

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 448**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 5/02 (2006.01)

C12P 7/02 (2006.01)

C12P 7/40 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

C12P 13/04 (2006.01)

C12P 17/10 (2006.01)

C12P 19/28 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2015 PCT/EP2015/061072**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015 WO15177189**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2015 E 15723515 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3146061**

54 Título: **Procedimiento para la hidrólisis de material lignocelulósico, en el que el hidrolizado se usa para la producción de hidrolasa microbiana**

30 Prioridad:
21.05.2014 EP 14001784

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.03.2021

73 Titular/es:
**CLARIANT INTERNATIONAL LTD (100.0%)
Rothausstrasse 61
4132 Muttenz, CH**

72 Inventor/es:
**ZAVREL, MICHAEL;
DENNEWALD, DANIELLE;
BARTUCH, JOERG y
MARCKMANN, HENNING**

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 809 448 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

Procedimiento para la hidrólisis de material lignocelulósico, en el que el hidrolizado se usa para la producción de hidrolasa microbiana

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la hidrólisis autosuficiente de material lignocelulósico. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un producto orgánico.

Debido a los recursos limitados de hidrocarburos y a las demandas para reducir las emisiones de CO₂, la industria química busca vías de producción más sostenibles para la fabricación de productos químicos de consumo tales como combustibles líquidos y productos químicos de base. Una parte de esta estrategia se centra en la conversión de biomasa lignocelulósica en productos químicos o combustibles versátiles, como el etanol. La biomasa lignocelulósica contiene celulosa (aproximadamente de 25 a 40 % en porcentaje de peso sobre peso de extracto seco), hemicelulosa (aproximadamente de 15 a 25 % en porcentaje de peso sobre peso de extracto seco) y lignina (aproximadamente de 15 a 30 % en porcentaje de peso sobre peso de extracto seco) como principales componentes y cantidades menos importantes de otros carbohidratos, ceras, proteínas y compuestos inorgánicos. Entre las formas de biomasa procedente de plantas, la biomasa lignocelulósica derivada de cualquier flujo de residuos de agricultura o forestal, como residuos de madera y paja de cereales, es especialmente adecuada para su conversión en productos químicos y combustibles de consumo, debido a su disponibilidad, bajo coste y y producción medioambiental responsable. Adicionalmente, los análisis de ciclo de vida de los procesos de producción que utilizan materias primas lignocelulósicas indican emisiones de gases de efecto invernadero menores que en los procesos que se basan en otras materias primas.

20 Se han descrito diversas opciones de procesos que describen la conversión de biomasa lignocelulósica en etanol y otros productos químicos básicos (Pejo et al. 2008). Para llevar a cabo estos procesos a escala industrial es especialmente conveniente transferir la máxima cantidad de energía, carbono y contenido de masa contenidos en las materias primas renovables a los productos finales. Hasta el presente ninguno de los procesos de conversión escritos ha conseguido esto de manera completa.

25 Ejemplos de operaciones unitarias para la conversión biotecnológica de material lignocelulósico (por ejemplo, paja) en productos de valor añadido (por ejemplo, etanol) son: desencolado mecánico y/o pretratamiento fisicoquímico, hidrólisis enzimática, fermentación y recuperación de producto. Para establecer una eficiencia de proceso máxima, es preceptivo convertir la máxima cantidad de polisacáridos en azúcares solubles durante la operación unitaria de hidrólisis enzimática.

30 En relación con la producción de etanol celulósico a escala industrial, la principal barrera es todavía el coste necesario para la hidrólisis enzimática eficiente de la lignocelulosa pre-tratada a concentraciones de sólidos altas.

De este modo, se ha identificado la hidrólisis de la fracción de celulosa como uno de los principales obstáculos en la conversión de la lignocelulosa en etanol. En la actualidad, el coste de las enzimas y el rendimiento necesario para la hidrólisis eficiente de la biomasa son los cuellos de botella principales.

35 La descomposición de la pasta de biomasa pre-tratada en azúcares monoméricos fermentables se puede llevar a cabo mediante hidrólisis tanto ácida como catalizada por enzimas. La hidrólisis enzimática es más selectiva y necesita menos energía que las metodologías químicas comparables (tal como la basada en ácidos), proporcionando de esta forma economías de proceso más favorables y rendimientos de etanol potencialmente más altos durante la fermentación.

40 Los sistemas enzimáticos adecuados que convierten los azúcares poliméricos tales como la celulosa o la hemicelulosa en monómeros hexosa (esto es, glucosa) o pentosa (es decir, xilosa) contienen típicamente actividades celulasa, hemicelulasa y beta-glucosidasa. Los sistemas enzimáticos que contienen actividades de celulasa y beta-glucosidasa se producen a menudo en cultivos de hongos sumergidos en líquidos, por ejemplo, *Trichoderma* sp. y/o *Aspergillus* sp. Habitualmente, los restos de la biomasa de los hongos se separan del caldo de fermentación y se desechan. Luego, el caldo de fermentación se concentra, se estabiliza y se formula para preparar el producto de enzimas resultante que se expide.

Según Kristensen et al. (2009) la hidrólisis enzimática de biomasa se realiza con frecuencia con un contenido bajo de sólidos de entre 10 y 20 % en proporción de peso sobre peso. Un contenido de sólidos superior al 15 % en peso conduce a menudo a pérdidas significativas en los rendimientos de azúcares monoméricos. Este efecto se debe a los problemas asociados a la mezcla homogénea de pastas con alto contenido de sólidos que llevan a una distribución no homogénea de enzimas. Además, la acumulación de productos finales como celobiosa y glucosa liberados durante la hidrólisis enzimática puede conducir a la inhibición inherente de las actividades de la celulasa y la beta-glucosidasa (Xiao et al., 2004a).

55 Rao et al. (1985) indican la utilización de la pasta de fermentación completa de los hongos para una hidrólisis eficiente de los sustratos de celulosa. Sin embargo, se usaron medios artificiales para la producción de enzimas, lo que no permite adaptar la producción de enzimas de hidrólisis a una materia prima o a una opción de pretratamiento específicas y, en consecuencia, la eficiencia de la producción de enzimas es bastante baja. Tolan describe en Clean

Techn. Environ. Policy 3 (2002) 339-345 en "logen's process for producing ethanol from cellulosic biomass" ("Procedimiento logen para producir etanol a partir de biomasa celulósica") el uso del caldo bruto, obtenido a partir de la hidrólisis, como medio para la producción de enzimas para ahorrar costes de proceso. Otro inconveniente de los métodos descritos por Rao et al. y Tolan es la limitación a las actividades enzimáticas secretadas, porque no se realiza nada para facilitar la liberación de las enzimas no secretoras o enlazadas a la superficie de las células.

L.-K. Ju y O.A. Afolabi describen en "Wastepaper Hydrolysate as Soluble Inducing Substrate for Cellulase Production in Continuous Culture of Trichoderma reesei", ("Hidrolizado de pasta de papel como sustrato inductor soluble para la producción de celulasa en el cultivo en continuo de Trichoderma reesei"), Biotechnology Progress 15 (1999) 91-97, un procedimiento para la hidrólisis enzimática autosuficiente de material que contiene lignocelulosa que comprende las etapas de:

- (a) someter un material que contiene lignocelulosa a un pretratamiento en un dispositivo de pretratamiento;
- (b) poner en contacto el material que contiene lignocelulosa pretratado de la etapa (a) con al menos una hidrolasa, en un recipiente de hidrólisis, para formar un hidrolizado;
- (c) separar el hidrolizado y, posteriormente, dividirlo en dos partes (i) y (ii), donde la parte (i) se dirige a un recipiente de cultivo;
- (d) fermentar la parte (i) del hidrolizado con al menos un hongo capaz de producir al menos una enzima que pertenece al grupo de las hidrolasas; y
- (e) redirigir el fermentado hidrolizado de la etapa (d) al recipiente de hidrólisis de la etapa (b),

en el que el material que contiene lignocelulosa pretratado se trata para eliminar al menos una sustancia inhibidora de al menos una enzima y/o al menos un microorganismo y/u hongo.

