad de la presentación y no están necesariamente a escala. Las figuras adjuntas son:

La **fig. 1** es una vista esquemática de un sistema que ilustra el contexto industrial de algunos aspectos ilustrativos de la divulgación;

Las **figs. 2a y 2b** son, cada una, diagramas de flujo simplificados de los métodos de acuerdo con aspectos ilustrativos de la divulgación;

La **fig. 3** es un diagrama de flujo simplificado de un método de acuerdo con un aspecto ilustrativo de la divulgación;

Las **figs. 4a y 4b** son, cada una, diagramas de flujo simplificados de los métodos de acuerdo con aspectos ilustrativos de la divulgación;

La **fig. 5** es un diagrama de flujo simplificado de un método de acuerdo con un aspecto ilustrativo de la divulgación; y

La **fig. 6** es un diagrama de flujo simplificado de una porción del método representado en la fig. 5 con mayor detalle de acuerdo con un aspecto ilustrativo de la divulgación.

Descripción detallada

Los aspectos de la divulgación se refieren a mezclas de azúcares, su preparación y uso. Específicamente, algunos aspectos de la divulgación pueden usarse como sustratos para una fermentación microbiana. Opcionalmente, los microorganismos específicos empleados se seleccionan para que utilicen uno o más azúcares presentes en la mezcla. Como alternativa o adicionalmente, algunos aspectos de la divulgación se refieren al ajuste de una o más de las relaciones entre los componentes de una mezcla para hacer que la mezcla sea más valiosa para una aplicación específica posterior.

Los principios y el funcionamiento de los métodos de acuerdo con aspectos ilustrativos de la divulgación pueden entenderse mejor en referencia a los dibujos y las descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos un aspecto la divulgación en detalle, debe entenderse que la invención no se limita en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrados por los ejemplos. La invención es susceptible de otras realizaciones o de ponerse en práctica o de llevarse a cabo de diversas maneras. También, debe entenderse que la fraseología y la terminología empleadas en el presente documento son con fines descriptivos, y no deberían interpretarse como limitantes.

Aspectos generales del sistema ilustrativo

La fig. 1 es un diagrama esquemático simplificado de un sistema para la hidrólisis ácida de un sustrato lignocelulósico indicado de forma general como 100. El sistema representado 100 incluye un reactor de hidrólisis principal 110 adaptado para recibir el aporte de un sustrato lignocelulósico 112. Opcionalmente, el sustrato 112 se proporciona en forma de virutas de madera, aunque puede usarse cualquier "leñoso material" como se describe en los antecedentes en lugar de madera.

El sustrato 112 se pone en contacto con una solución concentrada de HCl en el reactor 110, y la hemicelulosa y/o la celulosa del sustrato se hidrolizan para producir una mezcla de azúcares solubles y lignina residual. Estos materiales se recogen por separado como la corriente de lignina 120 y la mezcla de azúcares 130, cada una de las cuales contiene una gran cantidad de HCl.

Dado que el ácido actúa como catalizador, no se consume en el proceso. Además, el contenido de ácido residual del producto y los coproductos debería ser bajo con objeto de permitir su uso. La recuperación del ácido a partir del hidrolizado debería realizarse en unas condiciones que minimicen la degradación térmica.

Los detalles de los métodos y sistemas de hidrólisis ilustrativos se describen con detalle en las solicitudes provisionales de Estados Unidos en trámite 61/483.777 y 61/487.319 (ambas disponibles para uso público, por ejemplo, a través de la carpeta del expediente en línea del documento WO2012/137204)

Esta solicitud se refiere fundamentalmente al procesamiento de la mezcla de azúcares 130. El procesamiento incluye la eliminación del HCl y/o el ajuste de la mezcla para conseguir una o más relaciones deseadas entre los componentes de la mezcla (por ejemplo, disacáridos y/o monosacáridos). Este procesamiento se realiza en un módulo de refinado de azúcares, denominado aquí de forma general como 200.

Opcionalmente, la mezcla de azúcares adicional se recupera a partir de la corriente de lignina 120 como se describe en la solicitud provisional de Estados Unidos en trámite US 61/491.243 (disponible para uso público, por ejemplo, a través de la carpeta del expediente en línea del documento WO2012/137204). En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, esta mezcla de azúcares adicional es dirigida al módulo de refinado 200. De acuerdo con varios aspectos ilustrativos de la divulgación esta mezcla de azúcares adicional aumenta un rendimiento total de los azúcares y/o cambia una composición de la mezcla.

Como se explicará con mayor detalle a continuación en el presente documento, el módulo de refinado 200 emplea un flujo de disolvente orgánico 155 (flechas continuas) para extraer el HCl 140 (flechas discontinuas) a partir de la mezcla de azúcares 130.

Los azúcares desacidificados 230 son el producto principal del módulo de refinado 200. El módulo 200 también produce una corriente de HCl 140 mezclada con el disolvente 155 (representada como flechas paralelas discontinuas y continuas, respectivamente, por claridad) que es dirigida a un módulo de recuperación de disolvente/HCl 150. El módulo de recuperación 150 separa el HCl 140 del disolvente 155. En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, la separación es por destilación. El HCl 140 es reciclado al reactor de hidrólisis, 110 y el disolvente 155 es reciclado al módulo de refinado 200.

Los azúcares desacidificados 230 pueden usarse en diversos procesos de conversión industrial como se describe a continuación en el presente documento. Opcionalmente, se realizan ajustes adicionales en el azúcar desacidificado 230 antes de estos procesos de conversión, como se describe a continuación.

Mezclas de azúcares ilustrativas:

Algunos aspectos ilustrativos de la divulgación se refieren a mezclas de azúcares. En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, las mezclas pueden caracterizarse como: que contienen monosacáridos (por ejemplo, hexosas tales como glucosa y/o galactosa y/o manosa) y que tienen una relación entre los oligosacáridos y los sacáridos totales $\geq 0,06$. Opcionalmente, la mezcla incluye disacáridos y una relación entre disacáridos y sacáridos totales $\geq 0,05$. Opcionalmente, la mezcla incluye una pentosa (por ejemplo, xilosa y/o arabinosa y/o ribosa y/o lixosa) y una relación entre la pentosa y los sacáridos totales $\geq 0,05$. En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, la mezcla incluye al menos una diglucosa unida por alfa (glucosa unida a glucosa) y/o al menos una diglucosa unida por beta. Opcionalmente, la mezcla se caracteriza por una relación entre los oligosacáridos superiores y los sacáridos totales $\leq 0,2$.

De acuerdo con varios aspectos ilustrativos de la divulgación, la diglucosa unida por alfa incluye una o más de maltosa, isomaltosa y trehalosa, y la diglucosa unida por beta incluye una o más de gentiobiosa, soforosa y celobiosa.

En algunos aspectos ilustrativos, una relación entre al menos una de dicha diglucosa unida por alfa y dicha diglucosa unida por beta con respecto al contenido total de sacáridos es $\geq 0,01$, opcionalmente $\geq 0,03$.

En algunos aspectos ilustrativos, la diglucosa unida por alfa incluye maltosa y/o isomaltosa y/o trehalosa y/o kojibiosa y/o nigerosa. En algunos aspectos ilustrativos, la diglucosa unida por beta incluye gentiobiosa y/o soforosa y/o celobiosa y/o laminaribiosa y/o beta-trehalosa.

En algunos aspectos ilustrativos, una proporción entre la diglucosa unida por alfa y/o la diglucosa unida por beta es de al menos 0,01, opcionalmente de al menos 0,02, opcionalmente de al menos 0,03 con respecto a los sacáridos totales.

De acuerdo con algunos aspectos ilustrativos, la mezcla incluye múltiples diglucosas unidas por alfa, y la proporción combinada entre estas diglucosas y los sacáridos totales es de al menos 0,03. De acuerdo con otros aspectos más, la mezcla incluye múltiples diglucosas unidas por beta, y la proporción combinada con respecto a los sacáridos totales de estas diglucosas unidas por beta es de al menos 0,03.

Métodos ilustrativos para la elaboración de dichas mezclas:

La fig. 2a es un diagrama de flujo simplificado que representa un método ilustrativo de elaboración de mezclas de azúcares como se describió anteriormente, indicado de forma general como 202. De acuerdo con el método representado, se hidroliza un material lignocelulósico 210 en HCl. En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, y en el método de la invención, la hidrólisis 210 emplea un medio que contiene una relación entre HCl y (HCl + agua) $\geq 0,37$ en peso. La hidrólisis 210 produce un hidrolizado 212 que comprende sacáridos totales con respecto a (sacáridos totales + agua) $\geq 0,20$ en peso. El método representado también incluye la desacidificación 220 del hidrolizado 212 para formar un hidrolizado desacidificado 222 que comprende: (i) una relación entre sacáridos totales y (sacáridos totales + agua) $\geq 0,35$ y; (ii) una relación entre disacáridos totales y sacáridos totales $\geq 0,05$. Opcionalmente, un aumento en la concentración de sacáridos resultante de la desacidificación 220 contribuye a aumentar el valor.

El método 202 también incluye el ajuste 230 de una composición del hidrolizado desacidificado 222 para formar una mezcla de azúcares como se describió anteriormente. De acuerdo con varios aspectos ilustrativos de la divulgación, el ajuste 230 incluye, pero no se limita a, uno o más de concentración, dilución, pulido, tratamiento con carbón activo, cromatografía de intercambio iónico y oligomerización enzimática (por ejemplo, para formar dímeros). Opcionalmente, se emplean glicosiltransferasas.

