

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 816 631**

51 Int. Cl.:

C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2013 PCT/EP2013/062936**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO13190064**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2013 E 13729968 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 2864493**

54 Título: **Producción de enzimas para biomasa lignocelulósica**

30 Prioridad:

21.06.2012 IT TO20120545

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

05.04.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PARAVISI, STEFANO;
VOLPATI, LAURA;
GIORCELLI, CHIARA;
RACCAGNI, ELISA;
OTTONELLO, PIERO y
CHERCHI, FRANCESCO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 816 631 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

Producción de enzimas para biomasa lignocelulósica

5 Antecedentes

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones bioquímicas. Casi todas las células hospedadoras vivas producen enzimas. Algunas enzimas producidas por microorganismos de las clases de hongos son útiles en los procesos de conversión de materia prima lignocelulósica en productos químicos. En estos procesos de conversión, se usan enzimas como catalizador en la reacción de hidrólisis de glúcidos complejos, tales como celulosa y hemicelulosa, en glúcidos con menor peso molecular.

Se sabe que la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa a partir de materias primas lignocelulósicas requiere una mezcla bien equilibrada de enzimas que consisten en endoglucanasas, celobiohidrolasas, β -glucosidasas, xilanasas, mananasas y diversas enzimas que actúan sobre cadenas laterales de xilanos y mananos. La producción de enzimas es una etapa importante en el proceso de biomasa en etanol ya que la producción de enzima o mezcla de enzimas y su aplicación están actualmente entre las etapas de procesamiento más costosas para rutas de base biológica para la utilización de biomasa lignocelulósica.

Los sistemas enzimáticos del hongo degradante de plantas *Trichoderma reesei* son los más ampliamente investigados y se cree que es el organismo más ampliamente usado para obtener mezclas enzimáticas comerciales. *T. reesei* produce numerosas enzimas degradantes de celulosa y hemicelulosa incluso si la secreción de β -glucosidasa extracelular es baja. Como es bien sabido que el contenido de actividad de β -glucosidasa es crucial para obtener alta conversión de celulosa, la solución de enzima de *T. reesei* se complementa normalmente con β -glucosidasas para obtener una solución enzimática bien equilibrada y además hacer avanzar la hidrólisis de la celulosa. En otros casos, las soluciones de enzima o mezcla de enzimas comerciales también podrían obtenerse usando enzimas producidas por otros hongos buenos productores de β -glucosidasa.

Las enzimas para los procesos de conversión de materias primas lignocelulósicas se producen cultivando las células hospedadoras en medio complejo que comprende celulosa pura y/o incluso fuentes de carbono más caras.

Para reducir el coste final de la producción de enzimas, se han hecho muchos intentos por usar sustratos menos caros que la celulosa pura. Se han usado materias primas lignocelulósicas pretratadas como sustrato. Muchos grupos de investigación han intentado producir enzimas o mezclas de enzimas usando, de alguna manera, la misma materia prima usada para la producción de bioetanol para reducir los costes de la mezcla de enzimas final.

Sin embargo, no se ha informado de una relación clara entre el sustrato usado para el cultivo y el rendimiento hidrolítico de las enzimas resultantes sobre los sustratos particulares en estudios previos sobre *T. reesei* Rut C30 o *Penicillium brasilianum*. Puede encontrarse una revisión de los resultados obtenidos sobre el cultivo de enzimas en diferentes fuentes de carbono en Juhasz, T., Szengyel, Z., Reczey, K., Siika-Aho, M., Viikari, L. "Characterization of enzyme or enzyme mixtures and hemienzyme or enzyme mixtures produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources", (Process Biochem, 40, 3519-3525) y en Jorgensen, H., Olsson, L., "Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888: Effect of substrate on hydrolytic performance" (Enzyme Microb Technol, 38, 381-390). Uno de estos procesos se describe en el documento WO 2007/005918. Este proceso añade el sustrato lignocelulósico pretratado descrito como un inductor del crecimiento enzimático, mientras se usa adición constante de glucosa como alimento para el crecimiento del organismo. El propósito indicado de esta tecnología es remplazar el alimento de glucosa y la celulosa pura usada actualmente para la producción de enzimas o mezcla de enzimas en una célula hospedadora, con un material que pudiera usarse como fuente de carbono principal y como inductor para la producción de enzimas. La ventaja de esto es que el coste de producción se reduce debido al uso de un inductor (biomasa lignocelulósica) que está fácilmente disponible y, por tanto, es más barato que la celulosa pura. Como inductor, el documento WO 2007/005918 usa una pequeña cantidad de biomasa y añade continuamente glucosa para alimentar el organismo.

El documento US 7494792 divulga un proceso para producir enzimas celolíticas y/o hemicelulolíticas, que usa el residuo de la fermentación etanólica de hidrolizados enzimáticos de biomasa celulósica o lignocelulósica. El proceso puede integrarse en un proceso para la producción de etanol a partir de biomasa celulósica o lignocelulósica, en que el residuo sirve para la producción de las enzimas usadas en la hidrólisis enzimática del sustrato pretratado. La solución glucídica obtenida para la producción de etanol a partir de la hidrólisis se separa de la fracción sólida no hidrolizada, esencialmente constituida por lignina y se usa para fermentación etanólica. La glucosa es el glúcido principal extraído en esta etapa. El residuo de la fermentación etanólica, después de separar el etanol, se usa como fuente inductora de carbono o como fuente principal de carbono para la producción de enzimas.

Como consideración general, hay interés en convertir toda la fracción o la más relevante de la materia prima lignocelulósica pretratada en productos valiosos. El uso de una fracción de materia prima lignocelulósica pretratada como sustrato para la producción de enzimas puede reducir el rendimiento de una planta para el proceso de conversión de materia prima lignocelulósica en productos útiles.

Se ha encontrado una revisión de las opciones principales disponibles en el pretratamiento de biomasa en Chiaramonti D., Prussi M., Ferrero S., Oriani L., Ottonello P., Torre P. y Cherchi F. "Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method" (Biomass and Bioenergy (2012) 46, 25-35). En particular, este trabajo se refiere a un nuevo proceso que usa solamente agua y vapor como medio de reacción en lugar de autohidrólisis y procesos de explosión de vapor. En cuanto al efecto del pretratamiento sobre la hidrólisis enzimática, dicho nuevo proceso de pretratamiento consiguió rendimientos similares a la explosión de vapor sobre glucanos: sin embargo, esto se obtuvo reduciendo la formación de productos de degradación a partir de glúcidos, principalmente a partir de glúcidos C5. Estos resultados hicieron que el sistema de pretratamiento propuesto fuera adecuado para desarrollo adicional e industrialización a escala piloto e industrial. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar un proceso que use mejor una materia prima pretratada lignocelulósica para producir enzimas.

Sumario

La invención se refiere a un proceso como se define en las reivindicaciones, concretamente un proceso para producir al menos una primera enzima que puede hidrolizar una primera biomasa lignocelulósica pretratada, que comprende la etapa de cultivar la célula hospedadora en un entorno de cultivo reducido en glúcidos que comprende la célula hospedadora, agua y una composición sólida, obtenida de una segunda biomasa lignocelulósica pretratada que comprende un glúcido complejo seleccionado del grupo de glucanos y xilanos insolubles en agua poliméricos, y una lignina; en el que la relación de la cantidad total de los glúcidos complejos (glucanos y xilanos) a la cantidad total de la lignina en la composición sólida es menor que la relación de la cantidad total de los glúcidos complejos a la cantidad total de la lignina en la segunda biomasa lignocelulósica pretratada.

Las realizaciones preferidas del método de la invención son como se definen en las reivindicaciones dependientes. También se divulga que el cultivo puede hacerse en condiciones de reducción de glúcidos simples, de tener una cantidad de glúcido o glúcidos simples añadidos en el intervalo de un 0 a un 10 % en peso del entorno de cultivo reducido en glúcidos en una base seca, durante una parte del tiempo de cultivo que es al menos un 50 % del tiempo de cultivo.

Se divulga además que la composición sólida puede obtenerse de la segunda biomasa lignocelulósica pretratada por un proceso que comprende las etapas de hidrolizar al menos una fracción de la segunda biomasa lignocelulósica pretratada en presencia de un catalizador de hidrólisis, para producir una composición hidrolizada que comprende la composición sólida y una solución de agua y glúcidos solubles en agua; y retirar al menos un 50 % de la solución de agua y glúcidos solubles en agua de la composición hidrolizada.

También se divulga que la retirada de una fracción de la composición hidrolizada puede hacerse mediante al menos un método comprendido en el grupo de decantación, sedimentación, centrifugación, filtración, filtración en prensa y lavado.

Se divulga además que la composición sólida puede obtenerse de la segunda biomasa lignocelulósica pretratada por un proceso que comprende las etapas de hidrolizar al menos una fracción de la segunda biomasa lignocelulósica pretratada en presencia de un catalizador de hidrólisis, para producir una composición hidrolizada que comprende glúcidos complejos solubles en agua y lignina; convertir al menos una fracción de los glúcidos solubles en agua en la composición hidrolizada para producir una composición convertida que comprende al menos un producto derivado de glúcido, y la composición sólida; y retirar una fracción de la composición convertida, comprendiendo dicha fracción al menos una fracción del al menos un producto derivado de glúcido.

También se divulga que la retirada de una fracción de la composición convertida puede hacerse mediante al menos un método comprendido en el grupo de decantación, sedimentación, centrifugación, filtración, filtración en prensa, lavado, evaporación y destilación.

Se divulga además que el catalizador de hidrólisis puede comprender una segunda enzima o mezcla de enzimas, y que puede seleccionarse del grupo que consiste en iones de hidrógeno, ácidos orgánicos y ácidos inorgánicos.

También se divulga que la conversión de la composición hidrolizada puede comprender una fermentación.

Se divulga además que el al menos un producto derivado de glúcido puede comprender etanol.

Se divulga además que la parte del tiempo de cultivo en condiciones de reducción de glúcidos simples puede seleccionarse del grupo que consiste en al menos un 75 % del tiempo de cultivo, al menos un 85 % del tiempo de cultivo, al menos un 90 % del tiempo de cultivo, al menos un 95 % del tiempo de cultivo y al menos un 98 % del tiempo de cultivo.

También se divulga que la parte del tiempo de cultivo en condiciones de reducción de glúcidos simples puede ser igual que el tiempo de cultivo.

Se divulga además que la cantidad de glúcido o glúcidos simples añadidos está en el intervalo de un 0 a un 5 %, de un 0 a un 2,5 %, de un 0 a un 2,0 %, de un 0 a un 1,0 % en peso del entorno de cultivo en una base seca. También se divulga que puede no haber glúcidos simples añadidos en el entorno de cultivo reducido en glúcidos.

5 También se divulga que al menos la primera enzima se recoge separando el entorno de cultivo reducido en glúcidos en al menos una composición recogida, que comprende al menos una fracción de la primera enzima, y una composición agotada, que comprende al menos una fracción del residuo sólido de la composición sólida.

10 También se divulga que la enzima o mezcla de enzimas puede usarse además para hidrolizar la primera biomasa lignocelulósica y la primera biomasa lignocelulósica y la segunda biomasa lignocelulósica pretratada comprenden, ambas, biomasa lignocelulósica derivada del grupo que consiste en el mismo género de gramínea o más preferiblemente la misma especie de gramínea.