Las técnicas convencionales para la degradación de biomasa previamente mencionadas son o bien ineficientes o bien dependen de la adición a tiempo y con alto coste de enzimas o mezclas de enzimas comerciales producidas separadamente que son adecuadas para la degradación de biomasa específica.

Además, tampoco el uso de caldo o pasta en bruto soluciona estos inconvenientes, puesto que conduce no solamente a la provisión de los azúcares necesarios para la fermentación fúngica, sino que también importará de manera inevitable diferentes sustancias no deseadas inhibidoras y/o tóxicas al proceso de fermentación. De este modo, la ventaja de usar un medio de fermentación barato se ve compensada por un grave inconveniente en cuanto a la eficiencia en lo que se refiere a la producción de enzimas.

En el documento de la patente EP 2 471 940 se describe un procedimiento de hidrólisis de lignocelulosa eficiente con producción de enzimas integrada. En este procedimiento, el medio para la fermentación de enzimas contiene grandes cantidades de sólidos en suspensión. Para mejorar aún más la economía, el objetivo de la invención es desarrollar un procedimiento de hidrólisis de lignocelulosa y fermentación con enzimas con una cantidad de sólidos suspendidos e inhibidores minimizada, mientras que la cantidad de carbohidratos solubles se aumenta adicionalmente.

Por tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento mejorado altamente eficiente para la degradación de biomasa, tal como biomasa lignocelulósica.

Los inventores de la presente invención han encontrado ahora, de manera sorprendente, que este objeto de la presente invención se puede conseguir mediante un procedimiento para la hidrólisis enzimática autosuficiente de material que contiene lignocelulosa, que comprende las etapas de:

- (a) someter un material que contiene lignocelulosa a un pretratamiento en un dispositivo de pretratamiento;
- (b) poner en contacto el material que contiene lignocelulosa pretratado de la etapa (a) con al menos una enzima de la clase de las hidrolasas, en un recipiente de hidrólisis, para formar un hidrolizado;
- (c) separar el hidrolizado y, posteriormente, dividirlo en dos partes (i) y (ii), donde la parte (i) se dirige a un recipiente de cultivo;
- (d) fermentar la parte (i) del hidrolizado con al menos un microorganismo y/o un hongo capaz de producir al menos una enzima que pertenece al grupo de las hidrolasas; y
- (e) redirigir el fermentado hidrolizado de la etapa (d) al recipiente de hidrólisis de la etapa (b),

en el que el hidrolizado se trata para eliminar al menos una sustancia inhibidora de al menos una enzima y/o al menos un microorganismo y/u hongo.

El procedimiento para la hidrólisis enzimática de materiales que contienen lignocelulosa de la presente invención es

particularmente ventajoso puesto que es autosuficiente, pero también altamente eficiente, ya que al integrar el hidrolizado de todo el proceso dentro de la etapa de producción de enzimas (d) permitirá la producción económica y la integración in situ de la máxima cantidad de enzimas hidrolíticas adecuadas lo que conduce a una cantidad máxima de carbohidratos solubles. Además, la eliminación de sustancias inhibitoras durante al menos una etapa del proceso

5 facilitará un procedimiento que no solamente puede funcionar de manera autosuficiente sino además de forma continua con alta eficiencia ya que la producción de enzimas hidrolíticas no se ralentizará o inhibirá por sustancias indeseadas, lo cual implica ventajas económicas adicionales.

En la presente invención, debe entenderse que la expresión "material que contiene lignocelulosa" comprende cualquier clase de material que los expertos en la técnica saben que contiene lignocelulosa. Debe entenderse que las expresiones "material que contiene lignocelulosa", "biomasa que contiene lignocelulosa", "material lignocelulósico" y "biomasa lignocelulósica" son sinónimas en el marco de la presente invención. Entre los materiales que contienen lignocelulosa particularmente preferidos según la presente invención se incluyen madera, paja y/o cáscaras de cereales, bagazo, cáscaras de avena, hierba varilla ("switchgrass"), celulosa, pasta de papel en bruto (obtenida en la producción de pasta y papel) y sus mezclas. Fuentes alternativas o componentes adicionales pueden incluir uno o más de los siguientes componentes: celulosa purificada, pasta de papel, suero de leche, melazas o azúcares como glucosa o lactosa. En una realización preferida, el material que contiene lignocelulosa contiene al menos 25 % en peso, preferiblemente 40 % en peso, más preferiblemente al menos 70 % en peso, incluso más preferiblemente al menos 80 % en peso y, lo más preferible, al menos 90 % en peso, de lignocelulosa. Debe entenderse que el material que contiene lignocelulosa puede comprender otros compuestos tales como material proteínico, almidón, azúcares, tal como azúcares fermentables y no fermentables.

En la presente invención, debe entenderse que la expresión "hidrólisis enzimática" indica un proceso en el cual enzimas adecuadas convierten azúcares poliméricos tales como celulosa y hemicelulosa en monómeros de tipo hexosa (por ejemplo, glucosa) y/o pentosa (por ejemplo, xilosa).

En la presente invención, debe entenderse que la expresión "pretratamiento" se refiere a un proceso que conduce a la eliminación al menos parcial y a la separación de la hemicelulosa de la celulosa y a la alteración y ruptura de la cubierta de lignina, con el fin de disminuir la cristalinidad de la celulosa y aumentar de esta forma el área superficial accesible de la celulosa y/o aumentar el tamaño de poro de la celulosa. Preferiblemente, el pretratamiento moviliza la fracción de pentosa del material que contiene lignocelulosa, mientras que al mismo tiempo mejora la digestibilidad de la fracción sólida que contiene celulosa.

Entre los métodos adecuados para el pretratamiento del material que contiene lignocelulosa según la etapa (a) de la presente invención se incluye cualquier tipo de métodos de pretratamiento mecánico, biológico, químico y/o físico conocido por las personas expertas en la técnica. En una realización preferida, el método de pretratamiento se selecciona entre los métodos siguientes: trituración mecánica, tratamiento con ácidos y/o bases, oxidación por vía húmeda, hidrotermólisis a pH controlado y/o explosión con vapor.

Según la presente invención, los procedimientos de "explosión con vapor" comprenden preferiblemente un tratamiento hidrotermal presurizado a una temperatura de 60 a 350 °C, preferiblemente de 80 a 300 °C, especialmente preferida de 100 a 250 °C y, lo más preferible, de 110 a 220 °C, de un material que contiene lignocelulosa en ausencia o presencia de catalizadores ácidos (tales como H₂SO₄, HCl, H₃PO₄) o básicos (por ejemplo, NH₄OH, NaOH, KOH, cal), que se añaden a concentraciones de 0,01 a 15 % (relación de peso a peso), preferiblemente de 0,05 a 12,5 % (peso/peso), más preferiblemente de 0,1 a 10 % (peso/peso) y, lo más preferible, de 0,25 a 7,5 %. En una realización preferida de la presente invención, la presión se selecciona preferiblemente entre 1 y 100 bar, preferiblemente entre 2 y 50 bar, también preferiblemente entre 3 y 25 bar y, lo más preferible, entre 5 y 15 bar. Los tiempos de reacción durante la explosión con vapor tienen que ser seleccionados entre 10 s y 2 h, preferiblemente entre 1 minuto y 1,5 horas y, lo más preferible, entre 5 minutos y 1 hora, para proporcionar una transformación eficiente de los componentes de la biomasa en preparación para hidrólisis enzimática. En una realización especialmente preferida, se realiza un pretratamiento de "trituration mecánica" del material que contiene lignocelulosa antes o durante el pretratamiento de explosión con vapor, en el que la trituración mecánica se realiza mediante un procedimiento escogido entre los del grupo que consiste en procesado mecánico, molienda, picado, troceado, prensado, corte, irradiación, molienda y combinaciones de los mismos.