La fig. 2b es un diagrama de flujo simplificado que representa un método ilustrativo adicional de elaboración de mezclas de azúcares como se describió anteriormente, indicado de forma general como 204. El método representado 204 incluye la hidrólisis 210 para producir el hidrolizado 212, como se describe para el método 202.

Sin embargo, en el método 204 representado, la desacidificación 225 del hidrolizado 212 produce un hidrolizado desacidificado que comprende una mezcla 240 de acuerdo con un aspecto ilustrativo de la divulgación, como se describió anteriormente.

Con respecto a los métodos 202 y/o 204, la hidrólisis 210 se realiza opcionalmente en un modo de funcionamiento a contracorriente y/o a una temperatura menor de 25 °C. En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, el material lignocelulósico hidrolizado incluye madera blanda, opcionalmente pino.

De acuerdo con varios aspectos ilustrativos de los métodos 202 y/o 204, la desacidificación 220 o 225 incluye la extracción selectiva del HCl con un alcohol. En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, el alcohol tiene una solubilidad en agua menor del 15 %, por ejemplo, un alcohol con 5 a 8 átomos de carbono. Opcionalmente, parte del agua se extrae con el HCl. Opcionalmente; la desacidificación se realiza a una temperatura menor de 80 °C.

Métodos de acidificación ilustrativos

La fig. 3 es un diagrama de flujo simplificado que representa un método ilustrativo de desacidificación de una mezcla de azúcares como se describió anteriormente, indicado generalmente como 300. De acuerdo con el método representado, se proporciona una preparación que incluye HCl y una mezcla de azúcares como se describió anteriormente 310 y desacidificada 320. En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, la desacidificación 320 incluye la extracción selectiva de HCl con un alcohol. Opcionalmente, se emplea hexanol o 2-etil-1-hexanol para esta extracción. Opcionalmente, la desacidificación 320 se realiza a una temperatura menor de 80 °C, opcionalmente menor de 70 °C y opcionalmente menor de 60 °C.

Como se usa en el presente documento, "extracción selectiva" indica que la relación HCl/carbohidrato en el extracto es mayor que la relación en el hidrolizado ácido, opcionalmente al menos 5 veces mayor, opcionalmente al menos 10 veces.

En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, la desacidificación se realiza de acuerdo con los métodos divulgados en la solicitud de patente israelí en trámite IIL 206.152.

Procesamiento posterior ilustrativo de mezclas de azúcares

La fig. 4a es un diagrama de flujo simplificado que representa un método ilustrativo de producción de un producto de fermentación a partir de una mezcla de azúcares, como se describió anteriormente, indicado de forma general como 402. De acuerdo con el método representado, se proporciona un fermentador 410, y unos medios que comprenden una mezcla de azúcares como se describió anteriormente se fermentan 420 para producir un producto de fermentación 430.

La fig. 4b es un diagrama de flujo simplificado que representa un método ilustrativo de producción de un producto de fermentación a partir de una mezcla de azúcares como se describió anteriormente, indicado de forma general como 404. De acuerdo con el método representado, se proporciona un fermentador 410, y unos medios que comprenden un hidrolizado desacidificado como se describió anteriormente o una preparación desacidificada como se describió anteriormente se fermentan 422 para producir un producto de fermentación 432.

De acuerdo con varios aspectos ilustrativos de la divulgación, el producto de fermentación 430 y/o 432 incluye un alcohol y/o un ácido carboxílico y/o un aminoácido y/o un monómero para la industria de polímeros y/o una proteína.

Un producto de fermentación común es etanol, que puede ser útil, por ejemplo, como combustible. Por ejemplo, el etanol puede añadirse a la gasolina para producir "gasohol", como se realiza habitualmente en Estados Unidos, o usarse por sí mismo como combustible, como se realiza habitualmente en Brasil.

Opcionalmente, el producto de fermentación es una proteína. En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, la proteína es una proteína heteróloga, y un disacárido de la mezcla de azúcares activa un elemento regulador inducible en una construcción que contiene una secuencia que codifica la proteína. En algunos aspectos ilustrativos, un aumento en la cantidad y/o en la relación de un disacárido específico en la mezcla de azúcares contribuye a aumentar el rendimiento del producto de fermentación 430 y/o 432 por unidad de mezcla de azúcares en los medios fermentados 420 y/o 422.

Métodos adicionales que incluyen hidrólisis enzimática

La fig. 5 es un diagrama de flujo simplificado que representa un método ilustrativo de producción de un producto de conversión a partir de una mezcla de azúcares, como se describió anteriormente, indicado de forma general como 500. De acuerdo con el método representado, se desacidifica 510 un hidrolizado ácido (como se describió anteriormente) que incluye sacáridos totales con respecto a (sacáridos totales + agua) $\geq 0,20$ en peso, para producir una mezcla de azúcares 520 con una relación entre sacáridos totales y (sacáridos totales + agua) $\geq 0,35$ que incluye monosacáridos y que tiene una relación entre disacáridos y sacáridos totales $\geq 0,05$. Esta mezcla es una mezcla de azúcares ilustrativa como se describió anteriormente.

El método ilustrativo representado 500 también incluye hidrolizar enzimáticamente 522 una mezcla de azúcares con una enzima capaz de catalizar la hidrólisis de los enlaces alfa en la mezcla, de forma que al menos el 10 %, opcionalmente al menos el 20 %, opcionalmente al menos el 30 % de los disacáridos se conviertan en monosacáridos. La expresión "capaz de catalizar la hidrólisis de los enlaces alfa" indica cualquier enzima con al menos un 5 % de la actividad de la alfa amilasa con respecto a los enlaces alfa. Opcionalmente, al menos el 10 % de los disacáridos y los sacáridos superiores se hidrolizan para liberar monosacáridos adicionales. Opcionalmente, los sacáridos superiores liberan disacáridos adicionales.

En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, la hidrólisis enzimática 522 se realiza sin tener que concentrar las soluciones diluidas de sacáridos, es decir, la hidrólisis enzimática se realiza a una concentración de azúcar relativamente alta.

El método representado también incluye convertir 530 al menos una porción de los sacáridos en un producto de conversión 540.

De acuerdo con varios aspectos ilustrativos de la divulgación, convertir incluye una fermentación y/o conversión química. La conversión química puede ser, por ejemplo, una conversión catalítica.

De acuerdo con varios aspectos ilustrativos de la divulgación, la conversión y/o la hidrólisis enzimática pueden realizarse, cada una, en múltiples fases en varias secuencias. Opcionalmente, uno o más de los procesos de conversión se realizan entre las fases de la hidrólisis enzimática. Como alternativa o adicionalmente, una o más de las fases de hidrólisis enzimática se realizan entre los procesos de conversión.

En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, la mezcla de azúcares comprende oligosacáridos con al menos tres unidades de azúcar.

En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, el hidrolizado ácido inicial es el resultado de una hidrólisis a contracorriente. Opcionalmente, la hidrólisis ácida se realiza a una temperatura menor de 25 °C.

En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, la desacidificación 510 incluye la extracción con un extractante que incluye un alcohol. Opcionalmente, la desacidificación 510 se realiza a una temperatura menor de 80 °C.

En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, la hidrólisis enzimática 522 incluye la hidrólisis de los enlaces beta.

De acuerdo con varios aspectos ilustrativos de la divulgación, la hidrólisis enzimática 522 incluye el uso de al menos una de una enzima perteneciente al EC 3.2.1 de acuerdo con las recomendaciones de nomenclatura de enzimas del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB). Esta clase de enzimas incluye, pero no se limita a, amilasas celulasas, hemicelulasas, transglucosidasas, glucoamilasas, alfa-glucosidasas y pululanases. Opcionalmente, se emplea una alfa amilasa y/o una beta amilasa y/o una 1-4 alfa glucosidasa.

Opcionalmente, una o más de estas enzimas pueden proporcionarse como parte de un cóctel enzimático y/o de un extracto celular que incluye otras enzimas no definidas.

En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, se usa una enzima inmovilizada para la hidrólisis enzimática 522. Opcionalmente, la inmovilización contribuye a la hidrólisis de un mayor número de enlaces por molécula de enzima.

En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, al menos una porción de la conversión 530 se realiza simultáneamente con la hidrólisis enzimática 522. Opcionalmente, este procesamiento simultáneo evita la formación de productos de hidrólisis que podrían afectar negativamente a la cinética de la hidrólisis enzimática. Para los fines de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas el término "simultáneamente" se usa en su sentido aceptado en la técnica (es decir, sacarificación y fermentación simultaneas).

Opcionalmente, una relación entre sacáridos totales y (sacáridos totales + agua) $\geq 0,15$, opcionalmente se mantiene $\geq 0,2$ durante la hidrólisis enzimática.

De acuerdo con algunos aspectos ilustrativos, la hidrólisis enzimática 522 incluye una única reacción o reacciones temporalmente y/o distintas, reacciones que difieren en la composición de las enzimas empleadas y/o en la temperatura y/o en el pH.

En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, la hidrólisis enzimática 522 incluye la fermentación con microorganismos que producen la(s) enzima(s) deseadas(s).

Como alternativa o adicionalmente, la conversión 530 comprende una fermentación.

Opcionalmente, la mezcla de azúcares 520 incluye al menos una pentosa, y una relación entre la al menos una pentosa y los sacáridos totales es $\geq 0,05$ en peso.