15 Se divulga además que la cantidad total de glúcidos complejos en la composición agotada puede estar presente en un intervalo seleccionado del grupo que consiste en de un 0 a un 30 %, de un 0 a un 20 %, de un 0 a un 15 %, de un 0 a un 10 %, de un 0 a un 7,5 %, de un 0 a un 5 %, de un 0 a un 2,5 % en peso en una base seca.

Breve descripción de las figuras

20 La figura 1a es un gráfico del rendimiento de hidrólisis de glucosa de acuerdo con ejemplos comparativos y de trabajo.

25 La figura 1b es un gráfico del rendimiento de hidrólisis de xilosa de acuerdo con ejemplos comparativos y de trabajo.

Descripción detallada

30 Se ha descubierto un proceso para la producción de enzimas, caracterizado por el hecho de que las células hospedadoras que producen las enzimas se cultivan en un entorno de cultivo reducido en glúcidos. El entorno de cultivo reducido en glúcidos comprende las células hospedadoras, agua y una composición sólida que se obtiene de una biomasa lignocelulósica pretratada; la composición sólida comprende glúcidos complejos y lignina, y se caracteriza por una relación de la cantidad total de los glúcidos complejos a la cantidad total de la lignina menor que la relación de la cantidad total de los glúcidos complejos a la cantidad total de la lignina de la biomasa lignocelulósica pretratada de la que se obtiene. En otras palabras, la composición sólida en el entorno de cultivo reducido en glúcidos se obtiene de una biomasa lignocelulósica pretratada retirando una fracción de, pero no todos, los glúcidos complejos contenidos en la biomasa lignocelulósica pretratada. La composición sólida en el entorno de cultivo reducido en glúcidos tiene una cantidad menor de glúcidos complejos en una base seca con respecto a la biomasa lignocelulósica pretratada, pero aún comprende glúcidos complejos.

40 Los glúcidos que se han retirado de la biomasa lignocelulósica pretratada pueden convertirse en productos químicos útiles, tales como etanol.

45 Las enzimas producidas por las células hospedadoras pueden usarse entonces en la hidrólisis de biomasa lignocelulósica y biomasa lignocelulósica pretratada. La celulosa, la hemicelulosa y la lignina son los tres polímeros principales que constituyen biomasa lignocelulósica. La celulosa y la hemicelulosa son glúcidos poliméricos.

50 En el contexto de la presente divulgación, los glúcidos simples son los glúcidos monoméricos, y pueden seleccionarse del grupo que consiste en glucosa, xilosa, arabinosa, manosa, galactosa y fructosa. Debe apreciarse que puede haber otros glúcidos simples que no están en la lista precedente. Los glúcidos simples pertenecen al grupo de glúcidos solubles en agua. Los glúcidos solubles son glúcidos, que cuando están en presencia de un disolvente específico, tal como agua, forman una solución homogénea en el disolvente.

55 Los glúcidos simples pueden alimentar las células hospedadoras directamente, es decir, la célula hospedadora no necesita usar enzimas para metabolizar los glúcidos simples.

60 Los glúcidos oligoméricos son glúcidos poliméricos que son solubles en agua. Los glúcidos oligoméricos están constituidos por más un glúcido monomérico. Los glúcidos oligoméricos pueden metabolizarse por la célula hospedadora solamente en presencia de una o más enzimas, que se producen habitualmente por la célula hospedadora.

65 Los glúcidos complejos son glúcidos poliméricos que no son solubles en agua, tales como glucanos y xilanos insolubles en agua, como se define en la reivindicación 1. Los glucanos son una clase de glúcidos complejos que comprenden moléculas poliméricas de glucosa que tienen diferentes grados de polimerización. Los xilanos son una clase de glúcidos complejos que comprenden moléculas poliméricas de xilosa que tienen diferentes grados de polimerización.

5 Muchos procesos de conversión de biomasa lignocelulósica en productos químicos convierten solamente una fracción de glúcidos complejos, y producen una composición que contiene principalmente lignina y la fracción restante de glúcidos complejos no convertidos como subproducto. En algunos casos, incluso si es posible convertir adicionalmente los glúcidos complejos en la biomasa lignocelulósica pretratada, el proceso de conversión se detiene porque no sería económicamente conveniente. La composición que aún contiene la fracción restante de glúcidos complejos a menudo se quema para producir calor, es decir, una aplicación de bajo valor de los glúcidos contenidos en biomasa lignocelulósica.

10 Los autores de la invención han descubierto sorprendentemente que las células hospedadoras pueden cultivarse en un entorno de cultivo reducido en glúcidos que comprende una composición sólida obtenida retirando al menos una fracción de glúcidos complejos de una biomasa lignocelulósica pretratada y que las células hospedadoras pueden usar la fracción restante de glúcidos complejos como fuente de carbono. Los autores de la invención también han descubierto que la producción de enzimas a partir de la célula hospedadora puede ser comparable o estar
15 aumentada con respecto a la producción de enzimas obtenida usando un sustrato más caro como fuente de carbono.

Los glúcidos simples tales como glucosa y xilosa usados para alimentar tradicionalmente células hospedadoras pueden remplazarse parcial o completamente por la composición sólida menos cara.

20 Preferiblemente, el entorno de cultivo reducido en glúcidos contiene ninguno, o pocos, glúcidos simples.

Cualquier método o combinación de métodos conocidos en la técnica y aún por inventar puede usarse para obtener la composición sólida a partir de una segunda biomasa lignocelulósica pretratada. Los métodos pueden implicar el
25 uso de procesos químicos, físicos, biológicos o combinación de procesos.

Preferiblemente, los glúcidos complejos se retiran de la biomasa lignocelulósica pretratada y se convierten en productos derivados de glúcido, que son productos químicos valiosos. El proceso de conversión puede lograrse en una sola etapa o en múltiples etapas, es decir, los productos derivados de glúcido pueden obtenerse convirtiendo los
30 glúcidos complejos retirados en productos intermedios.

En una realización preferida, la composición sólida puede obtenerse hidrolizando al menos una fracción de los glúcidos complejos en la biomasa lignocelulósica pretratada.

35 La hidrólisis es un proceso que convierte los glúcidos complejos en glúcidos solubles en agua y glúcidos oligoméricos en glúcidos que tienen menor peso molecular.

La hidrólisis de la biomasa pretratada se realiza en presencia de un catalizador de hidrólisis y finalmente otros aditivos, que pueden ser de ayuda o necesarios para que se produzca la hidrólisis de manera eficaz. En el contexto
40 de la presente invención, el catalizador de hidrólisis y los aditivos pueden denominarse "composición de catalizador de hidrólisis".

En una realización preferida, la composición de catalizador de hidrólisis comprende una enzima o mezcla de enzimas y la hidrólisis es una hidrólisis enzimática.

45 En otra realización preferida, la hidrólisis enzimática se realiza de acuerdo con el proceso divulgado en el documento WO 2010/113130.

En otra realización, el catalizador de hidrólisis puede comprender un ácido y la hidrólisis es una hidrólisis ácida. Pueden usarse todos los ácidos orgánicos e inorgánicos que pueden realizar una hidrólisis de la segunda biomasa lignocelulósica pretratada. El ácido puede estar también presente en soluciones diluidas. También pueden usarse
50 iones de hidrógeno en el proceso de hidrólisis.

La hidrólisis de la biomasa lignocelulósica pretratada puede producirse en un entorno líquido. El entorno líquido puede obtenerse añadiendo algún líquido, preferiblemente agua o que comprenda agua, a la biomasa lignocelulósica pretratada. Los líquidos también pueden añadirse en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica. Por ejemplo, en una realización preferida, la biomasa lignocelulósica se pretrata remojando la biomasa lignocelulósica en un líquido que comprende agua, y después realizando explosión de vapor de la biomasa lignocelulósica remojada. El líquido también puede añadirse en la etapa de hidrólisis o a la composición de catalizador de hidrólisis. En el caso de
55 hidrólisis enzimática, el líquido puede estar presente en la mezcla enzimática. En el caso de hidrólisis ácida, el líquido puede estar presente en la solución ácida diluida.

Como la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica pretratada se produce en un entorno líquido, que preferiblemente comprende agua, la composición hidrolizada obtenida de la biomasa lignocelulósica comprenderá una solución de agua y glúcidos solubles en agua, y una composición sólida, que comprende glúcidos complejos que no se han hidrolizado en glúcidos solubles en agua. La composición sólida de la composición hidrolizada comprende también la
65

lignina contenida en la biomasa lignocelulósica pretratada. La lignina también puede haberse modificado y/o convertido parcialmente en otros componentes como un efecto de los procesos de pretratamiento e hidrólisis.

5 Incluso si la composición hidrolizada puede incluir otros componentes, para el alcance de la presente invención, la composición hidrolizada comprende al menos una solución de agua y glúcidos solubles en agua y una composición sólida que comprende además glúcidos complejos y lignina de la composición sólida.

10 La composición sólida puede obtenerse retirando al menos un 50 % de la solución de agua y glúcidos solubles en agua de la composición hidrolizada. Se advierte que, aunque retirar la cantidad más grande posible de la solución de agua y glúcidos solubles en agua es una realización preferida, algunos glúcidos solubles en agua aún pueden estar presentes en la composición sólida. En otra realización, la composición sólida no comprende glúcidos solubles en agua.

15 La fracción retirada de la composición hidrolizada, que comprende agua y glúcidos solubles en agua, puede comprender además otros componentes de la composición hidrolizada, tal como al menos una fracción del catalizador de hidrólisis y aditivos que se forman durante el pretratamiento o la hidrólisis. La fracción retirada puede comprender además una fracción de la composición sólida que comprende lignina y glúcidos complejos. En una realización preferida, el entorno reducido en glúcidos comprende sustancialmente toda la composición sólida en la composición hidrolizada y sustancialmente toda la solución de agua y glúcidos solubles en agua se retira.

20 En otra realización, el entorno reducido en glúcidos comprende toda la composición sólida en la composición hidrolizada y toda la solución de agua y glúcidos simples se retira.

25 Cualquier método y combinación de métodos conocido en la técnica e incluso aún por inventar puede usarse para retirar al menos un 50 % de solución de agua u glúcidos solubles en agua de la composición hidrolizada. Estos métodos comprenden tratamientos químicos y físicos de la composición hidrolizada. Los tratamientos químicos y físicos pueden realizarse secuencial o simultáneamente.

30 Los métodos preferidos para retirar al menos una fracción de la composición hidrolizada comprenden decantación, sedimentación, centrifugación, filtración, incluyendo filtración en membrana y filtración en prensa y lavado.

35 La hidrólisis de al menos una fracción de la biomasa lignocelulósica pretratada y la retirada de al menos un 50 % de la solución de agua y glúcidos solubles en agua puede producirse secuencialmente o de forma al menos parcialmente simultánea. En una realización, al menos una fracción de los glúcidos simples puede retirarse, por ejemplo, por filtración en membrana, mientras continúa la hidrólisis.

40 La composición sólida puede procesarse adicionalmente antes de insertarse en el entorno de cultivo reducido en glúcidos de las células hospedadoras para la producción de enzimas. La composición sólida también puede lavarse, preferiblemente con agua, para retirar adicionalmente los glúcidos solubles en agua u otros componentes que pueden afectar a o reducir la producción de las enzimas. Otros componentes necesarios para cultivar las células hospedadoras pueden añadirse a la composición sólida o al entorno de cultivo reducido en glúcidos.