Según la presente invención, el "pretratamiento ácido" consiste preferiblemente en un tratamiento con ácido suave y/o diluido en continuo, tal como tratamiento con ácido sulfúrico o con otros ácidos orgánicos, como ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, cloruro de hidrógeno o sus mezclas. También se pueden usar otros ácidos. Un "tratamiento ácido suave", según la presente invención, es un tratamiento que se realiza a un pH de 1 a 5, preferiblemente a un pH de 2 a 3 (respecto del material que contiene lignocelulosa). En una realización preferida, el ácido se añade en concentraciones de 0,01 a 15 % en peso (peso/peso), preferiblemente de 0,05 a 12,5 % en peso (peso/peso), más preferiblemente de 0,1 a 10 % en peso (peso/peso) y, lo más preferible, de 0,25 a 7,5 % en peso. Preferiblemente, el ácido es ácido sulfúrico. El ácido se puede poner en contacto con el material que contiene lignocelulosa a una temperatura en el intervalo de 120 a 280 °C, preferiblemente de 135 a 225 °C y más preferiblemente de 150 a 200 °C, durante un período de 1 a 60 minutos, preferiblemente de 2 a 30 minutos y más preferiblemente de 5 a 15 minutos. Se puede aplicar la adición de ácidos fuertes, como el ácido sulfúrico, en realizaciones especialmente preferidas, para eliminar la hemicelulosa.

La expresión “pretratamiento químico”, según la presente invención, se refiere también al tratamiento del material que contiene lignocelulosa con H_2O_2 , ozono, ácidos de Lewis, $FeCl_3$, $Al_2(SO_4)_3$ en alcoholes acuosos, glicerol, dioxano, fenol, etilenglicol, NaOH, Na_2CO_3 y/o amoníaco. Las concentraciones, temperaturas y tiempos de aplicación se escogen de manera análoga a las referenciadas previamente en relación con el pretratamiento ácido.

- 5 Según la presente invención, un “pretratamiento de oxidación por vía húmeda” supone el uso de agentes oxidantes, tal como agentes oxidantes a base de sulfitos.

La expresión “tritución mecánica” se refiere a cualquier tratamiento mecánico que promueve la separación y/o la liberación de la celulosa, hemicelulosa y/o lignina del material que contiene lignocelulosa. El procedimiento de trituración mecánica se escoge preferiblemente en el grupo formado por los procedimientos siguientes: procesado
10 mecánico, trituración, picado, troceado, corte, irradiación, molienda tal como molienda en seco, molienda por vía húmeda y molienda en molinos de bolas vibratorios, y combinaciones de los mismos procesos.

La expresión “pretratamiento biológico” según la presente invención se refiere a cualquier pretratamiento biológico que promueve la separación y/o la liberación de la celulosa, hemicelulosa y/o lignina del material que contiene lignocelulosa. Las técnicas de pretratamiento biológico pueden implicar aplicar microorganismos que solubilizan la
15 lignina tales como actinomicetos (por ejemplo, cepas de *Streptomyces*) u hongos de varilla roja.

Los métodos de pretratamiento adecuados para el procedimiento de la presente invención tienen que llevarse a cabo en dispositivos adecuados, conocidos por las personas expertas en la técnica. Un dispositivo adecuado para llevar a cabo pretratamientos químicos puede ser cualquier clase de depósito o recipiente tal como un reactor por lotes. Un dispositivo adecuado para llevar a cabo explosiones con vapor puede ser cualquier clase de depósito o recipiente tal
20 como un reactor por lotes, pero también se pueden realizar dentro de un reactor de husillo o helicoidal, preferiblemente un reactor de husillo en continuo.

En una realización preferida, el contenido de sólidos del material que contiene lignocelulosa pretratado es de un máximo del 75 % en relación de peso a peso, preferiblemente de 25 a 65 % en peso (peso/peso) y de manera especialmente preferida, de 40 a 55 % (peso/peso).

25 En el proceso de la presente invención, el material que contiene lignocelulosa pretratado se pone luego en contacto con al menos una enzima que pertenece al grupo de las hidrolasas que comprende una o más actividades escogidas entre las actividades de exo y endocelulasas, es decir, celobiohidrolasa (CBH) I, II; endoglucanasa (EG) I-IV; beta-glucosidasa (BGL); exo y endohemicelulasas, es decir, xilanasa, xilosidasa, xilobiasa, arabinasa, arabinofucosidasa, mananasa, manosidasa, galactasa y galactosidasa, y esterases, para descomponer el material que contiene
30 lignocelulosa pretratado en azúcares fermentables tales como hexosas (por ejemplo, glucosa) y pentosas (por ejemplo, xilosa) monoméricas. La puesta en contacto se puede realizar mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica que sea adecuado para el objetivo de la invención.

El hidrolizado formado mediante la hidrólisis enzimática del material que contiene lignocelulosa pretratado es preferiblemente un material con un alto contenido en azúcar fermentable, que está preferiblemente en el orden de 5 a 20 % (peso/volumen). En este contexto, debe entenderse que el contenido de azúcar es el contenido de todas las pentosas y hexosas. En una realización preferida de la invención, el hidrolizado tiene un contenido de azúcares de 8 a 12, 5 % (peso/volumen). En una realización de la invención más preferida, el hidrolizado contiene también nutrientes
35 adicionales (por ejemplo, proteínas, sales y azúcares superiores como oligosacáridos).

La puesta en contacto según la etapa (b) de la presente invención se lleva a cabo preferiblemente en condiciones tales que la dosis total de enzimas comprende de 0,05 a 10 % (peso/peso) de materia prima, preferiblemente de 0,1 a 5 % (peso/peso) de materia prima, más preferiblemente de 0,15 a 4 % (peso/peso) de materia prima y, de manera especialmente preferida, de 0,2 a 3,5 % (peso/peso) de materia prima. Dependiendo del régimen de dosificación y de la composición de actividad específica del sistema de enzimas aplicado, la biomasa se hidroliza de 40 a 60 °C durante un período de 1 a 7 días, preferiblemente de 45 a 55 °C de 18 a 96 horas. La puesta en contacto según la etapa (b)
40 de la presente invención se lleva a cabo preferiblemente a un pH en el intervalo de 3 a 8, preferiblemente a un pH de 4 a 6, especialmente a un pH de 4,5 a 5,5. En una realización de esta invención particularmente preferida se realiza la hidrólisis de lotes o lotes alimentados de paja de cereal pretratada con dosis de enzimas de 0,25 – 0,8 % (peso/peso) de materia prima con o sin suplementación adicional de beta-glucosidasa y a una temperatura de 47 a 53 °C, en 72 horas. Sorprendentemente, se pueden obtener rendimientos por encima del 70 % (peso/peso) respecto del contenido
50 total de azúcares contenidos en la materia prima, incluso con hidrólisis con regímenes de dosis de enzimas bajas.