Procesos de desacidificación ilustrativos

La fig. 6 es un diagrama de flujo simplificado que ilustra algunas formas ilustrativas en las que puede realizarse la desacidificación 510 de la fig. 5.

En los aspectos ilustrativos de la divulgación representados, y en el método específico de la invención, la desacidificación 510 incluye la extracción 511 del hidrolizado con un primer extractante que incluye un disolvente S1 para formar un primer extracto portador de HCl 612 y una solución de azúcar empobrecida en HCl 614. Opcionalmente, el primer extractante incluye el 70, 80, 90, 95 o sustancialmente el 100 % del disolvente S1. Sin embargo, puede haber presente HCl en la solución de azúcar 614 en un nivel inaceptable. Si este es el caso, pueden emplearse

opcionalmente una o más estrategias de separación adicionales.

De acuerdo con varios aspectos ilustrativos de la divulgación, y específicamente en el método de la invención, el HCl residual de la solución de azúcar empobrecida en HCl 614 se elimina mediante una separación cromatográfica 620 y/o mediante una extracción posterior 630 con un segundo extractante que incluye S1 y un segundo disolvente (S2). Opcionalmente, la concentración total de disolvente en el segundo extractante es del 50, 60, 70, 80, 90, 95 o sustancialmente el 100 %, o porcentajes intermedios.

En aquellos aspectos ilustrativos de la divulgación que emplean una separación cromatográfica 620, la solución de azúcares 614 se separa en un "corte ácido" que contiene HCl 624 que está enriquecido en disacáridos y sacáridos superiores con respecto a los sacáridos totales, y un "corte de monómero" 622 enriquecido en monosacáridos con respecto a los sacáridos totales. En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, el corte ácido 624 se somete a un tratamiento adicional para separar los sacáridos del HCl y/o para ajustar una parte de los monosacáridos con respecto a los sacáridos totales. Algunas técnicas ilustrativas de separación cromatográfica se divulgan en la solicitud en trámite IL 211093.

En aquellos aspectos ilustrativos de la divulgación que emplean una extracción posterior 630, hay una transferencia selectiva de HCl al segundo extractante para formar un segundo extracto 634 y el hidrolizado desacidificado 520, representado aquí como la mezcla de azúcares desacidificada 632. Algunas técnicas ilustrativas de extracción posterior se divulgan en la solicitud PCT en trámite IL2011/000130.

Opcionalmente, el disolvente S1 empleado en la extracción inicial 511 y la extracción posterior 630 incluye un mismo disolvente y/o un disolvente diferente. Los disolventes S1 empleados en aspectos ilustrativos de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, alcoholes (por ejemplo, hexanol y 2-etil hexanol), cetonas y aldehídos que tienen al menos 5 átomos de carbono y combinaciones de los mismos. En el método de la presente invención, el disolvente S1 es un disolvente seleccionado del grupo que consiste en alcoholes, cetonas y aldehídos que tienen al menos 5 átomos de carbono.

En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, el segundo extractante se caracteriza por un delta-P mayor que el delta-P del primer extractante en al menos 0,2 MPa^{1/2} y/o un delta-H mayor que el delta-H del primer extractante en al menos 0,2 MPa^{1/2}.

De acuerdo con varios aspectos ilustrativos de la divulgación, S2 incluye al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en mono- o polialcoholes C1-C4, aldehídos y cetonas. En el método de la presente invención, el disolvente S2 se selecciona del grupo que consiste en mono- o polialcoholes C1-C4, aldehídos y cetonas.

En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, una relación entre el HCl y los sacáridos totales en el hidrolizado desacidificado 520 y/o 632 es $\leq 0,03$ en peso.

Contextos industriales ilustrativos de procesamiento posterior

Las potenciales aplicaciones posteriores de los carbohidratos solubles incluyen, pero no se limitan a, producción de biocombustibles (por ejemplo, etanol, butanol o hidrocarburos), uso en la industria alimentaria (por ejemplo, fermentación a ácido cítrico o goma xantana y conversión de la xilosa en xilitol para su uso como edulcorante artificial) y monómeros de utilidad industrial.

Según se desarrollen nuevos procesos para la producción de combustibles alternativos tales como ésteres de ácidos grasos e hidrocarburos (formados directamente por fermentación o producidos por la conversión de los productos de fermentación), se espera que aumente la demanda de carbohidratos solubles.

A modo de ejemplo, se espera que las mezclas de azúcares de acuerdo con varios aspectos ilustrativos de la divulgación sean útiles en fermentadores que emplean promotores inducibles, tales como los que se describen en el documento US 7.713.725, por ejemplo.

Como alternativa o adicionalmente, se espera que las mezclas de azúcares de acuerdo con varios aspectos ilustrativos de la divulgación sean útiles en la producción de composiciones de ésteres grasos, tales como los que se describen en, por ejemplo, el documento US 2010/0071259.

Como alternativa o adicionalmente, se espera que las mezclas de azúcares de acuerdo con varios aspectos ilustrativos de la divulgación sean útiles en la fermentación extractiva, tal como se describe en, por ejemplo, el documento WO 2009/042950.

Como alternativa o adicionalmente, se espera que las mezclas de azúcares de acuerdo con varios aspectos ilustrativos de la divulgación sean útiles en la producción de derivados de ácidos grasos, como se describe en, por ejemplo, el documento WO 2008/119082.

Como alternativa o adicionalmente, se espera que las mezclas de azúcares de acuerdo con varios aspectos ilustrativos de la divulgación sean útiles en la producción de péptidos, como se describe en, por ejemplo, en el documento US 7595173.

- 5 En resumen, se espera que los productos posteriores directos de las mezclas de azúcares de acuerdo con varios aspectos ilustrativos de la divulgación resultantes de la fermentación y/o de la conversión (por ejemplo, alcoholes, ácido láctico, ácido acrílico y péptido antimicrobiano) den lugar a una amplia variedad de productos resultantes del procesamiento adicional de estos productos de conversión. Dichos productos incluyen, pero no se limitan a, combustible para automóviles (por ejemplo, para automóviles y/o aviones), pañales, artículos de consumo de plástico y pintura.

Artículos de consumo ilustrativos

- 15 Algunos aspectos ilustrativos de la divulgación se refieren a artículos de consumo y a su elaboración o preparación.

En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, una mezcla de azúcares de acuerdo con un aspecto ilustrativo de la divulgación se convierte en un producto de fermentación de acuerdo con uno o más aspectos adicionales de la divulgación. Opcionalmente, el producto de fermentación incluye al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en alcoholes, ácidos carboxílicos, aminoácidos, monómeros para la industria de polímeros y proteínas.

20 En algunos aspectos ilustrativos, el producto de fermentación se procesa para producir un artículo de consumo. Algunos artículos de consumo ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, detergente, productos basados en polietileno, productos basados en polipropileno, productos basados en poliolefina, productos basados en ácido poliláctico (polilactida), productos basados en polihidroxialcanoato y productos basados en poliacrílico.

25 En algunos aspectos ilustrativos, el detergente incluye un tensioactivo basado en azúcar y/o un tensioactivo basado en ácido graso y/o un tensioactivo basado en alcohol graso y/o una enzima derivada de un cultivo celular.

30 En algunos aspectos ilustrativos, el producto basado en poliacrílico incluye un plástico y/o un abrillantador para suelos y/o una alfombra y/o una pintura y/o un recubrimiento y/o un adhesivo y/o una dispersión y/o un floculante y/o un elastómero y/o vidrio acrílico y/o un artículo absorbente (por ejemplo, pañales de incontinencia, compresas higiénicas, productos de higiene femenina y pañales).

35 Los productos basados en poliolefina pueden ser, por ejemplo, jarras de leche, botellas de detergente, tarrinas de margarina, cubos de basura, tuberías de agua, artículos absorbentes, pañales, tejidos no tejidos (por ejemplo, toallitas húmedas), juguetes de HDPE y envases de detergente de HDPE.

40 En algunos aspectos ilustrativos, se proporciona un producto basado en polipropileno en forma de artículos absorbentes, opcionalmente un pañal.

En otros aspectos ilustrativos, se proporciona un producto basado en polipropileno en forma de un artículo de tejido no tejido, opcionalmente una toallita húmeda.

45 Los productos basados en ácido poliláctico pueden ser, por ejemplo, envases de productos agrícolas o lácteos, botellas de plástico, productos biodegradables y desechables.

50 Los productos basados en polihidroxialcanoato pueden ser, por ejemplo, envases de productos agrícolas, botellas de plástico, papeles recubiertos, artículos moldeados o extruidos, productos de higiene femenina, aplicadores de tampón, artículos absorbentes, no tejidos desechables y paños, prendas médicas quirúrgicas, adhesivos, elastómeros, películas, recubrimientos, dispersantes acuosos, fibras, intermedios de productos farmacéuticos y aglutinantes.

55 Opcionalmente, el producto de fermentación incluye al menos un miembro del grupo que consiste en etanol, butanol, isobutanol, un ácido graso, un éster de ácido graso, un alcohol graso y biodiésel. En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, el producto de fermentación se procesa para producir un producto de condensación de isobuteno y/o un combustible para reactores y/o gasolina y/o gasohol y/o combustible diésel y/o combustible directo y/o un aditivo de combustible diésel y/o un precursor de los mismos. De acuerdo con varios aspectos ilustrativos de la divulgación, el gasohol es gasolina enriquecida en etanol o gasolina enriquecida en butanol.

60 Opcionalmente, el producto es un combustible diésel. Opcionalmente, el producto es gasolina. Opcionalmente, el producto es combustible para reactores. Opcionalmente, el producto es un combustible directo.