45 La fracción de la solución de agua y glúcidos solubles en agua retirada de la composición hidrolizada, puede convertirse en productos químicos útiles.

50 En otra realización preferida, la composición sólida puede obtenerse hidrolizando al menos una fracción de los glúcidos complejos en la biomasa lignocelulósica pretratada en presencia de un catalizador de hidrólisis para producir una composición hidrolizada que comprende glúcidos complejos y lignina y la solución de agua y glúcidos solubles en agua; a continuación, convirtiendo al menos una fracción de los glúcidos solubles en agua en la composición hidrolizada en una composición convertida que comprende al menos un producto derivado de glúcido y una composición sólida que comprende glúcidos complejos y lignina; y retirando al menos una fracción del producto derivado de glúcido de la composición convertida.

55 Todas las consideraciones sobre la hidrólisis indicadas previamente en la presente memoria descriptiva se aplican también para esta realización. La composición hidrolizada puede someterse a procesamiento adicional dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, el proceso puede implicar la conversión de los glúcidos solubles en agua en productos y puede incluir tratamientos físicos y químicos, por ejemplo, separación, purificación, corrección del pH, dilución y concentración. Los glúcidos solubles en agua en la composición hidrolizada se convierten, parcial o completamente, en una composición convertida, que comprende al menos un producto derivado de glúcido.

60 La conversión o modificación de cualquier otro componente de la composición hidrolizada también puede producirse durante la conversión de los glúcidos simples. En particular, los glúcidos complejos y la lignina en la composición hidrolizada pueden verse afectados por el proceso de conversión para generar una composición sólida que comprende glúcidos complejos y lignina; indicado de otra manera, la composición sólida puede ser los glúcidos complejos y lignina en la composición hidrolizada o una modificación de glúcidos complejos y lignina en la composición hidrolizada. La composición convertida puede comprender además más de un producto derivado de

glúcidos solubles en agua.

La conversión de los glúcidos solubles en agua puede producirse en presencia de un catalizador. El catalizador puede comprender finalmente otros aditivos, que pueden ser de ayuda o necesarios para que

la conversión se produzca de forma eficaz. En el contexto de la presente invención, el catalizador y los aditivos pueden denominarse "composición de catalizador".

El catalizador puede ser cualquier agente que promueva la conversión de glúcidos solubles en agua en al menos un producto derivado de glúcido. El catalizador puede ser un catalizador inorgánico, orgánico o biológico.

Incluso si puede usarse cualquier proceso para convertir al menos una fracción de la composición hidrolizada, la fermentación es un proceso preferido y el producto derivado de glúcido es un producto fermentado. La fermentación es cualquier proceso para convertir glúcidos simples en productos fermentados en presencia de un microorganismo o mezcla de microorganismos.

Un microorganismo preferido para convertir al menos una fracción de la composición hidrolizada es una levadura.

Levadura habitualmente indica un hongo ascomiceto fundamentalmente unicelular que habitualmente tiene poco o nada de micelio, que típica se reproduce de forma asexual por gemación, permaneciendo a menudo las células hijas adheridas y que pueden fermentar carbohidratos en alcohol y dióxido de carbono. Preferiblemente, la levadura pertenece al género *Saccharomyces*. Las especies de *Saccharomyces* son como se definen filogenéticamente por Kurtzman (2003) FEMS Yeast Research 3:417-432, e incluyen *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. ikatae*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. pastorianus* y *S. bayanus*.

Dependiendo del catalizador o el microorganismo, pueden producirse diferentes productos derivados de glúcido. Incluso si puede producirse cualquier otro producto derivados de glúcido, en una realización preferida, el producto derivado de glúcido es etanol. La hidrólisis de glúcidos complejos en una composición hidrolizada y la conversión de al menos una fracción de los glúcidos solubles en agua en la composición hidrolizada en al menos un producto derivado de glúcido puede producirse secuencial o simultáneamente. En una realización preferida, la hidrólisis enzimática y la fermentación en etanol se producen simultáneamente y el proceso se conoce en la técnica como sacarificación y fermentación simultánea.

La conversión de al menos una fracción de los glúcidos solubles en agua en la composición hidrolizada puede producirse en un entorno líquido. El entorno líquido puede obtenerse añadiendo algún líquido, preferiblemente agua o que comprenda agua, a la composición hidrolizada. Los líquidos también pueden estar presentes en la composición hidrolizada o en la composición de catalizador.

Como la conversión de al menos una fracción de los glúcidos solubles en agua se produce en un entorno líquido, que preferiblemente comprende agua, la composición convertida habitualmente comprenderá el al menos un producto derivado de glúcido, agua y una composición sólida, que comprende glúcidos complejos y lignina. La lignina y los glúcidos complejos en la composición hidrolizada también pueden modificarse y/o convertirse parcialmente en otros componentes como un efecto del proceso de hidrólisis y conversión. Los glúcidos solubles en agua que no se han convertido en productos también pueden estar comprendidos en la composición convertida.

Para el alcance de la presente invención, la composición convertida comprende al menos un producto derivado de glúcido y una composición sólida que comprende glúcidos complejos y lignina. El al menos un producto derivado de glúcido puede ser soluble o insoluble en la composición convertida. En una realización preferida, el producto derivado de glúcido es soluble en la composición convertida. Por ejemplo, el etanol es soluble en la composición fermentada. La composición sólida se obtiene retirando una fracción de la composición convertida que comprende al menos una fracción del producto derivado de glúcido. Se advierte que, aunque retirar la cantidad más grande posible del producto derivado de glúcido es una realización preferida, algún producto derivado de glúcido aún puede estar presente en la composición sólida. En otra realización, la composición sólida no comprende uno o más productos derivados de glúcido.

La fracción retirada de la composición convertida puede comprender además otros componentes de la composición convertida, tales como glúcidos solubles en agua que no se han convertido, agua, al menos una fracción del catalizador y aditivos. Puede comprender además una fracción de la composición sólida que comprende lignina y glúcidos complejos de la composición convertida. En una realización preferida, el entorno reducido en glúcidos comprende sustancialmente toda la composición sólida en la composición convertida y la fracción retirada de la composición convertida comprende sustancialmente todos los líquidos en la composición convertida.

En otra realización, el entorno reducido en glúcidos comprende toda la composición sólida en la composición convertida y la fracción retirada de la composición convertida comprende todos los líquidos en la composición convertida.

Cualquier método y combinación de métodos conocido en la técnica e incluso aún por inventar puede usarse para retirar una fracción de composición convertida, que comprende el al menos un producto derivado de glúcido. Estos métodos comprenden tratamientos químicos y físicos de la composición convertida. Los tratamientos químicos y físicos pueden realizarse secuencial o simultáneamente.

5 Los métodos preferidos para retirar al menos una fracción de la composición convertida comprenden decantación, sedimentación, centrifugación, filtración, incluyendo filtración en membrana y filtración en prensa, lavado, evaporación y destilación.

10 En una realización preferida, el producto convertido es etanol y la composición sólida se obtiene de la composición convertida evaporando o destilando etanol y retirando la fracción principal de los líquidos en la composición convertida por al menos un método del grupo de decantación, sedimentación, centrifugación, filtración, incluyendo filtración en membrana y filtración en prensa y lavado.

15 La conversión de los glúcidos solubles en agua en la composición hidrolizada en al menos un producto derivado de glúcido y la retirada de una fracción de la composición convertida que comprende al menos una fracción del producto convertido puede producirse de forma al menos parcialmente simultánea. En una realización, el producto convertido es etanol y puede retirarse, por ejemplo, por evaporación o destilación, mientras los glúcidos simples en la composición hidrolizada se fermentan en etanol.

20 En otra realización, la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica pretratada, la conversión de al menos una fracción de los glúcidos solubles en agua y la retirada de una fracción de la composición convertida se producen de forma al menos parcialmente simultánea. En una realización preferida, el producto convertido es etanol y puede retirarse, por ejemplo, por evaporación Y destilación, durante sacarificación y fermentación simultánea.

25 La composición sólida puede procesarse adicionalmente antes de insertarse en el entorno de cultivo reducido en glúcidos de las células hospedadoras para la producción de enzimas. La composición sólida también puede lavarse, preferiblemente con agua, para retirar adicionalmente los glúcidos solubles en agua u otros componentes que pueden afectar a o reducir la producción de las enzimas.

30 Proceso de producción de enzimas

Se conoce bien en la técnica la manera de producir enzima o mezcla de enzimas en una célula hospedadora de origen fúngico, tal como hongos filamentosos o de origen bacteriano. El proceso de crecimiento de la invención puede ser un proceso bien conocido, excepto que el alimento comprende una composición sólida obtenida de una biomasa lignocelulósica pretratada y que tiene una cantidad total de glúcidos complejos menor que la cantidad total de glúcidos complejos en la biomasa lignocelulósica pretratada. En una realización preferida, el alimento de glúcidos simples está limitado durante el cultivo.

40 Los procedimientos de producción de enzimas son bien conocidos en la técnica. En el contexto de la presente invención, la enzima o mezcla de enzimas es preferiblemente una enzima o mezcla de enzimas extracelular secretada en el entorno de cultivo por la célula hospedadora. Como alternativa, la enzima o mezcla de enzimas es intracelular.

45 Una célula hospedadora que pueda producir enzima o mezcla de enzimas se hace crecer en condiciones de cultivo precisas a una tasa de crecimiento particular. Cuando el cultivo de células hospedadoras se introduce en el entorno de cultivo, el cultivo inoculado pasa a través de varias fases. Inicialmente no se produce crecimiento. Este periodo se denomina fase de retardo y puede considerarse un periodo de adaptación. Durante la siguiente fase, denominada "fase exponencial", la tasa de crecimiento del cultivo de células hospedadoras aumenta gradualmente. Después de un período de crecimiento máximo, la tasa se interrumpe y el cultivo entra en fase estacionaria. Después de un periodo adicional de tiempo, el cultivo entra en la fase de muerte y el número de células viables disminuye. Cuando, en la fase de crecimiento, la enzima o mezcla de enzimas de interés se expresa, depende de la enzima de interés y la célula hospedadora. La enzima o mezcla de enzimas puede, en una realización, expresarse en la fase exponencial. En otra realización, la enzima o mezcla de enzimas puede producirse en la fase transitoria entre la fase exponencial y la fase estacionaria. La enzima o mezcla de enzimas también puede, en otra realización, expresarse en la fase estacionaria y/o justo antes de la esporulación. La enzima o mezcla de enzimas puede, de acuerdo con la invención, producirse también en más de una de las fases mencionadas anteriormente.

60 En otras palabras, de acuerdo con la invención, la célula hospedadora se cultiva en un entorno adecuado y en condiciones que permitan que al menos una enzimas o mezcla de enzimas se exprese, preferiblemente se secrete y opcionalmente se recupere. Aunque como se indica anteriormente, el crecimiento de la célula hospedadora tiene muchas fases técnicas, para los fines de esta memoria descriptiva, estas fases se agrupan conjuntamente en el término cultivo. El cultivo de células hospedadoras tiene lugar en un entorno de cultivo reducido en glúcidos que comprende una composición sólida obtenida de una biomasa lignocelulósica pretratada retirando al menos una fracción de glúcidos complejos. El entorno de cultivo reducido en glúcidos puede comprender además una fuente de carbono adicional, una fuente de nitrógeno y sales adicionales requeridas para el metabolismo del microorganismo.