La puesta en contacto según la etapa (b) de la presente invención se lleva a cabo en un recipiente de hidrólisis. Los expertos en la técnica conocen los recipientes adecuados, escogidos preferentemente entre reactores por lotes y por lotes alimentados.

55 En la presente invención, la expresión “enzimas que pertenecen a la clase de las hidrolasas” debe entenderse de tal forma que abarca una o más actividades escogidas entre las actividades de exo y endocelulasas (es decir, celobiohidrolasa (CBH), I, II; endoglucanasa (EG) I-IV; beta-glucosidasa (BGL)); exo y endo-hemicelulasas (es decir, xilanasa, xilosidasa, xilobiasa, arabinasa, arabinofucosidasa, mananasa, manosidasa, galactasa y galactosidasa), y esterases. En una realización preferida, la enzima (al menos una) que pertenece a la clase de las hidrolasas según la

presente invención tiene una o más actividades escogidas en el grupo que consta de: celobiohidrolasa tipo I o tipo II (CBH I o CBH II); endoglucanasa tipo I, II, III y IV (EGI, EGII, EGIII, EGIV); beta-glucosidasa (BGL); esterasa, exohemicelulasa y endo-hemicelulasa. Incluso más preferible es que la exo-hemicelulasa y la endo-hemicelulasa se escojan de manera preferente entre xilanas, xilosidas, xilobias, arabinas, arabinofucosidas, mananas, manosidas, galactasas y galactosidas.

Según la etapa (c) del procedimiento de la presente invención, el hidrolizado se retira luego del recipiente de hidrólisis y se divide posteriormente en dos partes, (i) y (ii). La separación se lleva a cabo, preferentemente, cuando al menos 70 % del total de azúcares presentes en la materia prima original se han liberado, preferiblemente al menos 75 % de los mismos y, de forma especialmente preferida, al menos el 80%. En una realización preferida, la proporción de la parte (i) del hidrolizado a la parte (ii) se escoge en el intervalo de 0,01 a 1, preferiblemente de 0,02 a 0,5, también preferiblemente de 0,04 a 0,25 y, lo más preferido, de 0,05 a 0,1.

La separación según la etapa (c) del procedimiento de la presente invención se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, que se considere adecuado para el objetivo de la invención. En una realización preferida, la separación se lleva a cabo por un método de separación sólido-líquido, como filtración, prensado, separación por membranas, flotación, precipitación, decantación y centrifugación o combinación de los mismos. Los métodos preferidos son las separaciones sólido-líquido basadas en filtración. Es especialmente preferido el uso de un filtro prensa. Los residuos después de filtración deberían tener un contenido de sólidos mínimo de 20 % (peso/peso), preferiblemente 30 % (peso/peso), de manera especial preferiblemente 40 % (peso/peso) y, de la manera más preferida, 50 % (peso/peso) de contenido de sólidos. Otro método para la separación según la etapa (c) es la centrifugación, por ejemplo, usando un decantador.

Según la etapa (c) del procedimiento de la presente invención, la parte (i) del hidrolizado se dirige a continuación a un recipiente de cultivo. Las personas expertas en la técnica conocen los recipientes adecuados para ello; dichos recipientes se escogen preferiblemente entre reactores por lotes y reactores por lotes alimentados. El tanque o recipiente de cultivo está equipado, preferiblemente, con un agitador removedor y con un dispositivo de aireación. En otra realización preferida de la presente invención, se puede añadir parte del material que contiene lignocelulosa pretratado directamente al recipiente de cultivo. Las cantidades preferidas de material que contiene lignocelulosa pretratado añadidas son de 1 a 35 % (peso/peso, respecto del peso total del material de cultivo), preferiblemente de 5 a 30 % (peso/peso, respecto del peso total del material de cultivo), y, lo más preferible, 10 a 20 % (peso/peso, respecto del peso total del material de cultivo).

Según la etapa (d) del procedimiento de la presente invención, la parte (i) del hidrolizado se fermenta luego con al menos un microorganismo capaz de la producción de al menos una enzima que pertenece a la clase de las hidrolasas.

El "microorganismo (al menos uno) capaz de la producción de al menos una enzima que pertenece a la clase de las hidrolasas" se escoge, preferiblemente, entre las siguientes especies: *Actinobacter sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Burkholdria sp.*, *Clostridia sp.*, *Caldicellulosiruptor sp.*, *Cellvibrio sp.*, *Halobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Xanthomonas sp.* y *Thermobifida sp.*, *Pyrochoccus sp.*, *Sulphobolus sp.*, *Staphylothermus sp.* y *Thermococcus sp.*

El "hongo (al menos uno) capaz de la producción de al menos una enzima que pertenece a la clase de las hidrolasas" se escoge, preferiblemente, entre las siguientes especies: *Trichoderma sp.*, *Hypocrea sp.*, *Aspergillus sp.*, *Chaetomium sp.*, *Chrysosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Humicola sp.*, *Orpinomyces sp.*, *Pencillium sp.*, *Phanerochaete sp.*, *Piromyces sp.*, *Talaromyces sp.*, *Trametes sp.* y *Trichoderma sp.* o sus holomorfos respectivos. De manera especial, se prefiere un hongo escogido entre *Trichoderma sp.* y *Talaromyces sp.*, si bien son posibles combinaciones de uno o más hongos, incluso también combinaciones de uno o más hongos y /o microorganismos.

En una realización preferida de la presente invención, la producción de enzima se consigue con una cepa hiperproductora de celulasa del hongo filamentoso *Trichoderma reesei* (anamorfo: *Hypocrea jecomia*).

La fermentación según la etapa (d) del procedimiento de la presente invención se realiza durante un período de tiempo de 1 hora a 14 días, preferiblemente de 10 horas a 7 días, más preferiblemente de 24 horas a 5 días, preferiblemente con mezcla constante con un aporte de energía de 150 a 1900 W/m³ y más preferiblemente de 500 a 1500 W/m³ y preferiblemente a un pH de 2,5 a 8, preferiblemente de 3,0 a 7, y, en especial, a un pH preferido de 3,5 a 6,0 y preferiblemente a una temperatura de 15 a 70 °C, preferiblemente de 20 a 55 °C, y, de forma especialmente preferida, de 25 a 35 °C, en condiciones controladas de oxígeno. El nivel de oxígeno disuelto promedio se escoge preferiblemente entre 0,01 % y 80 %, preferiblemente se selecciona entre 0,1 % y 50 %, particularmente se prefiere que sea de 1 % a 30 % y, más particularmente, de 3 % a 15 %. En una realización particularmente preferida, el nivel de oxígeno disuelto se controla mediante un agitador o un flujo de aire comprimido, o mediante la presión interna del reactor, o con una combinación de dos o tres de estas medidas.

En una realización preferida, la concentración de azúcares solubles durante la fermentación según la etapa (d) del proceso de la invención es inferior al 10 % (peso/volumen), más preferiblemente, inferior al 8 % (peso/volumen) y, en particular, más preferiblemente, inferior al 5 % (peso/volumen). La parte (i) del hidrolizado se dirige preferiblemente al depósito de cultivo, mediante un sistema de alimentación. Según la presente invención, "alimentación" quiere decir la

adición posterior de la parte (i) del hidrolizado al depósito de cultivo. La “velocidad de alimentación”, tal como se usa el término en la presente invención, se define como el volumen de hidrolizado transferido al recipiente de cultivo, medido en m³/hora. Las personas expertas en la técnica pueden seleccionar la velocidad de alimentación adecuada para el procedimiento concreto. Preferiblemente, la alimentación del hidrolizado se lleva a cabo a velocidad de alimentación constante o a velocidad de alimentación variable, o mediante una combinación de ambas durante la etapa (d) del procedimiento de la invención. Preferiblemente, la alimentación del hidrolizado se lleva a cabo de manera continua durante la etapa (d) del proceso de la invención, o en intervalos de tiempo. Los intervalos preferidos están, por ejemplo, relacionados con un tiempo de fermentación total de 100 horas o por ejemplo con una alimentación constante durante 60 horas que luego se para hasta el tiempo final de fermentación de 100 horas. Otro ejemplo posible es empezar con una alimentación constante durante unas 20 horas que se interrumpe después de 20 horas y se reanuda tan pronto el azúcar fermentable en el hidrolizado se ha fermentado completamente.