65 De acuerdo con varios aspectos ilustrativos de la divulgación, se produce un artículo de consumo, un precursor de un artículo de consumo o un ingrediente de un artículo de consumo a partir de un producto de fermentación. Opcionalmente, el artículo de consumo, el precursor de un artículo de consumo o el ingrediente de un artículo de consumo, incluye al menos un producto de fermentación como se describió anteriormente en el presente documento que incluye uno o más de ácidos carboxílicos y grasos, ácidos dicarboxílicos, ácidos hidroxilcarboxílicos, ácidos hidroxil

dicarboxílicos, ácidos hidroxilgrasos, metilglioxal, mono-, di- o polialcoholes, alcanos, alquenos, aromáticos, aldehídos, cetonas, ésteres, biopolímeros, proteínas, péptidos, aminoácidos, vitaminas, antibióticos y productos farmacéuticos. En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, el producto es gasolina enriquecida en etanol, combustible para reactores o biodiésel.

5 En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, un artículo de consumo o un ingrediente de un artículo de consumo como se describió anteriormente tiene una relación entre carbono-14 y carbono-12 de $1,8 \times 10^{-13}$, opcionalmente de $2,0 \times 10^{-13}$ o mayor.

10 En algunos aspectos ilustrativos de la divulgación, el artículo de consumo incluye un ingrediente como se describió anteriormente y un ingrediente adicional producido a partir de materias primas distintas a material lignocelulósico. Opcionalmente, el ingrediente y el ingrediente adicional tienen esencialmente la misma composición química.

15 Algunos aspectos ilustrativos de la divulgación se refieren a un producto consumible como se describió anteriormente que incluye una molécula marcadora a una concentración de al menos 100 ppb. La molécula marcadora incluye opcionalmente uno o más de furfural, hidroximetil furfural, productos de condensación de furfural o de hidroximetilfurfural, compuestos coloreados derivados de la caramelización de azúcar, ácido levulínico, ácido acético, metanol, ácido galcturónico y glicerol.

20 Se espera que durante la vigencia de esta patente se caracterice muchas enzimas EC 3.2.1, y se pretende que el ámbito de la invención incluye a todas esas nuevas enzimas *a priori*.

25 Específicamente, se han utilizado diversos indicadores numéricos. Debería entenderse que estos indicadores numéricos podrían variar aún más sobre la base de diversos principios de ingeniería, materiales, el uso previsto en los diseños incorporados en la invención. Adicionalmente, los componentes y/o las acciones atribuidas a las realizaciones ilustrativas de la invención y representados como una única unidad pueden dividirse en subunidades. Por el contrario, los componentes y/o las acciones atribuidas a los aspectos ilustrativos de la divulgación y representados como subunidades/acciones individuales pueden combinarse en una única unidad/acción con la función descrita/representada.

30 Como alternativa, o adicionalmente, las características usadas para describir un método pueden usarse para caracterizar un aparato, y las características usadas para describir un aparato pueden usarse para caracterizar un método.

35 Debería entenderse además que las características individuales descritas anteriormente en el presente documento pueden combinarse en todas las posibles combinaciones y subcombinaciones para producir aspectos adicionales de la divulgación. Los ejemplos proporcionados anteriormente tienen naturaleza ilustrativa y no pretenden limitar el ámbito de la invención, que está definido únicamente por las siguientes reivindicaciones. Específicamente, se ha descrito en el contexto de la producción de etanol, pero es aplicable ampliamente a cualquier proceso de fermentación o de conversión.

Los términos "incluye" y "tiene" y sus conjugaciones se usan en el presente documento para significar "que incluye pero no se limita necesariamente a".

45 Ejemplos

Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que, junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de manera no limitante.

50 MATERIALES Y MÉTODOS

Los siguientes materiales y métodos se usan en la ejecución de los experimentos descritos en los siguientes ejemplos, a continuación:

55 Enzimas: Algunas enzimas (ejemplos 1-3) eran de Novozymes (Novozymes A/S; Dinamarca): Spyrizyme Fuel HS: Glucoamilasa con actividad α 1-4 y 1-6; actividad declarada de 1425 AGU/g; Líquido de color entre marrón claro y oscuro Liquozyme SC DS: α -Amilasa con actividad 1-4; actividad declarada de 240 KNU-S/g; Líquido ambarino. Las instrucciones del fabricante son:

60 Spyrizyme Fuel HS: 0,025-0,035 % (p/p) en grano "como tal"
Liquozyme SC DS: n.d.
Cellic CTec: 1,5 %, 3,0 % y 15 % p/p (g de enzima/g de celulosa).
Cellic HTech: 0,1-0,5 % (p/p de TS).

65 Las enzimas adicionales se obtuvieron en Genencor (Danisco; Genencor, Beloit WI, EE.UU.): Spezyme Alpha: <1 % de actividad α -amilasa 13.775 (unidades de alfa amilasa)/g (min.), termoestable, líquido de color marrón

oscuro, pH óptimo de 5,5-6,5.

Transglucosidase L-2000: 1-5 % de la enzima activa, que tiene actividad α 1-4, líquido de color marrón amarillento, pH óptimo de 4,5-5,5.

Los usos recomendados de las enzimas (A. Kelley, Genencor) son:

Spezyme Alpha: 0,025 %
Transglucosidase L-2000: 0,01 %
Accelerase BG: 8 %
Accelerase DUET: 8 %

Hidrolizados: Se emplearon hidrolizados de madera de pino como sustrato para los análisis enzimáticos. Los hidrolizados se ajustaron para contener un % deseado de **TS (sacáridos totales)**. Todos los experimentos se realizaron a pH 4,0-5,1 a varias temperaturas entre 50 y 85 °C. También se variaron las dosis de carga de las enzimas.

En todos los experimentos de hidrólisis enzimática, el tiempo 0 (h) se refiere al blanco (sin enzima).

Los hidrolizados de madera de pino, el bagazo de caña de azúcar y la madera de eucalipto también se sometieron a análisis detallados de las concentraciones de monosacárido y disacárido.

Control de las condiciones de reacción: El hidrolizado se diluyó con agua desionizada (DI) y se tamponó hasta un % de TS y pH deseados. Se añadió la solución enzimática y el matraz se mantuvo a una temperatura seleccionada con agitación a lo largo de la incubación. Se tomaron muestras de acuerdo con el programa experimental, y la enzima se desnaturizó con calentamiento y se filtró.

Análisis de los sacáridos:

La composición de sacáridos de las muestras se analizó mediante una HPLC usando un Varian Prostar® y un Rezex RSO-Oligosaccharide Ag+, columna y precolumna de 10 x 200 mm, en las siguientes condiciones:

Temp. de la columna: 80 °C, Fase móvil: Agua (calidad HPLC), Caudal: 0,3 ml/min, Inyección: 5-10 μ l (dependiendo de la concentración de azúcares), Detector: IR, Temperatura del detector: 40 °C. Los resultados de la HPLC de los grupos de DP se proporcionan en área en %, el eje x de las gráficas representa el tiempo (h), y el eje y, el área en %.

DP significa grado de polimerización, de forma que DP1 se refiere a todos los monosacáridos, DP2 son todos los disacáridos, DP3 son todos los trisacáridos y DP>3 se refiere a oligosacáridos que contienen más de tres unidades de azúcar (los grupos de DP se proporcionan como % del área).

Ejemplo 1:

Hidrólisis enzimática ilustrativa de un hidrolizado desacidificado con un 30 % de TS usando Spirizyme

Con objeto de evaluar la influencia de las cantidades de enzima sobre el rendimiento de monosacárido total, se tituló la cantidad de enzima y se midió la eficacia de la hidrólisis enzimática.

En una primera serie de experimentos de hidrólisis enzimática se emplearon Spirizyme Fuel HS y Liquozyme SC DS.

Se hidrolizó un hidrolizado de madera de pino con un 30 % de TS a pH 4,9 con 3 mg de solución enzimática/1 g de azúcar al 100 % a una temperatura de 62 °C con agitación (la enzima era un 0,3 %). Los resultados se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Spirizyme Fuel HS (3 mg de solución enzimática/1 g de azúcar al 100 %)

Tiempo (h)	DP1 (% del área)	DP2 (% del área)	DP3 (% del área)	DP > 3 (% del área)
0	45,7	31,8	13,7	8,8
2,5	51,2	31,5	12,2	5,0
4,0	51,4	31,5	11,8	5,3
24	56,2	28,2	11,0	4,6

Con objeto de evaluar el impacto de cantidades crecientes de enzima, se emplearon 33 mg de solución enzimática/1 g de azúcar al 100 %. Los resultados se resumen en la tabla 2.

Tabla 2: Spirizyme Fuel HS (33 mg de solución enzimática/1 g de azúcar al 100 %)

Tiempo (h)	DP1 (% del área)	DP2 (% del área)	DP3 (% del área)	DP > 3 (% del área)
0	45,7	31,8	13,7	8,8
2,5	64,0	26,8	7,0	2,3
4,0	65,1	26,2	6,4	2,3

Los resultados resumidos en las tablas 1 y 2 muestran una tendencia a un aumento en la proporción de sacáridos DP1 y DP2 en detrimento de los sacáridos DP3 y DP>3. Esta tendencia aumentó en función del tiempo.

Con objeto de evaluar aún más el impacto de cantidades crecientes de enzima, se emplearon 65,6 mg de solución enzimática/1 g de azúcar al 100 %. Los resultados se resumen en la tabla 3.