De acuerdo con una realización preferida, la biomasa lignocelulósica pretratada se ha pretratado remojándola/lavándola y después por explosión de vapor como se describe en el documento WO 2010/113129.

5 Después del cultivo, la enzima o mezcla de enzimas también puede recuperarse opcionalmente usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la recuperación de enzima o mezcla de enzimas extracelular del entorno de cultivo reducido en glúcidos puede hacerse usando procedimientos convencionales incluyendo, aunque sin limitación, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación. Los procedimientos para la recuperación de una enzima o mezcla de enzimas intracelular también son bien conocidos en la técnica.

Al menos en el contexto de la presente invención, el término "cultivo" significa cualquier proceso de producción de una enzima o mezcla de enzimas usando un cultivo en masa que consiste en una o más células hospedadoras. La presente invención es útil especialmente para producción a escala industrial, por ejemplo, que tiene un entorno de cultivo de al menos 50 litros, preferiblemente al menos 5 litros, más preferiblemente al menos 1 litro.

La enzima o mezcla de enzimas puede incluir, aunque sin limitación, cualquiera de las que pertenecen al grupo de enzimas o mezcla de enzimas que comprende endoglucanasas (endo-1,4- β -D-glucanasas), celobiohidrolasas o exoglucanasas (exo-1,4- β -D-glucanasas), β -glucosidasa (1,4- β -D-glucosidasa), endo-1,4- β -xilanasas, endo-1,4- β -mananasas, 1,4- β -xilosidasas y 1,4- β -manosidasas.

Un proceso de la invención puede realizarse como un proceso discontinuo, uno semicontinuo, uno semicontinuo repetido o uno continuo.

Un proceso de la invención puede realizarse de forma aeróbica o anaeróbica. Algunas enzimas se producen por cultivo sumergido y algunas por cultivo en superficie. El cultivo sumergido se prefiere de acuerdo con la invención.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la invención, como se define en las reivindicaciones, se refiere a procesos de producción de una enzima o mezcla de enzimas en una célula hospedadora, que comprende cultivar dicha célula hospedadora que puede producir enzimas o mezcla de enzimas en condiciones que dan lugar a la producción de una enzima o mezcla de enzimas, tal como enzima o mezcla de enzimas, en los que se usa una composición sólida obtenida de una biomasa lignocelulósica pretratada para hacer crecer la célula hospedadora en condiciones de reducción de glúcidos simples, de tener una cantidad de glúcido o glúcidos simples añadidos en el intervalo de un 0 a un 10 % en peso del entorno de cultivo reducido en glúcidos en una base seca, durante una parte del tiempo de cultivo que es al menos un 50 % del tiempo de cultivo. El tiempo de cultivo es la cantidad de tiempo medido desde la adición del volumen de precultivo de la célula hospedadora al entorno de cultivo reducido en glúcidos hasta la recolección, retirada o separación de la enzima o mezcla de enzimas del entorno de cultivo reducido en glúcidos. En el caso de múltiples retiradas, el tiempo de cultivo finaliza en el momento en que se finaliza la última retirada de la primera enzima o mezcla de enzimas.

La cantidad de la composición sólida obtenida de la biomasa lignocelulósica pretratada presente en el entorno de cultivo reducido en glúcidos debe ser suficiente para el crecimiento de la célula hospedadora para producir la enzima o mezcla de enzimas.

La expresión condiciones de reducción de glúcidos simples significa, en general, que más de un 50 % en peso del alimento de la célula hospedadora es de la composición sólida obtenida de una segunda biomasa lignocelulósica pretratada y no de glúcidos simples añadidos. Una condición de reducción de glúcidos simples ejemplar es cuando la cantidad de glúcidos simples opcionales añadida al proceso, si acaso se añade algo, está en el intervalo de un 0 a un 10 % en peso del entorno de cultivo reducido en glúcidos en una base seca. Más preferiblemente, los glúcidos simples opcionales añadidos deben estar en el intervalo de un 0 a un 5 % en peso del entorno de cultivo reducido en glúcidos en una base seca, siendo de un 0 a un 2,5 % en peso incluso más preferido, siendo de un 0 a un 2,0 % lo más preferido (si acaso se añaden glúcidos simples). En el mejor caso, no hay glúcidos simples añadidos, que es la condición de reducción de glúcidos simples perfecta. Adicionalmente, la frase glúcidos simples añadidos significa que podría haber uno o más glúcidos simples añadidos. En una realización, el glúcido simple opcional está presente, pero a menos del porcentaje indicado.

Las condiciones de reducción de glúcidos simples deben mantenerse durante al menos una parte del tiempo de cultivo. Expresado cuantitativamente, las condiciones de reducción de glúcidos simples deben mantenerse durante al menos un 50 % del tiempo de cultivo, siendo un 75 % más preferido, siendo un 85 % incluso más preferido, siendo un 95 % incluso aún más preferido, siendo un 99 y un 100 % del tiempo de cultivo lo más preferido. Un 100 % del tiempo de cultivo es cuando al menos una parte del tiempo de cultivo es igual al tiempo de cultivo.

El sustrato

Los sustratos de fuente de carbono habitualmente usados como alimento para la producción de enzimas o mezcla de enzimas incluyen glucosa o glúcidos similares, con la condición de que su consumo con respecto al consumo de los glúcidos complejos esté dentro de los límites especificados. Los sustratos de fuente de nitrógeno, los

estimuladores del crecimiento y similares pueden añadirse para mejorar el cultivo y la producción de enzimas o mezcla de enzimas. Las sales de nitrógeno incluyen urea, sales de amoníaco (por ejemplo, NH_4Cl o NH_4SO_4) y péptidos. Puede usarse proteasa, por ejemplo, para digerir las proteínas para producir nitrógeno de amino libre (FAN). Dichos aminoácidos libres pueden funcionar como nutriente para la célula hospedadora, potenciando de ese modo el crecimiento y la producción de enzimas o mezcla de enzimas. Los estimuladores de cultivo preferidos para el crecimiento incluyen vitaminas y minerales. Ejemplos de vitaminas incluyen multivitaminas, biotina, pantotenato, ácido nicotínico, meso-inositol, tiamina, piridoxina, ácido paraaminobenzoico, ácido fólico, riboflavina y vitaminas A, B, C, D y E. Ejemplos de minerales incluyen minerales y sales minerales que pueden aportar nutrientes que comprenden P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn, Mn y Cu.

La celulosa pura, habitualmente usada como inductor (y fuente de carbono) en procesos de producción de enzimas o mezcla de enzimas, se reemplaza con una composición sólida obtenida de una biomasa lignocelulósica pretratada; la composición preferiblemente se destoxifica si se pretrata con ácido, por ejemplo, por lavado.

La composición sólida es una fuente de carbono y puede añadirse al entorno de cultivo reducido en glúcidos junto con una fuente de carbono, pero también puede añadirse por separado de la fuente de carbono. De acuerdo con la invención, la composición sólida puede añadirse al entorno de cultivo reducido en glúcidos antes de la inoculación, simultáneamente con la inoculación o después de la inoculación del cultivo de células hospedadoras en una cantidad al menos correspondiente a la cantidad de glúcidos complejos disponibles necesarios para hacer crecer la célula hospedadora. Cuando la composición sólida se añade durante el tiempo de cultivo, se hace un nuevo cálculo de la cantidad de glúcidos simples opcionales añadidos o la relación de glúcidos simples opcionales a la biomasa lignocelulósica. Aunque la cantidad de glúcidos simples puede no haber sido suficientemente baja durante la parte inicial del tiempo de cultivo, añadiendo la composición sólida al entorno de cultivo reducido en glúcidos, la cantidad de glúcidos simples opcionales añadida estaría dentro de los intervalos especificados, al menos durante el tiempo restante en el tiempo de cultivo.

Un experto en la materia puede determinar fácilmente el momento en que añadir y la cantidad a añadir de la composición sólida de acuerdo con el método de la invención. Durante el tramo de tiempo de cultivo, la composición sólida normalmente se consume por la célula hospedadora y se mantiene dentro de los límites especificados previamente.

Como se menciona anteriormente, la composición sólida se usa de la misma manera que se usa normalmente la glucosa en procesos bien conocidos de producción de enzimas o mezcla de enzimas.

Recolección de una o más enzimas

En el proceso divulgado, la composición sólida se usa para alimentar las células hospedadoras en el proceso de producción de enzimas. La composición sólida se obtiene de una biomasa lignocelulósica pretratada, comprendiendo dicha composición sólida glúcidos complejos y lignina. Como las células hospedadoras se alimentan mediante los glúcidos complejos en la composición sólida, se forma un residuo sólido de la composición sólida a partir de al menos una fracción de la composición sólida en el entorno de cultivo reducido en glúcidos. El residuo sólido comprende al menos una fracción de la lignina de la composición sólida y puede comprender una fracción de los glúcidos complejos de la composición sólida. La lignina puede haberse modificado en la etapa de cultivo de las células hospedadoras.

Las enzimas producidas por el cultivo de las células hospedadoras en el entorno de cultivo reducido en glúcidos puede recogerse separando el entorno de cultivo reducido en glúcidos en al menos dos fracciones, la composición recogida, que comprende al menos una fracción de las enzimas, y la composición agotada, que comprende al menos una fracción del residuo sólido de la composición sólida. El residuo sólido puede comprender la mayoría de las células hospedadoras.

Por "al menos dos fracciones" se entiende que el entorno de cultivo reducido en glúcidos puede separarse en más de dos fracciones, estando esta realización dentro del alcance de la invención.

La composición recogida puede comprender además otros componentes del entorno de cultivo reducido en glúcidos, tales como, por ejemplo, agua y aditivos contenidos en la composición sólida y/o entorno de cultivo reducido en glúcidos y/o añadidos en el cultivo de las células hospedadoras. Puede comprender además algo de la composición sólida y algo del residuo sólido. En una realización preferida, la composición recogida contiene ninguno, o muy pocos, compuestos sólidos. En otra realización preferida, la composición recogida contiene todas, o casi todas, las enzimas producidas.

La composición agotada comprende al menos una fracción del residuo sólido de la composición sólida y puede comprender además otros componentes del entorno de cultivo reducido en glúcidos, tales como, por ejemplo, agua y aditivos contenidos en el entorno reducido en glúcidos y/o añadidos en el cultivo de las células hospedadoras. Puede comprender además algunas de las enzimas. En una realización preferida, la composición agotada contiene ninguna, o muy pocas, enzimas. En otra realización preferida, la composición agotada contiene todo, o casi todo, el

residuo sólido de la composición sólida.

Puede usarse cualquier método y combinación de métodos conocido en la técnica e incluso aún por inventar para separar el entorno de cultivo reducido en glúcidos en al menos la composición recogida y la composición agotada. Estos métodos comprenden tratamientos químicos y físicos de la composición hidrolizada. Los tratamientos químicos y físicos pueden realizarse secuencial o simultáneamente.

Los métodos preferidos para separar el entorno de cultivo reducido en glúcidos en al menos la composición recogida y la composición agotada comprenden al menos un método del grupo de centrifugación, filtración, diálisis, lavado y filtración en prensa.

La composición recogida y la composición agotada pueden someterse a cualquier proceso adicional dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, para ejemplos de separación, purificación, corrección del pH, dilución, concentración.