Después de la fermentación, el hidrolizado fermentado se redirige al recipiente de hidrólisis según la etapa (e) del procedimiento de la presente invención. El redireccionamiento según la etapa (e) del procedimiento de la presente invención se puede realizar mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica que sea adecuado para el objetivo de la invención. Durante el redireccionamiento según la etapa (e) del procedimiento de la invención, preferiblemente el hidrolizado se procesa de manera física, mecánica y/o química. Entre los métodos preferidos de redireccionamiento se incluyen el bombeo del producto u otros métodos de transportar suspensiones que necesitan energía, como la mezcla en línea con alto cizallamiento. En una realización especialmente preferida, el redireccionamiento se lleva a cabo bombeando el hidrolizado al depósito de hidrólisis. El procesamiento del hidrolizado antes de la fermentación según la etapa (d) del procedimiento de la invención dará como resultado una cinética de la hidrólisis incluso más rápida y un rendimiento en azúcar monomérico superior, ya que las enzimas unidas a las células se liberarán más fácilmente de los hongos y/o de los microorganismos.

Dependiendo del método de pretratamiento aplicado, se producen sustancias inhibidoras de al menos una enzima y/o al menos un microorganismo y/u hongo, durante la etapa (a) del procedimiento de la presente invención. Estos compuestos disminuyen mucho las tasas tanto de hidrólisis como de fermentación.

El procedimiento de la invención según las etapas (a) a (e) tal como se ha definido previamente proporciona ya, por supuesto, diversas ventajas, en lo que se refiere a costes y eficiencia debido a la producción de enzimas auto-suficiente integrada; sin embargo, hacer funcionar el proceso durante varios días de forma continua puede conducir a una acumulación de estas sustancias inhibidoras que compensarán algunas de estas ventajas, lo que conduce a una ralentización de la producción de enzimas y/o de la hidrólisis. Para garantizar un procedimiento para la hidrólisis enzimática autosuficiente que sea también interesante de poner en práctica en procedimientos de producción a escala industrial, como la posterior producción de productos de fermentación (por ejemplo, bioetanol), los inventores de la presente invención han encontrado de manera sorprendente que estos riesgos se pueden evitar mediante la eliminación de una o más de estas sustancias integrada en una cierta etapa del proceso.

Estas sustancias inhibidoras son productos de degradación de lignocelulosa entre los que se incluyen productos de degradación de la lignina, productos de degradación de la celulosa y productos de degradación de la hemicelulosa. Los productos de degradación de la lignina son, por naturaleza, fenólicos. Los productos de degradación de la hemicelulosa incluyen furanos procedentes de azúcares (como hexosa y/o pentosas), incluyendo xilosa, manosa, galactosa, ramnosa y arabinosa. Ejemplos de hemicelulosas son los siguientes compuestos: xilano, galactoglucomanano, arabinogalactano, arabinoglucuronoxilano, glucurunoxilano y sus derivados y combinaciones. Entre los ejemplos de productos de degradación de la lignocelulosa se incluyen alcohol 4-OH bencílico, 4-OH benzaldehído, ácido 4-OH benzoico, trimetil-benzaldehído, ácido 2-furoico, ácido cumárico, ácido ferúlico, fenol, guaiacol, veratrol, pirogalol, pirogalol monometiléter, alcohol vainílico, vainillina, isovainillina, ácido vainílico, veratraldehído, ácido verátrico, ácido 2-O-metil-gálico, alcohol siringílico, siringilaldehído, ácido siringico, ácido trimetil-gálico, homocatecol, etil vainillina, creosol, p-metil-anisol, anisalaldehído, ácido anísico, furfural, hidroximetilfurfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido fórmico, ácido acético, ácido levulínico, ácido cinámico, coniferilaldehído, isoeugenol, hidroquinona, eugenol, o combinaciones suyas.

Para garantizar un proceso más eficiente en una realización preferida del procedimiento de la presente invención, la sustancia inhibidora (al menos una) de al menos una enzima y/o inhibidora de al menos un microorganismo, a eliminar, es una sustancia inhibidora de al menos una enzima que pertenece a la clase de las hidrolasas y/o inhibidora de al menos un microorganismo y/u hongo capaz de la producción de al menos una enzima que pertenece a la clase de las hidrolasas.

En otra realización especialmente preferida, la sustancia es inhibidora para al menos un hongo escogido en el grupo que consiste en *Trichoderma sp.* y *Talaromyces sp.*, como *Trichoderma reesei* y/o inhibidor de al menos un microorganismo escogido entre los del grupo compuesto por *Saccharomyces sp.*, *Clostridium sp.*, *Lactobacillus sp.* y *Pichia sp.*

En una realización preferida del procedimiento de la presente invención, estas sustancias (al menos una) se eliminan de la parte (i) o de la parte (i) y de la parte (ii) del hidrolizado, según la etapa (c).

En realizaciones más preferidas, la eliminación se lleva a cabo añadiendo al menos un adsorbente a la parte (i) o a la

parte (i) y a la parte (ii) del hidrolizado, según la etapa (c). El adsorbente se selecciona preferiblemente en el grupo compuesto por carbón activo, sílice, minerales de tipo silicato, zeolitas, carbón vegetal, arcilla, resinas intercambiadoras de iones y sus mezclas, si bien se prefieren en particular el carbón activo y/o el carbón vegetal.

5 Se describe también que el adsorbente (al menos uno) se añade al material que contiene lignocelulosa pretratado antes de que el material que contiene lignocelulosa pretratado se transfiera al recipiente de hidrólisis. Sin embargo, se describe también añadir el adsorbente directamente al recipiente de la hidrólisis o añadir el adsorbente justo antes de la separación según la etapa (c).

10 La eliminación del compuesto inhibidor (al menos uno) mediante adición de un adsorbente proporciona amplias ventajas. Por una parte, se mejora notablemente la capacidad de filtrado. Además, en caso de que se emplee como adsorbente carbón vegetal o carbón activo, la combustibilidad de la torta del filtro se mejora y no es necesario gastar energía en el proceso de secado o solamente debe emplearse una mínima cantidad de energía. De este modo, se puede conseguir un procedimiento independiente del consumo de energía mediante la combustión de la torta de filtrado.

15 En otra realización preferida de la presente invención, la eliminación de la sustancia inhibidora (al menos una) de la parte (i) o de la parte (i) y de la parte (ii) del hidrolizado se lleva a cabo mediante evaporación.