Tabla 3: Spirizyme Fuel HS (65,6 mg de solución enzimática/1 g de azúcar al 100 %)

Tiempo (h)	DP1 (% del área)	DP2 (% del área)	DP3 (% del área)	DP > 3 (% del área)
0	45,7	31,8	13,7	8,8
2,5	68,2	26,8	7,0	2,3
4,0	68,1	26,2	6,4	2,3

Los resultados presentados en la tabla 3 indican que es posible aumentar aún más el rendimiento monosacáridos.

Con objeto de evaluar aún más el impacto de cantidades crecientes de enzima, se emplearon 282,6 mg de solución enzimática/1 g de azúcar al 100 %. Los resultados se resumen en la tabla 4.

Tabla 4: Spirizyme Fuel HS (282,6 mg de solución enzimática/1 g de azúcar al 100 %)

Tiempo (h)	DP1 (% del área)	DP2 (% del área)	DP3 (% del área)	DP > 3 (% del área)
0	45,7	31,8	13,7	8,8
2,5	70,6	22,4	5,6	1,5
4,0	71,1	21,6	5,5	1,8

Los resultados resumidos en las tablas 1 a 4 indican que pueden emplearse enzimas capaces de hidrolizar enlaces alfa para aumentar las concentraciones de monosacárido en hidrolizados ácidos de celulosa. La dosis de enzima de 282,6 mg proporcionó el mayor rendimiento de monosacáridos.

Sin embargo, otras condiciones pueden contribuir a los resultados de la hidrólisis enzimática. Otras condiciones ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, la temperatura de reacción, la naturaleza exacta de los azúcares en el hidrolizado en términos tanto del tipo de enlace como de la distribución de la longitud del oligómero.

EJEMPLO 2:

Influencia del %de TS sobre la hidrólisis enzimática de un hidrolizado desacidificado usando Spirizyme

Con objeto de evaluar la influencia del % de TS en el sustrato sobre el rendimiento de monosacárido total, se tituló de nuevo la cantidad de enzima frente a un hidrolizado similar al usado en el ejemplo 1, pero con cantidades decrecientes del % de TS, y se midió la eficacia de la hidrólisis enzimática.

Se hidrolizó un hidrolizado de madera de pino con un 15 % de TS a pH 5,1 con 72,8 mg de solución enzimática/1 g de azúcar al 100 % a una temperatura de 60 °C con agitación (enzima -243 de la recomendación del fabricante). Los resultados se resumen en la tabla 5. Este experimento confirma los resultados presentados en la tabla 2 del ejemplo 1 y sugiere que las soluciones de azúcares más diluidas son más susceptibles a la hidrólisis enzimática.

Tabla 5: Spirizyme Fuel HS (72,8 mg de solución enzimática/1 g de azúcar al 100 %)

Tiempo (h)	DP1 (% del área)	DP2 (% del área)	DP3 (% del área)	DP > 3 (% del área)
0	45,7	31,8	13,7	8,8

(continuación)

Tiempo (h)	DP1 (% del área)	DP2 (% del área)	DP3 (% del área)	DP > 3 (% del área)
2,5	71,3	20,6	6,1	2,1
4,0	71,8	21,0	4,9	2,3
5,8	71,8	20,2	5,7	2,3
24	71,1	24,3	3,4	1,2
50	76,0	17,9	4,7	1,4

Se hidrolizó un hidrolizado de madera de pino con un 5 % de TS a pH 5,0 con 67 mg de solución enzimática/1 g de azúcar al 100 % a una temperatura de 62 °C con agitación (enzima -233 veces la recomendación del fabricante). Los resultados se resumen en la tabla 6. Este experimento confirma los resultados presentados en la tabla 2 del ejemplo 1 y sugiere que las soluciones de azúcares más diluidas son más susceptibles a la hidrólisis enzimática.

Tabla 6: Spirizyme Fuel HS (67 mg de solución enzimática/1 g de azúcar al 100 %)

Tiempo (h)	DP1 (% del área)	DP2 (% del área)	DP3 (% del área)	DP > 3 (% del área)
0	49,8	31,3	12,9	6,1
2,5	72,0	20,4	5,4	2,2
24	75,4	17,8	5,0	1,8
50	74,7	19,7	4,3	1,3
72	77,8	16,2	4,8	1,2
96	77,1	15,7	4,9	2,3

Los resultados presentados en la tabla 6 confirman que pueden emplearse enzimas capaces de hidrolizar enlaces alfa para aumentar las concentraciones de monosacárido en hidrolizados ácidos de celulosa.

La comparación de los resultados presentados en la tabla 6 con aquellos presentados en las tablas 2 y 5 sugieren que la dilución de las soluciones de azúcar antes de la hidrólisis enzimática contribuye a un aumento en el rendimiento de monosacárido.

De nuevo, la naturaleza exacta de los azúcares en el hidrolizado en términos tanto del tipo de enlace como de la distribución de la longitud del oligómero puede influir en el rendimiento total de monosacáridos.

EJEMPLO 3:**Hidrólisis enzimática de un hidrolizado desacidificado con un 30 % de TS usando Liquozyme SC DS**

Con objeto de determinar si los resultados presentados anteriormente eran específicos de la enzima, se realizó un experimento adicional con un hidrolizado con un 30 % de TS usando Liquozyme. Se hidrolizó un hidrolizado de madera de pino con un 30 % de TS a pH 6,0 con 282,6 mg de solución enzimática/1 g de azúcar al 100 % a una temperatura de 85 °C con agitación (enzima -942 veces la recomendación del fabricante para Spirizyme). Los resultados se resumen en la tabla 7. Este experimento confirma los resultados presentados en la tabla 2 del ejemplo 1 y sugiere que las soluciones de azúcares más diluidas son más susceptibles a la hidrólisis enzimática.

Tabla 7: Liquozyme SC DS (282,6 mg de solución enzimática/1 g de azúcar al 100 %)

Tiempo (h)	DP1 (% del área)	DP2 (% del área)	DP3 (% del área)	DP > 3 (% del área)
0	45,7	31,8	13,7	8,8
4,0	59,8	27,1	8,4	4,5

Los resultados presentados en la tabla 7 indican que la capacidad de las enzimas capaces de hidrolizar enlaces alfa para aumentar las concentraciones de monosacárido en hidrolizados ácidos de celulosa no es específica de Spirizyme Fuel HS.

Estos resultados también sugieren que Liquozyme SC DS proporciona un mayor rendimiento de monosacáridos que

Spirizyme Fuel HS a 282,6 mg de solución enzimática/1 g de azúcar al 100 % (véase la tabla 4 para comparar). Sin embargo, la conveniencia de una enzima con respecto a otra también puede verse afectada por otras consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, disponibilidad, pureza, especificidad de enlace y precio.

5 EJEMPLO 4:

Hidrólisis enzimática de un hidrolizado de un bagazo de caña de azúcar desacidificado con diversas enzimas

10 Con objeto de evaluar la posibilidad de aplicar la hidrólisis enzimática a hidrolizados de sustratos no leñosos, se realizó una serie de experimentos con hidrolizados preparados a partir de bagazo de caña de azúcar. Los hidrolizados usados contenían diferentes TS (5 %, 20 %), diversas enzimas los experimentos se realizaron a pH 4,5-5,1, y a varias temperaturas (50 °C y 60 °C). También se variaron las dosis de carga de las enzimas.

15 Se realizó un primer experimento usando Spezyme Alpha a una concentración de 34,2 mg de solución enzimática/1 g de azúcar al 100 %, a una temperatura de 60 °C y a pH 5,1, aplicada a un hidrolizado de bagazo con un 20 % de TS. Los resultados se resumen en la tabla 8.

Tabla 8: Spezyme Alpha aplicada a un hidrolizado de bagazo con un 20 % de TS (34,2 mg de solución enzimática; aproximadamente 137 veces la recomendación del fabricante)

Tiempo (h)	DP1 (% del área)	DP2 (% del área)	DP3 (% del área)	DP > 3 (% del área)
0	52,0	35,4	10,6	1,9
2,5	52,0	34,9	10,8	2,3
4,0	53,6	34,2	10,1	2,1
24	52,4	35,1	10,3	2,2
50	51,7	35,1	10,9	2,3

20 Se realizó un experimento adicional usando Transglucosidase L-2000 a una concentración de 14,8 mg de enzima /1 g de azúcar al 100 % a una temperatura de 60 °C a pH 5,0 aplicada a un hidrolizado de bagazo con un 20 % de TS. Los resultados se resumen en la tabla 9.

25 **Tabla 9:** Transglucosidase L-2000 aplicada a un hidrolizado de bagazo con un 20 % de TS (14,8 mg enzima; aproximadamente 148 veces la recomendación del fabricante)

Tiempo (h)	DP1 (% del área)	DP2 (% del área)	DP3 (% del área)	DP > 3 (% del área)
0	52,0	35,4	10,6	1,9
2,5	57,9	29,7	10,0	2,4
4,0	62,0	26,8	9,1	2,2
24	62,7	27,0	8,5	1,8
50	62,2	27,1	8,7	2,0

30 Los resultados resumidos en las tablas 8 y 9 indican que la Transglucosidase L-2000 proporciona un aumento en monosacáridos en el hidrolizado de bagazo, mientras que Spezyme Alpha no proporciona dicho aumento.

Los resultados de la Transglucosidase L-2000 (tabla 9) confirman que pueden usarse enzimas capaces de hidrolizar enlaces alfa para aumentar el rendimiento de monosacáridos.