La biomasa lignocelulósica

En general, una biomasa lignocelulósica natural o de origen natural puede describirse de la siguiente manera.

Aparte del almidón, los tres constituyentes principales en biomasa vegetal son celulosa, hemicelulosa y lignina, que se denominan normalmente por el término genérico lignocelulosa. Las biomásas que contienen polisacárido, como término genérico, incluyen tanto almidón como biomásas lignocelulósicas. Por lo tanto, algunos tipos de materias primas pueden ser biomasa vegetal, biomasa que contiene polisacárido y biomasa lignocelulósica.

Las biomásas que contienen polisacárido incluyen cualquier material que contenga glúcidos poliméricos, por ejemplo, en forma de almidón, así como almidón refinado, celulosa y hemicelulosa.

Los tipos relevantes de biomásas de origen natural para obtener la invención reivindicada pueden incluir biomásas derivadas de cultivos agrícolas seleccionados del grupo que consiste en cereales que contienen almidón, almidón refinado; rastrojos de maíz, bagazo, paja, por ejemplo, de arroz, trigo, centeno, avena, cebada, colza, sorgo; coníferas, por ejemplo, *Pinus sylvestris*, *Pinus radiata*; latifolios, por ejemplo, *Salix* spp. *Eucalyptus* spp.; tubérculos, por ejemplo, remolacha, patata; cereales de, por ejemplo, arroz, trigo, centeno, avena, cebada, colza, sorgo y maíz; papel residual, fracciones de fibra de procesamiento de biogás, estiércol, residuos del procesamiento de aceite de palma, residuos sólidos municipales o similares. Aunque los experimentos se limitan a unos pocos ejemplos de la lista enumerada anterior, se cree que la invención es aplicable a todos, porque la caracterización es principalmente para las características únicas de la lignina y área superficial.

La materia prima de biomasa lignocelulósica usada para obtener la composición es preferiblemente de la familia habitualmente denominada gramíneas. El nombre apropiado es la familia conocida como *Poaceae* o *Gramineae* en la clase *Liliopsida* (las monocotiledóneas) de las plantas con flor. Las plantas de esta familia se denominan habitualmente gramíneas o, para distinguirlas de otras graminoideas, gramíneas verdaderas. También se incluye el bambú. Hay aproximadamente 600 géneros y unas 9000-10 000 o más especies de gramíneas (Índice de Kew de especies de gramíneas en todo el mundo).

Poaceae incluye los cereales de alimento básico y los cultivos de cereal que crecen en todo el mundo, pasto y gramíneas forrajeras, y bambú. *Poaceae* en general tiene tallos huecos llamados cañas, que se taponan (son sólidos) a intervalos llamados nudos, los puntos a lo largo de la caña en que surgen hojas. Las hojas de las gramíneas habitualmente son alternas, dísticas (en un plano) o infrecuentemente espirales, y con nervado paralelo. Cada hoja se diferencia en una vaina inferior que abraza el tallo durante una distancia y una lámina con márgenes habitualmente completos. Las láminas de la hoja de muchas gramíneas se endurecen con fitolitos de sílice, lo que ayuda a disuadir a los animales que pastan. En algunas gramíneas (tales como espadaña) esto hace que los bordes de las láminas de la gramínea sean suficientemente afilados para cortar la piel humana. Un apéndice membranoso o franja de vellos, llamada lígula, descansa en la unión entre la vaina y la lámina, evitan que el agua o los insectos penetren en la vaina.

Las láminas de gramínea crecen en la base de la lámina y no desde las puntas de los tallos. Este punto de crecimiento bajo evolucionó en respuesta a los animales que pastan y permite que las gramíneas sean pastadas o segadas regularmente sin daños graves a la planta.

Las flores de *Poaceae* se disponen característicamente en espiguillas, teniendo cada espiguilla uno o más ramilletes (las espiguillas se agrupan además en panículos o espigas). Una espiguilla consiste en dos (o a veces menos) brácteas en la base, llamadas glumas, seguidas de dos o más ramilletes. Un ramillete consiste en la flor rodeada de dos brácteas llamadas la lema (la externa) y la palea (la interna). Las flores son habitualmente hermafroditas (maíz, monoica, es una excepción) y la polinización casi siempre es anemófila. El perianto se reduce a dos escamas, llamadas lodículos, que se expanden y se contraen para propaga la lema y la palea; estas en general se interpretan como sépalos modificados.

El fruto de *Poaceae* es una cariópside en que la envuelta de la semilla se fusiona con la pared del fruto y, por tanto, no es separable del mismo (como en un grano de maíz).

- 5 Hay tres clasificaciones generales de hábito de crecimiento presentes en las gramíneas; de tipo racimo (también llamado cespitoso), estolonado y rizomatoso.

10 El éxito de las gramíneas recae, en parte, en su morfología y procesos de crecimiento y, en parte, en su diversidad fisiológica. La mayoría de las gramíneas se dividen en dos grupos fisiológicos, que usan las rutas fotosintéticas C3 y C4 para la fijación del carbono. Las gramíneas C4 tienen una ruta fotosintética ligada a una anatomía de hoja de Kranz especializada que las adapta particularmente a climas calientes y una atmósfera baja en dióxido de carbono.

15 Las gramíneas C3 se denominan "gramíneas de estación fría", mientras que las plantas C4 se consideran "gramíneas de estación cálida". Las gramíneas pueden ser anuales o perennes. Ejemplos de anuales de estación fría son trigo, centeno, pastito de invierno (poa anual, *Poa annua* y avena). Ejemplos de perennes de estación fría son dátilo aglomerado (dátilo, *Dactylis glomerata*), festuca (*Festuca* spp.), pasto azul de Kentucky y ballico perenne (*Lolium perenne*). Ejemplos de anuales de estación cálida son maíz, hierba del Sudán y mijo perlado. Ejemplos de perennes de estación cálida son hierba de tallo azul, hierba de don Carlos, gramilla colorada y pasto varilla.

20 Una clasificación de la familia de las gramíneas reconoce doce subfamilias: Estas son 1) *Anomochloideae*, un pequeño linaje de gramíneas de hoja ancha que incluye dos géneros (*Anomochloa*, *Streptochaeta*); 2) *Pharoideae*, un pequeño linaje de gramíneas que incluye tres géneros, incluyendo *Pharus* y *Leptaspis*; 3) *Puelioideae*, un pequeño linaje que incluye el género africano *Puelia*; 4) *Pooideae* que incluye trigo, cebada, avena, bromo (*Bromus*) y cañavera (*Calamagrostis*); 5) *Bambusoideae* que incluye bambú; 6) *Ehrhartoideae*, que incluye arroz y arroz silvestre; 7) *Arundinoideae*, que incluye el junco gigante y el junco común; 8) *Centothecoideae*, una pequeña subfamilia de 11 géneros que a vez se incluye en *Panicoideae*; 9) *Chloridoideae* que incluye los pastos llorones (*Eragrostis*, aprox. 350 especies, incluyendo tef), semillas de pradera (*Sporobolus*, unas 160 especies), mijo de dedo (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) y los pastos de Muhly (*Muhlenbergia*, aprox. 175 especies); 10) *Panicoideae* que incluye mijo común, maíz, sorgo, caña de azúcar, la mayoría de mijos, fonio y pastos de tallo azul; 11) *Micrairoideae* y 12) *Danthonioidae* que incluye cortadera argentina; siendo *Poa* un género de aproximadamente 500 especies de gramíneas, nativas de las regiones templadas de ambos hemisferios.

35 Las gramíneas agrícolas que se hacen crecer por sus semillas comestibles se denominan cereales. Tres cereales comunes son arroz, trigo y maíz. De todos los cultivos, un 70 % son gramíneas.

40 La caña de azúcar es la fuente principal de producción de azúcar. Las gramíneas se usan para construcción. Los andamiajes hechos de bambú pueden resistir vientos de la fuerza de un tifón que romperían andamiajes de acero. Los bambús más grandes y *Arundo donax* tienen cañas robustas que pueden usarse de una manera similar a la madera de construcción, y las raíces de las gramíneas estabilizan el suelo de los ranchos. *Arundo* se usa para hacer lengüetas para instrumentos de viento de madera, y el bambú se usa para innumerables herramientas.

45 Otra materia prima de biomasa lignocelulósica de origen natural puede ser plantas leñosas o árboles. Una planta leñosa es una planta que usa madera como tejido estructural. Estas típicamente son plantas perennes cuyos tallos y raíces más grandes se refuerzan con madera producida adyacente a los tejidos vasculares. El tallo principal, las ramas más grandes y las raíces de estas plantas habitualmente se cubren por una capa de corteza engrosada. Las plantas leñosas habitualmente son árboles, arbustos o lianas. La madera es una adaptación celular estructural que permite que las plantas leñosas crezcan desde los tallos de superficie año tras año, haciendo, por tanto, que algunas plantas leñosas sean las plantas más grandes y más altas.

50 Estas plantas necesitan un sistema vascular para mover agua y nutrientes desde las raíces hasta las hojas (xilema) y para mover glúcidos desde las hojas hasta el resto de la planta (floema). Hay dos tipos de xilema: primario, que se forma durante el crecimiento primario desde el procámbium y xilema secundario, que se forma durante el crecimiento secundario desde el cámbium vascular.

55 Lo que habitualmente se llama "madera" es el xilema secundario de dichas plantas.

Los dos grupos principales en que puede encontrarse el xilema secundario son:

- 60 1) coníferas (*Coniferae*): que son unas seiscientas especies de coníferas. Todas las especies tienen xilema secundario, que es de estructura relativamente uniforme en todo este grupo. Muchas coníferas llegan a ser árboles altos: el xilema secundario de dichos árboles se comercializa como madera blanda.
- 65 2) angiospermas (*Angiospermae*): hay como un cuarto de millón a cuatrocientas mil especies de angiospermas. Dentro de este grupo, no se ha encontrado xilema secundario en monocotiledóneas (por ejemplo, *Poaceae*). Muchas angiospermas no monocotiledóneas llegan a ser árboles, y el xilema secundario de estos se comercializa como madera dura.

La expresión madera blanda se usa para describir la madera de árboles que pertenecen a gimnospermas. Las gimnospermas son plantas con semillas desnudas no encerradas en un ovario. Estos "frutos" de semillas se consideran más primitivos que los de latifolios. Las coníferas son habitualmente perennes, albergan conos y tienen agujas o escamas como hojas. Incluyen especies de coníferas, por ejemplo, pino, piceas, abetos y cedros. La dureza de la madera varía entre las especies de coníferas.

La expresión madera dura se usa para describir la madera de árboles que pertenecen a la familia de angiospermas. Las angiospermas son plantas con óvulos encerrados para su protección en un ovario. Cuando se fertilizan, estos óvulos se desarrollan en semillas. Los latifolios son habitualmente de hoja ancha; en latitudes templadas y boreales son principalmente caducos, pero en los trópicos y los subtropicos principalmente perennes. Estas hojas pueden ser simples (láminas individuales) o pueden estar compuestas de laminillas adheridas a un tallo foliar. Aunque son de forma variable, las hojas de los latifolios tienen una red bien definida de venas finas. Los latifolios incluyen, por ejemplo, álamo, abedul, cerezo, arce, roble y teca.