20 Debido al carácter volátil de la mayoría de las sustancias inhibidoras, la evaporación es otro método eficiente de eliminación. "La evaporación", según la presente invención se realiza, preferiblemente, a presión reducida, preferiblemente a una presión por debajo de la atmosférica, preferiblemente por debajo de una presión absoluta de 750 mbar, más preferiblemente por debajo de 500 mbar absolutos, incluso más preferiblemente a presiones por debajo de 250 mbar absolutos, siendo lo más preferido una presión inferior a 125 mbar absolutos. Los intervalos preferidos son de 75 a 750 mbar absolutos y de 75 a 250 mbar absolutos. Durante la evaporación, se mantiene preferiblemente la temperatura por debajo de 120 °C, más preferiblemente por debajo de 100 °C, e incluso más preferiblemente por debajo de 90 °C, siendo lo más preferido por debajo de 80 °C. Los intervalos preferidos son de 45 a 120 °C y de 45 a 100 °C. Los tiempos de permanencia se escogen preferiblemente de 0,1 s a 10 h, preferiblemente de 1 s a 1 h, más 25 preferiblemente de 10 s a 30 min, siendo lo más preferible de 30 s a 10 min. El pH se mantiene preferiblemente por debajo de 6, más preferiblemente por debajo de 5,5, incluso más preferiblemente por debajo de 5,0, siendo lo más preferible por debajo de 4,8. Los intervalos preferidos son de 3,5 a 6 y de 4,0 a 5,0. Los evaporadores preferidos son los evaporadores de circulación, los evaporadores de película delgada, los evaporadores de película barrida y los evaporadores de película descendente.

30 La eliminación de la sustancia inhibidora (al menos una mediante evaporación proporciona ventajas adicionales, ya que la evaporación proporciona también la ventaja de la esterilización del hidrolizado. De este modo, se pueden evitar contaminaciones cruzadas durante la fermentación. Además, junto a la mayoría de las sustancias inhibidoras, se evaporará una cantidad sustancial de agua, lo que conduce a un hidrolizado concentrado (es decir, con volumen disminuido y mayor concentración de azúcar) lo que produce una reducción adicional de costes debido a una 35 producción aumentada y a un volumen de reactor minimizado. La evaporación es un método tan efectivo de eliminación que se pueden obtener ya sustanciales ventajas del procedimiento de la invención aplicando este método solamente a la parte (i) del hidrolizado.

40 En otra realización preferida es también posible combinar varios métodos de eliminación, si bien es especialmente preferido combinar la adición de un adsorbente antes de transferir el hidrolizado al recipiente de hidrólisis con la evaporación aplicada a la parte (i) y/o (ii) del hidrolizado. En esta realización concreta, también se prefiere añadir el adsorbente antes de la separación según la etapa c), especialmente se prefiere antes de la hidrólisis según la etapa b). Es especialmente preferido que el procedimiento según la invención no incluya la eliminación por lavado del material pretratado y/o del hidrolizado.

45 En otra realización preferida del procedimiento de la presente invención, se añade al recipiente de cultivo una cantidad adicional de 0,01 a 30 % (peso/volumen) de material que contiene lignocelulosa, preferiblemente de 0,1 a 25 % (peso/volumen), más preferiblemente de 0,5 a 22 % (peso/volumen) y, de forma especialmente preferida, de 1 a 20 % (peso/volumen). En una realización especialmente preferida, el material que contiene lignocelulosa se obtiene separándolo del recipiente de pretratamiento. Añadir material que contiene lignocelulosa pretratado llevará a una liberación lenta de carbono y funciona como inductor para la expresión de la celulasa.

50 En otro aspecto, la presente invención se orienta además a un procedimiento para la producción de un compuesto orgánico a partir de la parte (ii) del hidrolizado tal como se define previamente, que comprende la etapa de

55 (f1) poner en contacto la parte (ii) del hidrolizado con al menos un microorganismo y/o un hongo capaz de producir un compuesto orgánico escogido en el grupo compuesto por ácidos orgánicos, aminoácidos, caprolactamas, antibióticos, vitaminas, enzimas, nucleótidos / nucleósidos, biogás, proteínas, polisacáridos, aminoglucanos, disolventes orgánicos, biofuegos, biotensioactivos, aminoglucanos, derivados de azúcares y sus mezclas;

o

(f2) someter la parte (ii) del hidrolizado a un proceso de conversión química, conversión catalítica, separación

cromatográfica, separación mediante membranas o cristalización.

Según el procedimiento para la producción de un compuesto orgánico de acuerdo con la etapa (f1) tal como se ha definido anteriormente, la temperatura durante la puesta en contacto de la parte (ii) del hidrolizado con el (al menos uno) microorganismo se selecciona entre 10 y 65 °C, preferiblemente entre 15 y 55 °C, en especial preferiblemente entre 20 y 50 °C, siendo lo más preferible que esté entre 25 y 45 °C.

Se prefiere especialmente que el microorganismo (al menos uno) se seleccione entre levaduras mesófilas como todas las especies del género *Saccaromyces*, en especial *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces bouldardii*, *Saccharomyces bulderi*, *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces cariocus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces dairenensis*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces eubayanus*, *Saccharomyces exiguus*, *Saccharomyces florentinus*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces martiniae*, *Saccharomyces monacensis*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces spencerorum*, *Saccharomyces turicensis*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces zonatus*, así como *Arxula adeninovorans*, *Ashbya gossypii*, *Hansenula polymorpha*, *Debarmyces hansenii*, *Hortea werneckii*, *Kluyveromyces lactis*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Thrichosporon domesticum*, *Thrichosporon montevidense*, *Xanthophyllomyces dendrochous*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia stipitis*, *Pichia segobiensis*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis*, *Candida boidinii*, *Candida tenuis*, *Pachysolen tannophilus*, *Hansenula polymorpha*, *Candida famata*, *Candida parapsilosis*, *Candida rugosa*, *Candida sonorensis*, *Candida maltosa*, *Issatchenkia terricola*, *Kloeckera apis*, *Pichia barkeri*, *Pichia cactophila*, *Pichia deserticola*, *Pichia norvegensis*, *Pichia membranefaciens*, *Pichia mexicana* y *Torulaspora delbrueckii* y cualesquiera combinaciones de las mismas.

En una realización preferida alternativa del procedimiento para la producción de un compuesto orgánico a partir de la parte (ii) del hidrolizado, el microorganismo (al menos uno) se escoge entre microorganismos termófilos que se seleccionan preferiblemente entre *Candida bovina*, *Candida picachoensis*, *Candida emberorum*, *Candida pintolopesii*, *Candida thermophila*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kazachstania telluris*, *Issatchenkia orientalis*, *Lachancea thermotolerans* y cualquier combinación suya. Entre las bacterias termófilas preferidas se incluyen *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermohydrosulphuricum*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Thermoanaerobium brockii*, *Thermobacteroides acetoethylicus*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Clostridium thermoaceticum*, *Clostridium thermoautotrophicum*, *Acetogenium kivui*, *Desulfotomaculum nigrificans*, *Desulfovibrio thermophilus*, *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Thermoanaerobacter mathranii* y cualquier combinación de las mismas.

Se prefiere especialmente el uso de las siguientes levaduras mesófilas: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* y/o *Candida shehatae*.

En una realización alternativa del procedimiento para la producción de compuestos orgánicos a partir de la parte (ii) del hidrolizado se usa al menos un hongo. El hongo (al menos uno) se selecciona entre *Aspergillus sp.*, *Trichoderma sp.*, *Hypocrea sp.*, *Penicillium sp.*, *Acremonium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Talaromyces sp.* y cualquier combinación de los mismos.

En una realización alternativa del procedimiento para la producción de compuestos orgánicos a partir de la parte (ii) del hidrolizado el microorganismo se selecciona entre especies de bacterias como *Clostridium acetobutylicum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sp.*, *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli* y cualquier combinación de ellas.

Además, debe entenderse que cualquier combinación de los microorganismos y/u hongos listados previamente está dentro del alcance de la presente invención.

La fermentación se lleva a cabo preferiblemente en el modo por lotes (de forma discontinua), en el modo de lotes alimentados o en modo continuo. Lo más preferible es realizar la fermentación en el modo por lotes.