35 Los resultados negativos de la Spezyme Alpha presentados en la tabla 8 sugieren que puede haber inhibidores presentes en el hidrolizado. En esta fase no está claro si estos inhibidores son específicos del sustrato sometido a la hidrólisis ácida inicial (por ejemplo, bagazo de caña de azúcar por oposición a madera de pino) o son específicos de la enzima.

40 EJEMPLO 5:

Composición de sacáridos de los hidrolizados de una primera madera de pino

45 Con objeto de obtener una mezcla de azúcares, se introdujo una primera madera de pino seca en una serie de reactores de hidrólisis de seis fases en un funcionamiento a contracorriente como se describe en la solicitud provisional de EE.UU. en trámite 61/48377 presentada el 9 de mayo de 2011 y titulada "Hydrolysis systems and methods". Esta

solicitud se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

En resumen, se introdujo una solución acuosa de HCl al 42 % de forma continua a una temperatura de 10-15 °C durante 24 horas. El hidrolizado se recogió, el HCl se eliminó por extracción y el hidrolizado desacidificado se concentró para dar una composición de azúcar. La composición se analizó mediante una HPLC, los azúcares totales de la muestra eran el 74,3 %. Los resultados del análisis de monosacáridos y disacáridos se resumen en las tablas 10 y 11, respectivamente. Los resultados se calculan como el % a partir de los sacáridos refractivos totales de la muestra (%/RTS).

Tabla 10: Monosacáridos en el hidrolizado de la primera madera de pino

Ramnosa	Arabinosa	Galactosa	Glucosa	Xilosa	Manosa	Suma
0,1	1,6	2,7	27,7	7,0	7,4	46,5

Tabla 11: Disacáridos en el hidrolizado de la primera madera de pino

Trehalosa	Isomaltosa	Gentiobiosa	Celobiosa	Nigerosa	Soforosa	Otros DP2	Suma
1,4	4,8	1,0	0,7	0,4	0,2	14,5	22,9

Los resultados, resumidos en la tabla 10, ilustran la presencia de pentosas tales como arabinosa y xilosa y ramnosa (desoxipentosa). Dado que estas pentosas tienden a degradarse en unas condiciones ácidas rigurosas, su presencia sugiere que el diseño a contracorriente del reactor de hidrólisis contribuye a un efecto de "ahorro de pentosa".

Los resultados resumidos en la tabla 11 ilustran la presencia de diglucosa unida por alfa, tales como trehalosa e isomaltosa, V diglucosa unida por beta, tales como gentiobiosa y soforosa.

EJEMPLO 6:

Composición de sacáridos de los hidrolizados de una segunda madera de pino

De forma similar, se hidrolizó una segunda madera de pino, se desacidificó y se concentró hasta un 77 % de TS.

Los resultados del análisis de monosacáridos y disacáridos se presentan en las tablas 12 y 13, respectivamente. Los resultados se calculan como el % a partir de los sacáridos refractivos totales de la muestra (%/RTS).

Tabla 12: monosacáridos en el hidrolizado de la segunda madera

Arabinosa	Galactosa	Glucosa	Xilosa	Manosa	Suma
0,3	0,8	36	8	1,0	46

Tabla 13: resultados de los disacáridos en el hidrolizado de la segunda madera

Trehalosa	Isomaltosa	Gentiobiosa	Celobiosa	Nigerosa	Maltosa	Otros DP2	Suma
1,1	6,6	2,1	2,1	0,4	0,4	28	41

La segunda madera de pino también contenía un 16,7 % de oligosacáridos superiores.

Los resultados resumidos en las tablas 12 y 13 confirman la presencia de pentosa, de diglucosa unida por alfa y de diglucosa unida por beta. Hay diferencias en los perfiles de sacárido de los hidrolizados de las dos fuentes de pino.

EJEMPLO 7:

Composición de sacáridos de un hidrolizado preparado a partir de sustratos de madera que no es de pino

Con objeto de evaluar el efecto de la composición del sustrato sobre la composición del hidrolizado en términos de azúcares específicos, se analizaron los hidrolizados desacidificados preparados a partir de bagazo de caña de azúcar y madera de eucalipto como en el ejemplo 6.

Los resultados del análisis de monosacáridos y disacáridos del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar se presentan en las tablas 14 y 15, respectivamente. Los resultados se calculan como el % a partir de los sacáridos refractivos totales de la muestra (%/RTS).

Tabla 14: resultados de los monosacáridos en el hidrolizado de bagazo de caña de azúcar

Arabinosa	Galactosa	Glucosa	Xilosa	Manosa	Fructosa	Suma
2,2	7,2	48,7	4,9	4,8	2,4	70,2

Tabla 15: resultados de los disacáridos en el hidrolizado de bagazo de caña de azúcar

Isomaltosa	Gentiobiosa	Maltosa	Otros DP2	Suma
4,5	0,6	2,9	27	35

5 Los resultados del análisis de monosacáridos y disacáridos del hidrolizado de madera de eucalipto se presentan en las tablas 16 y 17, respectivamente. Los resultados se calculan como el % a partir de los sacáridos refractivos totales de la muestra (%/RTS).

Tabla 16: resultados de los monosacáridos en el hidrolizado de madera de eucalipto

Arabinosa	Galactosa	Glucosa	Xilosa	Manosa	Fructosa	Suma
2,6	7,24	46,1	8,27	5,83	3,38	73,42

10

Tabla 17: resultados de los disacáridos en el hidrolizado de azúcar de madera de eucalipto

Isomaltosa	Celobiosa	Maltosa	Otros DP2	Suma
7,1	1,85	2,16	11,11	22

Los resultados presentados en las tablas 14 a 17, tomados junto con los resultados presentados en las tablas 10 a 13, sugieren que el sustrato usado para la hidrólisis ácida inicial puede influir en el perfil de sacáridos del hidrolizado desacidificado resultante.

15

REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende:

- 5 (a) hidrólisis de un material lignocelulósico en un medio que contiene HCl en una relación con respecto a (HCl + agua) $\geq 0,37$ en peso para formar un hidrolizado que comprende sacáridos totales en una relación con respecto a (sacáridos totales + agua) $\geq 0,20$ en peso; y
(c) desacidificación de dicho hidrolizado para formar un hidrolizado desacidificado que comprende:
- 10 (i) monosacáridos, en donde los monosacáridos comprenden una pentosa en una relación con respecto a los sacáridos totales $\geq 0,05$; y
(ii) oligosacáridos en una relación con respecto a los sacáridos totales $\geq 0,06$, en donde los oligosacáridos comprenden disacáridos en una relación con respecto a los sacáridos totales $\geq 0,05$, en donde los disacáridos comprenden al menos una diglucosa unida por alfa y al menos una diglucosa unida por beta;
- 15 en donde dicha desacidificación comprende (i) extraer el hidrolizado con un primer extractante que incluye un disolvente S1 para formar un primer extracto portador de HCl y una solución de azúcar empobrecida en HCl, y que comprende además la eliminación del HCl residual en dicha solución de azúcar empobrecida en HCl mediante al menos una de (ii-a) una separación cromatográfica y (ii-b) una extracción con un segundo extractante que incluye S1 y un segundo disolvente S2;
- 20 en donde el disolvente S1 es un disolvente orgánico con una solubilidad en agua menor del 15 % y **caracterizado por** un componente relacionado con la polaridad del parámetro de cohesión de Hoy (delta-P) de entre 5 y 10 MPa^{1/2} y/o por un componente relacionado con los puentes de hidrógeno del parámetro de cohesión de Hoy (delta-H) de entre 5 y 20 MPa^{1/2}, y que es un disolvente seleccionado del grupo que consiste en alcoholes, cetonas y aldehídos que tienen al menos 5 átomos de carbono; y
- 25 en donde el disolvente S2 es un disolvente orgánico con una solubilidad en agua de al menos el 30 % y **caracterizado por** un delta-P mayor de 8 MPa^{1/2} y/o un delta-H mayor de 12 MPa^{1/2}, y que es un disolvente seleccionado del grupo que consiste en mono- o polialcoholes C1-C4, aldehídos y cetonas.
- 30 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el hidrolizado desacidificado comprende sacáridos totales en una relación con respecto a (sacáridos totales + agua) $\geq 0,35$.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el hidrolizado desacidificado tiene una relación entre el HCl y los sacáridos totales de $\leq 0,03$ en peso.
- 35 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el hidrolizado desacidificado tiene oligosacáridos superiores en una relación con respecto a los sacáridos totales $\leq 0,2$.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde una relación de al menos una de dicha diglucosa unida por alfa y dicha diglucosa unida por beta con respecto a los sacáridos totales es (i) $> 0,01$ en el hidrolizado desacidificado o (ii) $> 0,03$ en el hidrolizado desacidificado.
- 40 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha diglucosa unida por alfa incluye al menos una de maltosa, isomaltosa y trehalosa.
- 45 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha diglucosa unida por beta incluye al menos una de gentiobiosa, sofrosa y celobiosa.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el disolvente S1 es hexanol o 2-etilhexanol.
- 50 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la eliminación del HCl residual en la solución de azúcar empobrecida en HCl mediante (ii-a) una separación cromatográfica.
- 55 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha etapa de hidrólisis (a) forma dicho hidrolizado y lignina residual, y dicho método comprende además: (b) separar dicho hidrolizado de dicha lignina residual antes de dicha etapa de desacidificación (c).
- 60 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además (d) hidrolizar enzimáticamente el hidrolizado desacidificado con una enzima capaz de catalizar la hidrólisis de los enlaces alfa en la mezcla de forma que al menos un 10 % de los disacáridos se conviertan en monosacáridos.
12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además
- 65 (e) proporcionar un fermentador; y
(f) fermentar un medio que comprende el hidrolizado desacidificado en dicho fermentador para producir un producto

de fermentación.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho método comprende además:

- 5 (g1) procesar dicho producto de fermentación para producir un artículo de consumo seleccionado del grupo que consiste en detergente, productos basados en polietileno, productos basados en polipropileno, productos basados en poliolefina, productos basados en ácido poliláctico (polilactida), productos basados en polihidroxialcanoato y productos basados en poliacrílico; o
- 10 (g2) producir un artículo de consumo que comprende el producto de fermentación, en donde dicho producto de fermentación es al menos uno seleccionado entre ácidos carboxílicos y grasos, ácidos dicarboxílicos, ácidos hidroxilcarboxílicos, ácidos hidroxil dicarboxílicos, ácidos hidroxilgrasos, metilglioxal, mono-, di- o polialcoholes, alcanos, alquenos, aromáticos, aldehídos, cetonas, ésteres, biopolímeros, proteínas, péptidos, aminoácidos, vitaminas, antibióticos y productos farmacéuticos; o
- 15 (g3) producir un artículo de consumo que comprende el producto de fermentación, en donde dicho artículo de consumo es gasolina enriquecida en etanol, combustible para reactores o biodiésel.

Fig. 1

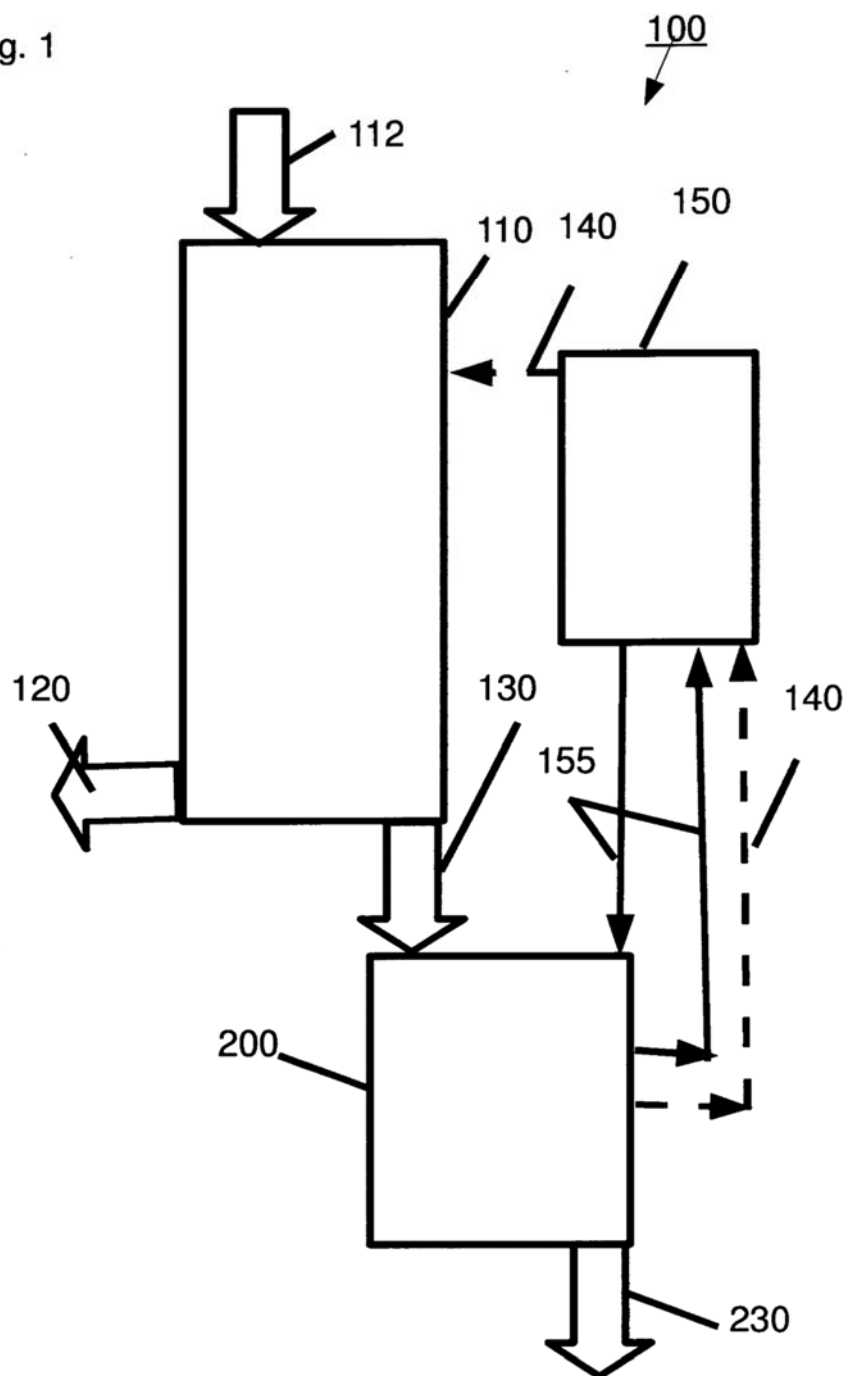


Fig. 2a

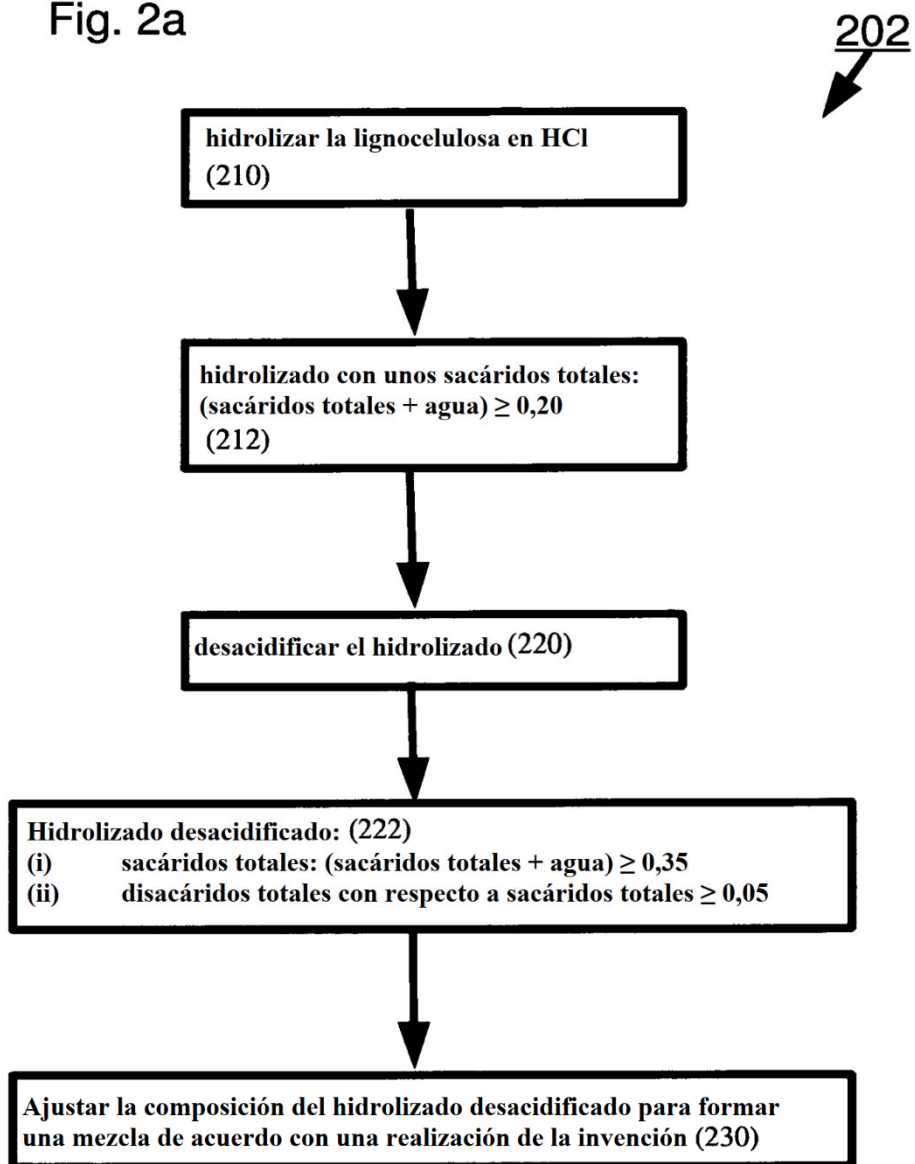


Fig. 2b

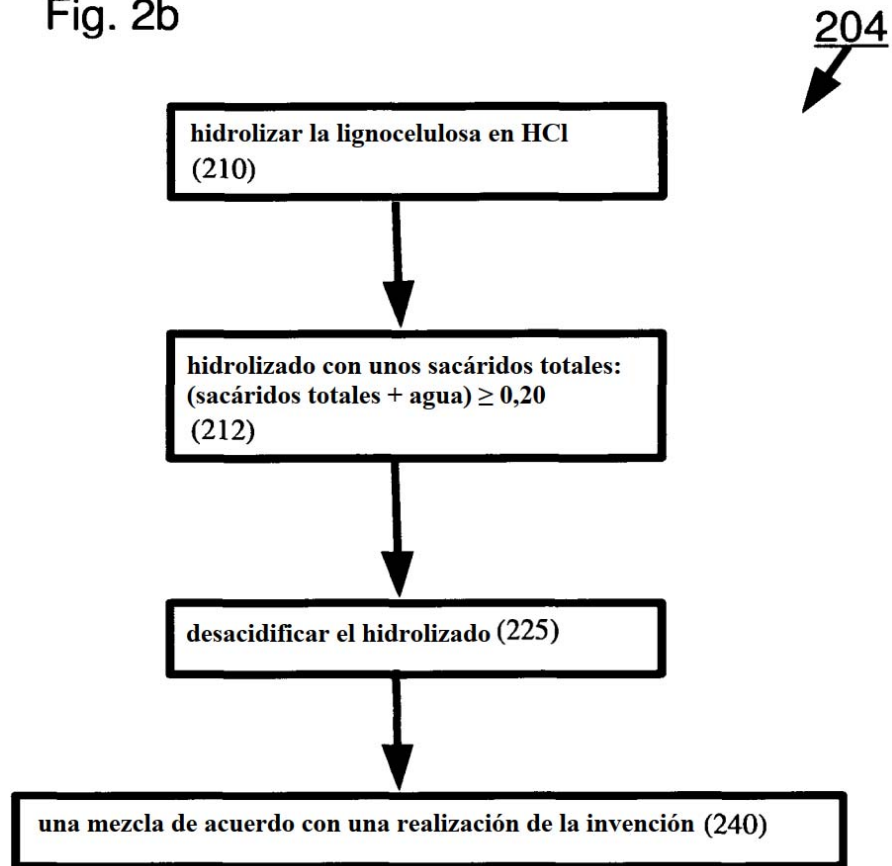


Fig. 3

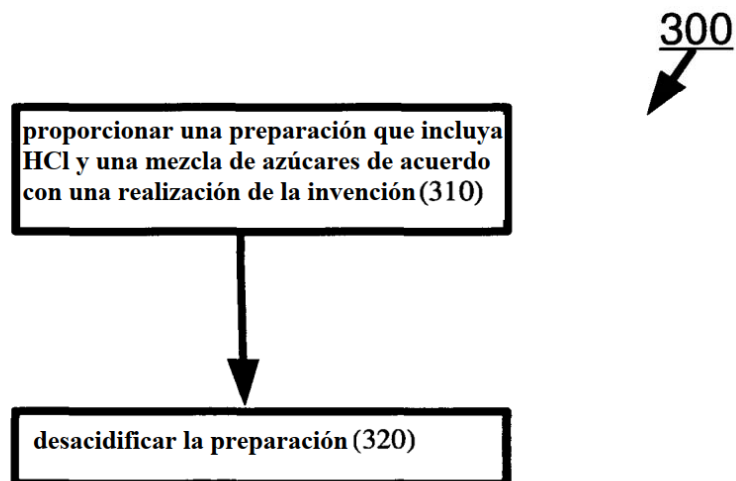


Fig. 4a

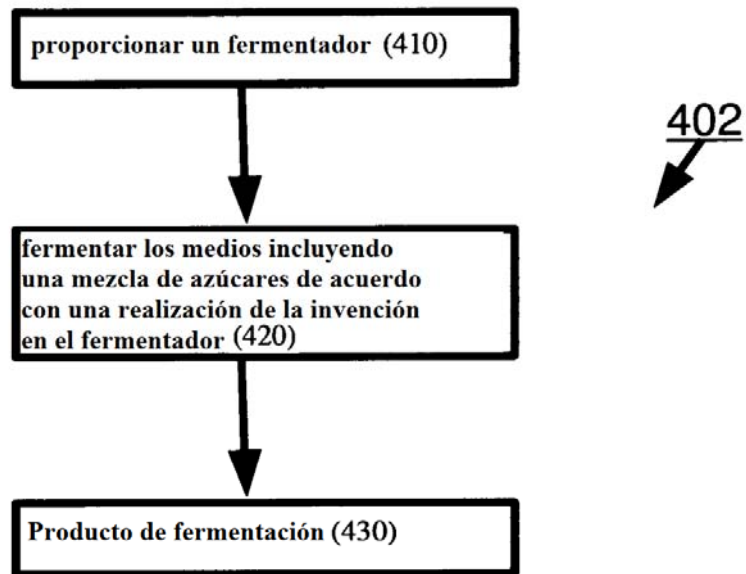


Fig. 4b

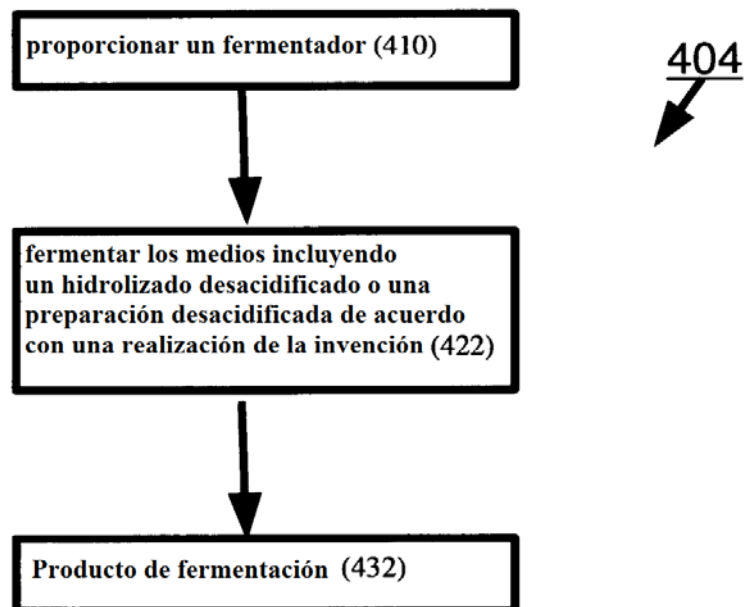


Fig. 5

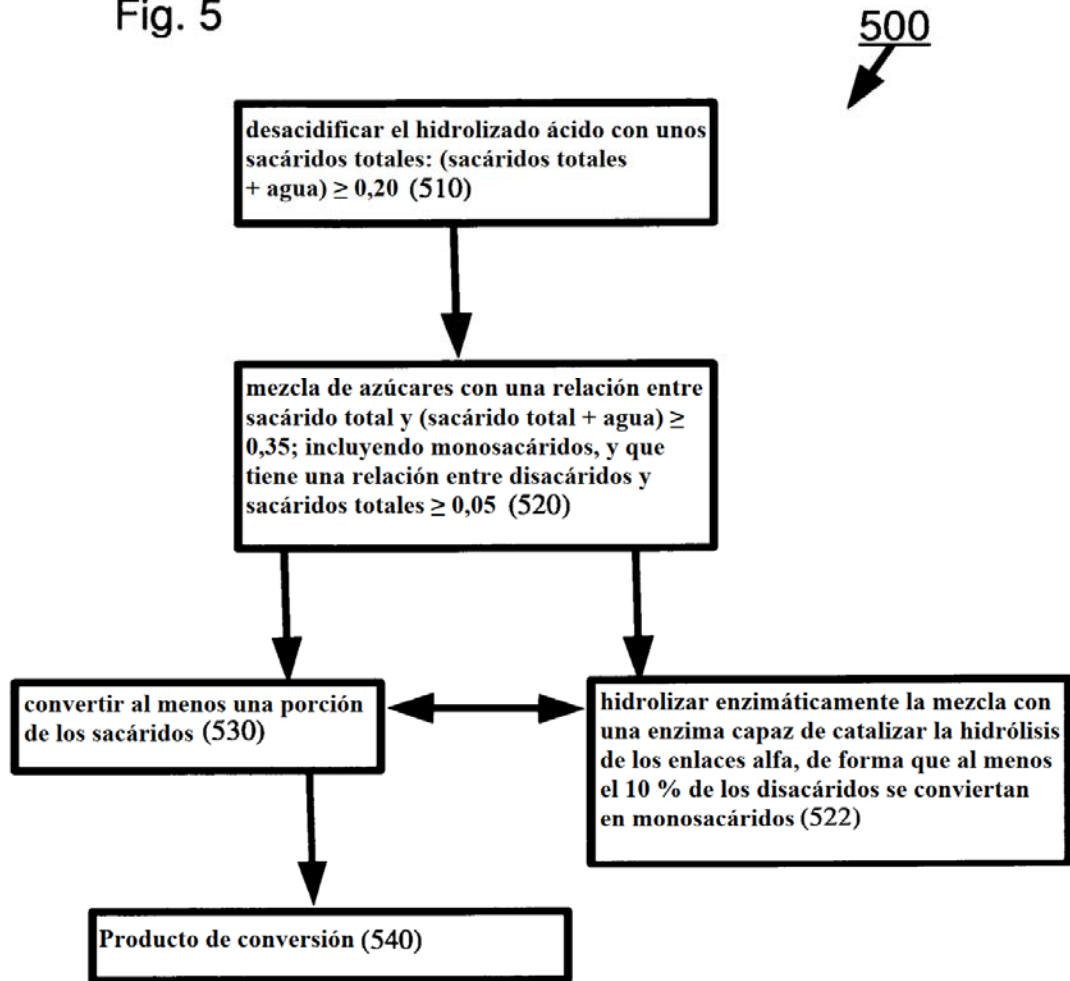


Fig. 6