Por lo tanto, puede seleccionarse una biomasa lignocelulósica de origen natural preferida del grupo que consiste en las gramíneas y los árboles. Otra biomasa lignocelulósica de origen natural preferida puede seleccionarse del grupo que consiste en las plantas que pertenecen a las coníferas, angiospermas, *Poaceae* y familias. Otra biomasa lignocelulósica de origen natural preferida puede ser esa biomasa que tiene al menos un 10 % en peso de su materia seca como celulosa, o más preferiblemente al menos un 5 % en peso de su materia seca como celulosa.

Pretratamiento

De acuerdo con la invención la biomasa lignocelulósica se pretrata. El término "pretratada" puede remplazarse con el término "tratada". Sin embargo, técnicas preferidas contempladas son las bien conocidas para "pretratamiento" de biomasa lignocelulósica como se describirá adicionalmente a continuación.

Como se menciona anteriormente, el tratamiento o pretratamiento puede realizarse usando métodos convencionales conocidos en la técnica, que promueven la separación y/o liberación de celulosa y una accesibilidad aumentada de la celulosa a partir de biomasa lignocelulósica. Las técnicas de pretratamiento son bien conocidas en la técnica e incluyen pretratamiento físico, químico y biológico, o cualquier combinación de los mismos. En realizaciones preferidas, el pretratamiento de biomasa lignocelulósica se realiza como un proceso discontinuo o continuo.

Las técnicas de pretratamiento físico incluyen diversos tipos de molienda/trituración (reducción del tamaño de partículas), irradiación, cocción al vapor/explosión de vapor e hidrotermólisis, en la realización preferida, remojo, retirada de los sólidos del líquido, explosión de vapor en los sólidos para crear la biomasa lignocelulósica pretratada.

La trituración incluye molienda en seco, en húmedo y con bolas vibradoras. Preferiblemente, el pretratamiento físico implica el uso de alta presión y/o alta temperatura (explosión de vapor). En el contexto de la invención, alta presión incluye presión en el intervalo de 3 a 6 MPa, preferiblemente 3.1 MPa. En el contexto de la invención, alta temperatura incluye temperaturas en el intervalo de aproximadamente 100 a 300 °C, preferiblemente de aproximadamente 160 a 235 °C. En una realización específica, la impregnación se realiza a una presión de aproximadamente 3,1 MPa y a una temperatura de aproximadamente 235 °C. En una realización preferida, el pretratamiento físico se hace de acuerdo con el proceso descrito en el documento WO 2010/113129.

Aunque no sea necesario o preferido, las técnicas de pretratamiento químico incluyen ácido, ácido diluido, base, disolvente orgánico, cal, amoníaco, dióxido de azufre, dióxido de carbono, hidrotermólisis de pH controlado, oxidación en húmedo y tratamiento con disolvente.

Si el proceso de tratamiento químico es un proceso de tratamiento ácido, es más preferiblemente, un tratamiento continuo con ácido diluido o suave, tal como tratamiento con ácido sulfúrico, u otro ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico o cualquier mezcla de los mismos. También pueden usarse otros ácidos. El tratamiento con ácido suave significa, al menos en el contexto de la invención, que el pH de tratamiento están en el intervalo de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 3.

En una realización específica, la concentración de ácido está en el intervalo de un 0,1 a un 2,0 % en peso de ácido, preferiblemente ácido sulfúrico. El ácido se mezcla o se pone en contacto con la biomasa lignocelulósica y la mezcla se mantiene a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 160-220 °C durante un periodo que varía de minutos a segundos. Específicamente, las condiciones de pretratamiento pueden ser las siguientes: 165-183 °C, 3-12 minutos, un 0,5-1,4 % (p/p) de concentración de ácido, un 15-25, preferiblemente aproximadamente un 20 % (p/p) de concentración de sólidos totales. Se describen otros métodos contemplados en las patentes de Estados Unidos n.º 4880473, 5366558, 5188673, 5705369 y 6228177.

Las técnicas de oxidación en húmedo implican el uso de agentes oxidantes, tales como agentes oxidantes basados en sulfito y similares. Ejemplos de tratamientos con disolvente incluyen tratamiento con DMSO (dimetilsulfóxido) y similares. Los procesos de tratamiento químico en general se realizan durante aproximadamente 5 a

aproximadamente 10 minutos, pero pueden realizarse durante periodos de tiempo más cortos o más largos.

Las técnicas de pretratamiento biológico incluyen aplicar microorganismos solubilizantes de lignina (véase, por ejemplo, Hsu, T.-A., 1996, Pre-treatment of biomass, en Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, D.C., 179-212; Ghosh, P., y Singh, A., 1993, Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of ligno-cellulosic biomass, Adv. Appl. Microbiol. 39: 295-333; McMillan, J. D., 1994, Pretreating ligno-cellulosic biomass: a review, en Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, Himmel, M. E., Baker, J. O., y Overend, R. P., eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, D.C., capítulo 15; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., y Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, en Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania, 65: 207-241; Olsson, L., y Hahn-Hagerdal, B., 1996, Fermentation of ligno-cellulosic hydrolysates for ethanol production, Enz. Microb. Tech. 18: 312-331; y Vallander, L., y Eriksson, K.-E. L., 1990, Production of ethanol from ligno-cellulosic materials: State of the art, Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 42: 63-95).

En una realización, se realiza pretratamiento tanto químico como físico incluyendo, por ejemplo, tanto tratamiento con ácido suave como tratamiento de alta temperatura y presión. El tratamiento químico y físico puede realizarse secuencial o simultáneamente.

En una realización preferida, el pretratamiento se realiza como una etapa de remojo con agua a más de 1 °C, retirando la biomasa lignocelulósica del agua, seguida de una etapa de explosión de vapor.

En una realización preferida, la biomasa lignocelulósica pretratada está compuesta de glúcidos complejos, también conocidos como glucanos y xilanos (celulosa y hemicelulosa) y lignina.

Enzima o mezcla de enzimas

Una enzima o mezcla de enzimas significa una enzima celulolítica o mezcla de enzimas que pueden degradar biomasa lignocelulósica. Una enzima o mezcla de enzimas producida de acuerdo con el proceso descrito puede ser de cualquier origen, incluyendo de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen variantes modificadas químicamente o modificadas por ingeniería de proteínas. La enzima o mezcla de enzimas adecuada incluye enzimas o mezclas de enzimas de, en general, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Penicillium*, *Thermobifida* y *Trichoderma*, por ejemplo, enzimas o mezclas de enzimas fúngicas producidas por *Humicola insolens*, *Thermobifida fusca*, *Cellulomonas fimi*, *Myceliophthora thermophila*, *Thielavia terrestris*, *Fusarium oxysporum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Penicillium decumbens* y *Trichoderma reesei*.

En una realización, la enzima o mezcla de enzimas producida es una enzima o mezcla de enzimas homóloga compleja para la célula hospedadora. En una realización, la enzima o mezcla de enzimas producida es una enzima o mezcla de enzimas homóloga compleja para una célula hospedadora del género *Penicillium*, preferiblemente una cepa de *Penicillium decumbens*.

Debe entenderse que la enzima o mezcla de enzimas producida también puede ser una enzima monocomponente o mezcla de enzimas, por ejemplo, comprende una endoglucanasa, exocelobiohidrolasa, glucosidasa o beta-glucosidasa producida de forma recombinante en una célula hospedadora adecuada. La enzima o mezcla de enzimas también puede incluir otras enzimas o clases de enzimas producidas en células recombinantes que explotan al menos una parte de la región codificante de las enzimas previamente enumeradas, incluyendo las regiones reguladoras y/o promotoras como se conoce en la técnica. A continuación se describen en más detalle células hospedadoras adecuadas.

La enzima o mezcla de enzimas producida también puede ser una preparación de enzima o mezcla de enzimas donde se elimina o inactiva uno o más componentes de la enzima o mezcla de enzimas homóloga de la célula hospedadora que produce de forma natural la enzima o mezcla de enzimas.

Célula hospedadora que puede producir una enzima o mezcla de enzimas

La célula hospedadora puede ser de cualquier origen. Como se menciona anteriormente, la enzima o mezcla de enzimas puede ser homóloga o heteróloga para la célula hospedadora que puede producir la enzima o mezcla de enzimas.

La expresión "célula hospedadora recombinante", como se usa en el presente documento, significa una célula hospedadora que alberga uno o más genes que codifican la enzima o mezcla de enzimas y puede expresar dicho gen o genes para producir la enzima o mezcla de enzimas, en la que el uno o más genes que codifican la enzima o mezcla de enzimas se han transformado, transfectado, transducido o similares, en la célula hospedadora. La transformación, transfección, transducción o técnica similar usada puede ser bien conocida en la técnica. En una realización preferida, el gen se integra en el genoma de la célula hospedadora recombinante en una o más copias.

Cuando la enzima o mezcla de enzimas es heteróloga, la célula hospedadora recombinante que puede producir la enzima o mezcla de enzimas es preferiblemente de origen fúngico o bacteriano. La elección de célula hospedadora recombinante dependerá en gran medida del gen o genes que codifican la enzima o mezcla de enzimas y del origen de la enzima o mezcla de enzimas.

La expresión "célula hospedadora de tipo silvestre", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula hospedadora que alberga de forma natural uno o más genes que codifican la enzima o mezcla de enzimas y que puede expresar dicho gen o genes. Cuando la enzima o mezcla de enzimas es una preparación homóloga o enzima o mezcla de enzimas compleja, la célula hospedadora de tipo silvestre o mutante de la misma que puede producir la enzima o mezcla de enzimas es preferiblemente de origen fúngico o bacteriano.

Un "mutante de la misma" puede ser una célula hospedadora de tipo silvestre en que uno o más genes se han eliminado o inactivado, por ejemplo, para enriquecer la preparación de enzima o mezcla de enzimas en un determinado componente. Una célula hospedadora mutante también puede ser una célula hospedadora de tipo silvestre transformada con uno o más genes adicionales que codifican enzimas o proteínas adicionales para introducir una o más actividades enzimáticas adicionales u otras actividades en la enzima o mezcla de enzimas compleja o preparación producida de forma natural por la célula hospedadora de tipo silvestre. La una o más enzimas adicionales pueden tener la misma actividad (por ejemplo, actividad de la enzima o mezcla de enzimas) o simplemente pueden ser otra molécula enzimática, por ejemplo, con propiedades diferentes. La célula transformada de tipo silvestre mutante también puede tener genes codificantes de enzima homólogos adicionales transformados, transfectados, transducidos o similares, preferiblemente integrados en el genoma. Para aumentar la expresión de ese gen para producir más enzima.

En una realización preferida, la célula hospedadora recombinante o de tipo silvestre es de origen de hongo filamentoso. Ejemplos de células hospedadoras incluyen las seleccionadas del grupo que comprende *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes* o célula de *Trichoderma*.

En una realización más preferida, la célula hospedadora de hongo filamentoso se selecciona del grupo que comprende una cepa de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En una realización aún más preferida, la cepa es *Penicillium decumbens*.

En otra realización preferida, la célula hospedadora de hongo filamentoso es una cepa de *Fusarium bacridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* o célula de *Fusarium venenatum*. En otra realización preferida, la célula hospedadora de hongo filamentoso se selecciona del grupo que comprende una cepa de *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis lannocincta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa* o *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium lucknowense*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium decumbens*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

En otra realización preferida, la célula hospedadora recombinante o de tipo silvestre es de origen bacteriano. Ejemplos de células hospedadoras incluyen las seleccionadas del grupo que comprende bacterias grampositivas tales como una cepa de *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus thuringiensis*; o una cepa de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; o de una bacteria gramnegativa, por ejemplo, *E. coli* o *Pseudomonas* sp.