En una realización más preferida, se añaden a la parte (ii) del hidrolizado minerales como cobre, zinc, magnesio, calcio, hierro y compuestos que contienen nitrógeno como nitratos, aminoácidos y amoníaco, antes de la etapa f1) del procedimiento para la producción de un compuesto orgánico.

Entre los compuestos orgánicos valiosos que resultan de la fermentación bacteriana de la parte (ii) del hidrolizado se incluyen (aunque la lista no se limita a ellos): ácidos orgánicos (como los ácidos acético, láctico, succínico, itacónico, fumárico, propiónico y glucurónico), aminoácidos (como ácido glutámico, leucina, lisina, treonina, ácido aspártico, fenilalanina, cisteína), caprolactamas (como alfa-amino-caprolactama), antibióticos (como bleomicina, virginiamicina, lincomicina, monensina, blastidina, tetraciclina), vitaminas (como las vitaminas B2, B12, y C), enzimas, nucleótidos / nucleósidos (como NADH, ATP, cAMP, FAD, coenzima A), biogás, biopolímeros (como polihidroxibutirato, poliamidas / fibroínas), proteínas, polisacáridos (como xantano, dextrano), aminoglucanos (como el ácido hialurónico), así como disolventes orgánicos y biofueles (como acetona, etanol, butanol, propanodiol). Entre los compuestos orgánicos valiosos que resultan de la fermentación por levaduras de la parte (ii) del hidrolizado se incluyen (aunque la lista no se limita a ellos) disolventes orgánicos (por ejemplo, etanol, propanol), nucleótidos (por ejemplo, ARN), biotensioactivos

(por ejemplo, soforo-lípidos) enzimas y biopolímeros (por ejemplo, espidroínas). Entre los compuestos orgánicos valiosos que resultan de la fermentación fúngica de la parte (ii) del hidrolizado se incluyen ácidos orgánicos (como los ácidos cítrico, fumárico, itacónico), antibióticos (como penicilina, cefalosporina), enzimas y polisacáridos (como quitina).

- 5 En una realización más preferida de este procedimiento, el compuesto orgánico se escoge entre alcoholes, ácidos orgánicos, biopolímeros, antibióticos, aminoácidos, caprolactamas, polisacáridos, disolventes orgánicos, biofueles, aminoglucanos, nucleótidos / nucleósidos, vitaminas, biotensioactivos, enzimas y sus mezclas.

- 10 Según el procedimiento para la producción de un compuesto orgánico según la etapa (f2), someter la parte (ii) del hidrolizado a un proceso de conversión química, conversión catalítica, separación cromatográfica, separación mediante membranas y/o cristalización, se lleva a cabo mediante métodos cromatográficos y/o etapas de filtración para usar azúcares purificados en la fermentación (por ejemplo, polímeros basados en ácido láctico) y/o en la conversión química (producción de FDCA (ácido furanodicarboxílico)).

A continuación, se describen realizaciones especialmente preferidas de la invención.

Realización especialmente preferida

- 15 Procedimiento para hidrólisis enzimática autosuficiente de material que contiene lignocelulosa, que comprende las etapas de:
- (a) someter un material que contiene lignocelulosa a un pretratamiento en un dispositivo de pretratamiento;
 - b) poner en contacto el material que contiene lignocelulosa pretratado de la etapa a) con al menos una hidrolasa en un depósito de hidrólisis para formar un hidrolizado;
 - 20 c) separar el hidrolizado y posteriormente dividir el hidrolizado en dos partes (i) y (ii), donde la parte (i) se dirige a un recipiente de cultivo;
 - d) fermentar la parte (i) del hidrolizado con al menos un hongo capaz de la producción de al menos una enzima de la clase de las hidrolasas; y
 - e) redirigir el hidrolizado fermentado de la etapa d) al recipiente de hidrólisis de la etapa b),
 - 25 donde la parte (i) o la parte (i) y la parte (ii) del hidrolizado se tratan para eliminar al menos una sustancia inhibidora de al menos una enzima y/o al menos un microorganismo y/o un hongo, mediante evaporación.

Realización especialmente preferida

Procedimiento según la realización especialmente preferida mencionada previamente, en el que la proporción de la parte (i) del hidrolizado a la parte (ii) es de 0,01 a 1, preferiblemente de 0,02 a 0,5, siendo lo más preferido de 0,05 a 0,1

- 30 Realización especialmente preferida

- Procedimiento según la realización especialmente preferida mencionada previamente, en el que se añade una cantidad adicional de 0,01 a 30 % (peso/volumen) de material que contiene lignocelulosa, preferiblemente de 0,15 a 25 % (peso/volumen), más preferiblemente de 0,51 a 22 % (peso/volumen) y, de forma especialmente preferida, de 15 a 20 % (peso/volumen), al recipiente de cultivo. En esta realización, lo más preferido es que el material que contiene
- 35 lignocelulosa sea material que contiene lignocelulosa previamente tratado, obtenido preferiblemente en el dispositivo de pretratamiento.

Realización especialmente preferida

- Procedimiento según cualquiera de las realizaciones anteriores especialmente preferidas, en el que el microorganismo (al menos uno) capaz de producir al menos una enzima que pertenece a la clase de las hidrolasas se elige entre exo- y endocelulasas, beta-glucosidasa (BGL), exo- y endo-hemicelulasas y esterases y/o el hongo (al menos uno) capaz de producir al menos una enzima que pertenece a la clase de las hidrolasas se escoge en los de las especies
- 40 *Trichoderma* y *Talaromyces* y sus mezclas y, muy preferiblemente, es *Trichoderma reesei*.

Realización especialmente preferida

- Procedimiento según cualquiera de las realizaciones anteriores especialmente preferidas, que comprende además la
- 45 etapa de

(f1) poner en contacto la parte (ii) del hidrolizado con al menos un microorganismo y/o un hongo capaz de producir un compuesto orgánico escogido en el grupo compuesto por ácidos orgánicos, aminoácidos, caprolactamas, antibióticos, vitaminas, enzimas, nucleótidos / nucleósidos, biogás, proteínas, polisacáridos, aminoglucanos, disolventes orgánicos biofueles, biotensioactivos, aminoglucanos, derivados de azúcares y sus mezclas.

Ejemplo y figuras

La presente invención se describe además mediante los siguientes ejemplo y figuras. El ejemplo y las figuras son solamente para propósito de ilustración.

- 5 La figura 1 muestra el flujo de proceso del procedimiento según la presente invención. La línea de rayas indica la opción de añadir parte del material que contiene lignocelulosa pretratado directamente al recipiente de cultivo.

La figura 2 muestra el rendimiento de glucosa, xilosa y DL-lactato de sodio, así como la cantidad de ácido acético y ácido fórmico cuando se desintoxica el hidrolizado mediante evaporación.

Ejemplo 1

Paja de trigo, eliminación de sustancia inhibidora por adición de carbón vegetal y evaporación.

- 10 La fermentación se lleva a cabo en un sistema biorreactor de depósito agitado con un dispositivo de control de temperatura, pH y oxígeno disuelto (= recipiente de cultivo). El cultivo se empieza con una semilla de cultivo al 5 % (peso/peso). Asimismo, el medio contiene sales y minerales e hidrolizado concentrado como principal fuente de carbono. La fermentación se lleva a cabo a pH 5, a 30 °C y a un nivel de oxígeno disuelto de 25 %. La alimentación de la parte (i) del hidrolizado se empieza tras 15 horas y se continúa de manera continua durante otras 85 horas. El volumen de alimentación total es 50 % del volumen de fermentación final total.