Hidrólisis

La biomasa contendrá algunos compuestos que son hidrolizables en una especie soluble en agua que se puede obtener de la hidrólisis de la biomasa. En el caso de especies hidrolizadas solubles en agua de celulosa, la celulosa puede hidrolizarse en glucosa, celobiosa y polímero de glucosa superiores e incluye dímeros y oligómeros. Por tanto, algunas de las especies hidrolizadas solubles en agua de celulosa son glucosa, celobiosa y polímeros de glucosa superiores e incluyen sus dímeros y oligómeros respectivos. La celulosa se hidroliza en glucosa por las celulasas carbohidrolíticas. Por tanto, las celulasas carbohidrolíticas son ejemplos de catalizadores para la hidrólisis de celulosa.

La compresión predominante del sistema celulolítico divide las celulasas en tres clases; exo-1,4-[beta]-D-glucanasas o celobiohidrolasas (CBH) (EC 3.2.1.91), que escinden unidades de celobiosa de los extremos de cadenas de celulosa; endo-1,4-[beta]-D-glucanasas (EG) (EC 3.2.1.4), que hidrolizan enlaces [beta]-1,4-glucosídicos internos aleatoriamente en la cadena de celulosa; 1,4-[beta]-D-glucosidasa (EC 3.2.1.21), que hidroliza la celobiosa en glucosa y también escinde unidades de glucosa de los celooligosacáridos. Por lo tanto, si la biomasa contiene celulosa, entonces la glucosa es una especie hidrolizada soluble en agua obtenible de la hidrólisis de la biomasa y las celulasas mencionadas anteriormente son ejemplos específicos, así como los mencionados en la sección experimental, de catalizadores para la hidrólisis de celulosa.

Mediante análisis similar, los productos de hidrólisis de hemicelulosa son especies solubles en agua obtenibles de la hidrólisis de la biomasa, suponiendo, por supuesto, que la biomasa contiene hemicelulosa. La hemicelulosa incluye xilano, glucuronoxilano, arabinoxilano, glucomanano y xiloglucano. Los diferentes glúcidos en la hemicelulosa se liberan por las hemicelulasas. El sistema hemicelulolítico es más complejo que el sistema celulolítico debido a la naturaleza heteróloga de la hemicelulosa. Los sistemas pueden implicar, entre otras, endo-1,4-[beta]-D-xilanasas (EC 3.2.1.8), que hidrolizan enlaces internos en la cadena de xilano; 1,4-[beta]-D-xilosidasas (EC 3.2.1.37), que atacan los xilooligosacáridos del extremo no reductor y liberan xilosa; endo-1,4-[beta]-D-mananasas (EC 3.2.1.78), que escinden enlaces internos; 1,4-[beta]-D-manosidasas (EC 3.2.1.25), que escinden manooligosacáridos en manosa. Los grupos laterales se retiran por varias enzimas; tales como [alfa]-D-galactosidasas (EC 3.2.1.22), [alfa]-L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), [alfa]-D-glucuronidasas (EC 3.2.1.139), cinamoil estererasas (EC 3.1.1.-), acetil xilano estererasas (EC 3.1.1.6) y feruloil estererasas (EC 3.1.1.73). Por lo tanto, si la biomasa contiene hemicelulosa, entonces la xilosa y la manosa son ejemplos de una especie hidrolizada soluble en agua obtenible de la hidrólisis de la biomasa que contiene hemicelulosa y las hemicelulasas mencionadas anteriormente son ejemplos específicos, así como los mencionados en la sección experimental, de catalizadores para la hidrólisis de hemicelulosa.

Se incluye en el proceso un catalizador de hidrólisis. La composición de catalizador de hidrólisis consiste en el catalizador, el vehículo y otros aditivos/ingredientes usados para introducir el catalizador en el proceso. Como se analiza anteriormente, el catalizador puede comprender al menos una enzima o microorganismo que convierta al menos uno de los compuestos en la biomasa en un compuesto o compuestos de menor peso molecular, hasta, e incluyendo, el glúcido o carbohidrato básico usado para generar el compuesto en la biomasa. Las enzimas que pueden hacer esto para los diversos polisacáridos tales como celulosa, hemicelulosa y almidón son bien conocidas en la técnica e incluirían las no inventadas aún.

La composición de catalizador de hidrólisis también puede comprender un ácido inorgánico preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico y similares, o mezclas de los mismos. Se cree que el ácido inorgánico es útil para procesamiento a temperaturas mayores de 100 °C. El proceso también puede realizarse específicamente sin la adición de un ácido inorgánico.

Es típico añadir el catalizador de hidrólisis al proceso con un vehículo, tal como agua o una biomasa de base orgánica. Con fines de equilibrar la masa, la expresión composición de catalizador, por lo tanto, incluye el o los catalizadores más el vehículo o vehículos para añadir al catalizador o catalizadores al proceso. Si se añade un tampón de pH con el catalizador, entonces es parte de la composición de catalizador también. A menudo, la biomasa lignocelulósica contendrá almidón. Las enzimas más importantes para su uso en la hidrólisis de almidón son alfa-amilasas (1,4-(alfa)-D-glucano glucanohidrolasas, (EC 3.2.1.1)). Estas son hidrolasas de acción endo que escinden enlaces 1,4-[alfa]-D-glucosídicos y puede evitar, pero no pueden hidrolizar, los puntos de ramificación 1,6-[alfa]-D-glucosídicos. Sin embargo, también las glucoamilasas de acción exo, tales como beta-amilasa (EC 3.2.1.2) y pululanasa (EC 3.2.1.41) pueden usarse para hidrólisis de almidón. El resultado de hidrólisis de almidón es principalmente glucosa, maltosa, maltotriosa, [alfa]-dextrina y cantidades variables de oligosacáridos. Cuando se usa hidrolizado a base de almidón para la fermentación, puede ser ventajoso añadir enzimas proteolíticas. Dichas enzimas pueden evitar la floculación del microorganismo y pueden generar aminoácidos disponibles para el microorganismo. Por lo tanto, si la biomasa contiene almidón, entonces la glucosa, maltosa, maltotriosa, [alfa]-dextrina y oligosacáridos son ejemplos de una especie hidrolizada soluble en agua obtenible de la hidrólisis de la biomasa que contiene almidón y las alfa-amilasas mencionadas anteriormente son ejemplos específicos, así como los mencionados en la sección experimental, de catalizadores para la hidrólisis de almidón.

Uso

El proceso también puede tener etapas adicionales, en las que las enzimas recogidas del proceso se usan además para hidrolizar una primera biomasa lignocelulósica. Preferiblemente, la primera biomasa lignocelulósica y la segunda biomasa lignocelulósica deben derivar del mismo género de gramínea y más preferiblemente deben derivar de la misma especie de gramínea. También es preferible que la primera biomasa lignocelulósica sobre la que tiene que realizarse la hidrólisis enzimática se pretrate antes de la hidrólisis enzimática.

Procedimiento experimental

Preparación de composiciones sólidas

Se prepararon diferentes composiciones sólidas a partir de *Arundo donax* y paja de trigo. Las biomásas se sometieron a pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación y filtración en prensa para preparar diferentes composiciones sólidas usadas en experimentos de cultivo.

Pretratamiento

Se introdujo biomasa lignocelulósica en un reactor continuo y se sometió a tratamiento de remojo. La mezcla remojada se separó en un líquido remojado y una fracción que contenía la materia prima remojada sólida mediante una prensa. La fracción que contenía la materia prima remojada sólida se sometió a explosión de vapor. Los parámetros de pretratamiento para las dos biomásas se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Parámetros del proceso usados en el pretratamiento

	Remojo		Explosión de vapor	
	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
<i>Arundo donax</i>	155	155	195	4
Paja de trigo	155	65	190	4

Los productos sometidos a explosión de vapor se separaron en un líquido de explosión de vapor y un sólido de explosión de vapor.

El sólido de explosión de vapor es la biomasa pretratada de *Arundo donax* (AR) y la biomasa pretratada de paja de trigo (WS) usada en los experimentos de cultivo.

Hidrólisis enzimática

La biomasa pretratada se mezcló con agua para obtener una mezcla que tenía un 7,5 % de contenido de materia seca y la mezcla se insertó en un reactor enzimático. Se añadió un cóctel de enzimas, correspondiente a la concentración especificada de proteína por gramo de glucanos contenida en la biomasa pretratada. La hidrólisis enzimática se realizó durante 72 horas en agitación.

Se prepararon dos hidrolizados diferentes partiendo de biomasa pretratada de paja de trigo; cada hidrolizado se separó por centrifugación (20 minutos, 8000 rpm, 4 °C) en una fracción líquida, que contenía los glúcidos solubles en agua, y la composición sólida. Las composiciones sólidas, indicadas como HW1 y HW2, se usaron en los experimentos de cultivo. Los parámetros de hidrólisis usados en la preparación de HW1 y HW2 se presentan en la tabla 2 y se eligieron para obtener dos niveles diferentes de reducción de glúcidos complejos; en particular se preparó HW2 con una concentración mayor de enzima, correspondiendo de ese modo a una composición más reducida.

Tabla 2. Parámetros usados en hidrólisis enzimática para producir composiciones sólidas HW1 y HW2

	Enzima	Concentración (mg de proteína/g de glucano)	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (horas)
HW1	Solución de enzima de <i>T. reesei</i>	15	60	5	72
HW2	Solución de enzima de <i>T. reesei</i>	75	50	5	72

Fermentación y filtración en prensa

El hidrolizado de paja de trigo, preparado de acuerdo con las condiciones de la composición HW2, se insertó en un biorreactor con 3 g/l de urea y 0,5 g/l de una levadura fermentadora. El pH se estableció a 5 y la temperatura a 30 °C y se realizó la fermentación durante 48 horas. El cóctel enzimático no se retiró del hidrolizado, de tal manera que la hidrólisis enzimática continuara durante la fermentación. El caldo de fermentación, que comprendía sólidos, etanol u otras fracciones líquidas, se prensó mediante una filtración en prensa a una temperatura de 80 °C a 15 bar, para separar el etanol y los componentes líquidos de la fracción rica en sólidos. La fracción rica en sólidos que comprendía lignina extraída de la prensa, indicada como HFW, se usó en los experimentos de cultivo.

Se preparó hidrolizado de *Arundo donax* de acuerdo con los parámetros correspondientes a HW2 y se fermentó de acuerdo con el procedimiento usado para paja de trigo. La fracción rica en sólidos extraída de la prensa, indicada como HFA, se usó en los experimentos de cultivo.

Composición

La composición de biomasa pretratada y composiciones sólidas, en términos de glúcidos solubles en agua, glúcidos

complejos, lignina y otros compuestos, se determinó de acuerdo con métodos analíticos convencionales enumerados al final de la sección experimental.

5 La tabla 3 presenta la composición de biomasa pretratada AR y WS, composiciones sólidas derivadas de los hidrolizados WS HW1 y HW2 y composiciones sólidas derivadas de la fermentación de hidrolizados AR y WS (HFW y HFA). La tabla contiene también las composiciones de LS1 y LS2, que se usaron en los siguientes experimentos y se describen en una siguiente sección experimental.