El hidrolizado fermentado resultante de la fermentación se bombea a la paja de trigo pretratada para la hidrólisis de la última.

La cantidad de paja de trigo pretratada presente en la etapa de hidrólisis se escoge de tal forma que se añade 1 m³ de hidrolizado fermentado a 2400 kg de materia seca de paja de trigo pretratada.

- 20 La hidrólisis se realiza a 50 °C, pH 5, durante 96 horas removiendo a 50 rpm. Después de la hidrólisis, se añade un 1 % (peso/volumen) de carbón activo (granulado) al contenido del recipiente de la hidrólisis. El contenido se incuba con el carbón activo a temperatura ambiente, con agitación a 250 rpm. Después de 1 hora, se realiza una separación sólido-líquido para recuperar el hidrolizado "desintoxicado", separándolo de los sólidos que quedan por centrifugación o filtración (tamaño de poro del filtro < 1 mm). Luego, 15 % del hidrolizado desintoxicado se somete a una etapa de evaporación para eliminar además los inhibidores volátiles y disminuir el volumen de esta parte del hidrolizado a un tercio del volumen inicial. Este hidrolizado doblemente desintoxicado y concentrado se introduce a continuación a la fermentación como se ha descrito previamente. El resto del hidrolizado que no ha sufrido evaporación se puede usar para la producción de un compuesto orgánico.

Ejemplo 2

- 30 Paja de trigo, eliminación de sustancia inhibidora mediante evaporación en 3 etapas

La fermentación se lleva a cabo en un sistema biorreactor de depósito agitado con un dispositivo de control de temperatura, pH y oxígeno disuelto (= recipiente de cultivo). El cultivo se empieza con una semilla de cultivo al 5 % (peso/peso). Asimismo, el medio contiene sales y minerales e hidrolizado concentrado como principal fuente de carbono. La fermentación se lleva a cabo a pH 5, a 30 °C y a un nivel de oxígeno disuelto de 25 %. La alimentación de la parte (i) del hidrolizado se empieza tras 15 horas y se continúa de manera continua durante otras 85 horas. El volumen de alimentación total es 45 % del volumen de fermentación final total.

El hidrolizado fermentado resultante de la fermentación se bombea a la paja de trigo pretratada para la hidrólisis de la última.

- 40 La cantidad de paja de trigo pretratada presente en la etapa de hidrólisis se escoge de tal forma que se añade 1 m³ de hidrolizado fermentado a 2400 kg de materia seca de paja de trigo pretratada.

La hidrólisis se realizó a 50 °C, pH 5, durante 96 horas removiendo a 50 rpm. Después de la hidrólisis, el hidrolizado se sometió a una etapa de evaporación para eliminar inhibidores volátiles y disminuir el volumen del hidrolizado en un factor de 6,4. Este hidrolizado desintoxicado y concentrado se introdujo a continuación a la fermentación tal como se ha descrito previamente.

- 45 Para la evaporación, se ajustó el pH a 4 usando ácido sulfúrico y luego se realizó la evaporación a 75 °C y 100 mbar. La evaporación se detuvo cuando se alcanzó una concentración de azúcar de 500 g/l. Los rendimientos respectivos de glucosa, xilosa y NaDI y las cantidades de ácido fórmico y ácido acético se muestran en la tabla 1 y en la figura 2. Esta desintoxicación dio como resultado una reducción de ácido acético de más del 80 % y del ácido fórmico de aproximadamente 30 %. Los resultados se muestran en la tabla 1 y en la figura 2.

50

Tabla 1: rendimientos de glucosa, xilosa y cantidades de ácidos fórmico y acético tras evaporación

	Rendimiento
Factor	6,42
pH	-
Rendimientos	
Glucosa	103 %
Xilosa	106 %
Ácido fórmico	72 %
Ácido acético	16 %

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la hidrólisis enzimática autosuficiente de material que contiene lignocelulosa, que comprende las etapas de:

(a) someter un material que contiene lignocelulosa a un pretratamiento en un dispositivo de pretratamiento;

(b) poner en contacto el material que contiene lignocelulosa pretratado de la etapa a) con al menos una hidrolasa que comprende una o más actividades escogidas entre las actividades de exo- y endocelulas, es decir celobiohidrolasa (CBH) I, II; endoglucanasa (EG), I-IV, beta-glucosidasa (BGL); exo- y endohemicelulasas, es decir, xilanasa, xilosidasa, xilobiasa, arabinasa, arabinofucosidasa, mananasa, manosidasa, galactasa y galactosidasa, y esterases, en un depósito o recipiente de hidrólisis para formar un hidrolizado;

(c) separar el hidrolizado y posteriormente dividir el hidrolizado en dos partes (i) y (ii), donde la parte (i) se dirige a un recipiente de cultivo;

(d) fermentar la parte (i) del hidrolizado con al menos un microorganismo y/ o un hongo capaz de la producción de al menos una enzima de la clase de las hidrolasas; y

(e) redirigir el hidrolizado fermentado de la etapa d) al recipiente de hidrólisis de la etapa b),

donde el hidrolizado se trata para eliminar al menos una sustancia inhibidora de al menos una enzima y/o al menos un microorganismo y/o un hongo.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la sustancia inhibidora (al menos una) de al menos una enzima y/o inhibidora de al menos un microorganismo es una sustancia inhibidora de al menos una enzima que pertenece a la clase de las hidrolasas y/o inhibidora de al menos un microorganismo y/o un hongo capaz de producir al menos una enzima que pertenece a la clase de las hidrolasas.

3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, en el que la sustancia es inhibidora respecto de al menos un hongo y/o microorganismo escogido en el grupo constituido por *Tricoderma sp.* (anamorfo: *Hypocrea sp.*), *Saccharomyces sp.*, *Clostridium sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Pichia sp.* y *Talaromyces sp.*

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la sustancia se elimina del material que contiene lignocelulosa pretratado según la etapa (a) y/o de la parte (i) y/o de la (ii) del hidrolizado según la etapa (c).

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la sustancia se elimina añadiendo al menos un adsorbente al material que contiene lignocelulosa pretratado y/o a la parte (i) y/o a la (ii) del hidrolizado según la etapa (c).

6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el adsorbente se escoge en el grupo constituido por carbón activo, sílice, minerales silicatados, zeolitas, carbón, arcilla, resinas de intercambio iónico y mezclas de las sustancias anteriores.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la sustancia se elimina de la parte (i) y/o de la (ii) del hidrolizado según la etapa (c), mediante evaporación.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se añade al recipiente de cultivo una cantidad adicional de 0,1 a 30 % (peso/volumen) de material que contiene lignocelulosa.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el material que contiene lignocelulosa se obtiene separándolo del recipiente de pretratamiento.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proporción de la parte (i) del hidrolizado a la parte (ii) es de 0,01 a 1.

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la concentración de azúcares solubles durante la fermentación según la etapa d) es inferior al 10 % en relación peso/volumen.

12. Procedimiento para la producción de un compuesto orgánico que comprende las etapas tales como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y que comprende además la etapa de (f1) poner en contacto la parte (ii) del hidrolizado con al menos un microorganismo y/o un hongo capaz de producir un compuesto orgánico escogido en el grupo compuesto por ácidos orgánicos, aminoácidos, caprolactamas, antibióticos, vitaminas, enzimas, nucleótidos / nucleósidos, biogás, proteínas, polisacáridos, aminoglucanos, disolventes orgánicos biofueles, biotensioactivos, aminoglucanos, derivados de azúcares y sus mezclas;

o

(f2) someter la parte (ii) del hidrolizado a un proceso de conversión química, de conversión catalítica, de separación cromatográfica, de separación mediante membranas o de cristalización.