10 Las composiciones se expresan en términos de glúcidos C6 complejos, glúcidos C5 complejos, glúcidos solubles en agua totales (C5 y C6) y otros componentes (que comprenden lignina y agua). Los glúcidos C6 complejos se basan en glucosa, los glúcidos C5 complejos se basan principalmente en xilosa.

Tabla 3. Composiciones usadas en los experimentos presentados

	WS	AR	HW1	HW2	HFW	HFA	LS1	LS2
Glúcidos solubles en agua	1,6 %	2,4 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Glúcidos C6 complejos	17,4 %	18,3 %	10,7 %	9,6 %	8,05 %	14,0 %	0,51 %	0,23 %
Glúcidos C5 complejos	3,4 %	2,4 %	1,6 %	1,4 %	1,3 %	2,0 %	0,04 %	0,02 %
Otros*	77,6 %	76,9 %	87,7 %	89,0 %	90,6 %	84,0 %	99,4 %	99,8 %
Relación de glúcido complejo/lignina incluyendo lignina y agua	1,831	1,815	1,574	0,886	0,723	0,786	0,19	0,18

15 Para el alcance de la presente divulgación, las composiciones se caracterizan convenientemente por la relación de glúcidos complejos a lignina. Los glúcidos complejos corresponden a la suma de glúcidos C6 complejos y glúcidos C5 complejos. Considerando las composiciones obtenidas de WS, que es HW1, HW2 y HFW, se advierte que:

- 20 - la relación de glúcidos complejos a lignina en HW1 y HW2 es menor que la relación de glúcidos complejos a lignina en WS, lo que refleja que se producía reducción de glúcidos complejos en la hidrólisis;
- la relación de glúcidos complejos a lignina en HW2 es menor que la relación de glúcidos complejos a lignina en HW1, lo que refleja la hidrólisis más eficaz en HW2 realizada a mayor concentración de enzima;
- 25 - la relación de glúcidos complejos a lignina en HFW es menor que la relación de glúcidos complejos a lignina en HW2, debido al hecho de que las enzimas no se desactivaban y se retiraban y la hidrólisis continuaba durante la fermentación

Experimentos de cultivo

30 El cultivo de la célula hospedadora para la producción de enzimas prosiguió como en los siguientes ejemplos. Cada cultivo de células hospedadoras, que en los ejemplos presentados usó *Trichoderma reesei* y *Penicillium decumbens* como célula hospedadora, empezó a partir de una solución de esporas recuperada de una placa de PDA sembrada con esporas recientes siete días antes de la recuperación.

35 Los experimentos se dividen en dos etapas:

- 1) precultivo, que no es parte del proceso de cultivo reivindicado y
- 2) cultivo de células hospedadoras, en el que la célula hospedadora se hace crecer y se produce la una o más enzimas.

40 Precultivo:

Siembra en placa de PDA:

- 45 1. Se distribuyeron 500 µl de una solución de esporas recogida previamente en una placa de PDA (3,9 % de medio de agar con dextrosa de patata) preparado como se conoce en la técnica.
2. Se distribuyeron 500 µl de solución de NaCl al 0,9 % estéril para *P. decumbens* o solución de Triton X-100 al 1 % para *T. reesei* sobre las esporas y el matraz se rotó suavemente hasta que la superficie estuvo toda cubierta por el líquido.
- 50 3. El matraz se cerró con un tapón de algodón cubierto con una lámina de aluminio y se incubó a 30 °C para *P. decumbens* o 28 °C para *T. reesei* durante 7 días.

Recuperación de solución de esporas:

- 55 4. Después de 7 días, se distribuyeron 10 ml de la solución estéril apropiada para *P. decumbens* y *T. reesei* (NaCl al 0,9 % y Triton X-100 al 1 % respectivamente) en el matraz.
5. El matraz se rotó suavemente hasta que el líquido quedó turbio.

6. El mayor volumen posible de la solución distribuida se extrajo de nuevo retirando la suspensión de esporas en un tubo estéril.
7. La solución de esporas se almacenó a 4 °C.

5 Etapa de ajuste de precultivo

Antes de iniciar el cultivo de células hospedadoras, fue necesario ajustar el precultivo.

- 10 Se preparó medio de precultivo como se presenta en la tabla 4, eligiendo el volumen apropiado con respecto al de la fase de cultivo de células hospedadoras (una décima parte y una vigésima parte para *P. decumbens* y *T. reesei* respectivamente)

Tabla 4: Composición de medio de precultivo

<i>P. decumbens</i>				<i>T. reesei</i>			
Composición de medio de precultivo	% en p/v	g	G	Composición de medio de precultivo	% en p/v	g	G
Peptona	1,00 %	1,00	10,00	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,14 %	0,14	1,4
AR	2,00 %	2,00	20,00	KH ₂ PO ₄	0,21 %	0,21	2,1
KH ₂ PO ₄	0,30 %	0,30	3,00	CaCl ₂ 2H ₂ O	0,04 %	0,04	0,4
MgSO ₄	0,05 %	0,05	0,50	MgSO ₄ 7H ₂ O	0,04 %	0,04	0,4
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,20 %	0,20	2,00	Metales	0,02 %	0,02	0,2
CaCO ₃	0,50 %	0,50	5,00	Urea	0,10 %	0,1	1
Glucosa	1,00 %	1,00	10,00	Glucosa	1,00 %	1	10
Volumen final		100	1000	Volumen final		100	1000

- 15 1. La glucosa y la solución de esporas se añadieron después de esterilización. El volumen de la solución de esporas se eligió para obtener una concentración final de 5000 UFC/ml para *P. decumbens* y 50000 UFC/ml para *T. reesei*.

- 20 2. El precultivo de *P. decumbens* se incubó a 30 °C, 170 rpm durante 30 h mientras que el precultivo de *T. reesei* se incubó a 28 °C, 170 rpm durante 64 h.

Cultivo de células hospedadoras y producción de enzimas

El entorno de cultivo de células hospedadoras se prepara como se presenta en la tabla 5.

25

Tabla 5: Composición de medio de cultivo

<i>P. decumbens</i>		<i>T. reesei</i>	
Composición de medio de cultivo	% en p/v	Composición de medio de cultivo	% en p/v
Biomasa [en una base seca]	4,50 %	Biomasa [en una base seca]	4,0 %
Urea	0,50 %	Urea	0,18 %
Tween	0,10 %	CaCl ₂	0,26 %
Volumen de medio de precultivo de la etapa previa	10,0 %	KH ₂ PO ₄	0,28 %
		MgSO ₄	0,16 %
		(NH ₄) ₂ SO ₄	0,38 %
		Volumen de medio de precultivo de la etapa previa	5,0 %

La biomasa se selecciona del grupo de composiciones preparadas para demostrar la invención (indicadas como WS, AR, HW1, HW2, HFW, HFA).

30

1. Después de la esterilización, el pH se corrigió hasta 5,3 para *P. decumbens* y 6,0 para *T. reesei* y se añadieron los volúmenes de precultivo. El pH se controla en matraces usando diferente tipo de soluciones de tampón (por ejemplo, tampón fosfato 0,1 M).

35

2. El cultivo de células hospedadoras y la producción de enzimas se realizaron a la temperatura y agitación apropiadas para cada microorganismo (30 °C, 170 rpm para *P. decumbens* y 28 °C, 170 rpm para *T. reesei*).

Experimento 1

Tabla 6: Actividad enzimática de *T. reesei* en presencia de diferentes medios de cultivo.

	Composición usada	Concentración en entorno de cultivo ((p/v, %)		Celulásica total, FPU	β -Glucosidasa	Xilanasas
		Lignina	Glúcido complejo			
Contenido de actividad después de 169 horas, U/ml						
CE1	WS	1,65	3,02	0,96	0,30	231
WE1	HW1	1,67	2,63	1,92	0,45	113
WE2	HW2	1,72	1,52	1,74	0,46	138
WE3	HFW	1,89	1,35	2,01	0,91	360
Rendimiento relativo para CE1, %						
CE1	WS	--	--	--	--	--
WE1	HW1	101 %	87 %	199 %	149 %	49 %
WE2	HW2	104 %	50 %	181 %	155 %	60 %
WE3	HFW	114 %	45 %	216 %	305 %	156 %

La tabla 6 compara la actividad sobre diferentes biomasa lignocelulósicas usadas para alimentar la célula hospedadora, *Trichoderma reesei*. En la tabla, "composición usada" indica la biomasa usada en el medio de cultivo como fuente de átomos de carbono. El contenido de medio se calculó para proporcionar aproximadamente la misma cantidad de lignina en cada entorno de cultivo. Como cada biomasa usada se caracteriza disminuyendo la relación de glúcidos complejos a lignina, la cantidad de glúcidos complejos usada en cada medio de cultivo disminuye de CE1 a WE3. Esto establece el método para diversos tipos de células hospedadoras. Las actividades de CE1 se eligieron como referencia para expresar resultados experimentales en una escala relativa en la segunda sección de la tabla. Los experimentos WE1, WE2 y WE3 usaron un medio de cultivo donde la única fuente de carbono era la composición obtenida de biomasa pretratada hidrolizada (HW1 y HW2) y fermentada (HFW). El tiempo de cultivo fue el mismo en todos los experimentos (169 horas).

Los resultados experimentales muestran claramente que la biomasa lignocelulósica pretratada podía sustituirse con una composición sólida obtenida de biomasa lignocelulósica pretratada retirando una fracción de glúcidos complejos. Además, el rendimiento de conversión, definido como la relación de actividad total producida a glúcido complejo, obtenido de biomasa lignocelulósica reducida en glúcidos se sorprendentemente mayor que el obtenido de biomasa lignocelulósica pretratada con un aumento en el rendimiento de conversión, como se demuestra por los resultados presentados en la tabla 7.

Tabla 7. Actividad total obtenida de diferente medio preparado usando diferente composición con contenido decreciente de glúcidos complejos.

	Contenido de glúcidos complejos en el medio de cultivo con respecto a CE1	Rendimiento de conversión (actividad tot./glúcido complejo)		
		Celulásica total, FPU	β -Glucosidasa	Xilanasas
CE1	--	32	10	7649
WE1	87 %	73	17	4313
WE2	50 %	114	30	9059
WE3	45 %	149	67	26667

Experimento 2

En un experimento adicional, se usaron diferentes composiciones que tenían contenido de glúcidos complejos nulo o muy bajo en el medio de cultivo como fuentes de carbono.

CE2 y CE3 se produjeron usando dos muestras diferentes de lignina comercial. CE2 contenía un 8 % de sulfonato de lignina con bajo álcali (Sigma, código 471003) y CE3 contenía un 8 % de lignina con álcali (Sigma, código 370959). La lignina comercial usada tiene un contenido de glúcidos complejos inferior a un 5 %.

Después del proceso de producción de enzimas, los residuos de los medios de cultivo usados en dos experimentos WE3 diferentes se centrifugaron durante 20 minutos a 8000 rpm y 4 °C y dos fracciones ricas en sólidos, indicadas respectivamente como LSI y LS2, se recogieron. CE1 del experimento 1 se presenta como experimento de control.

Las composiciones de LSI y LS2 están contenidas en la tabla 3. Los medios de cultivo WE4 y WE5 contenían 5 veces más material que CE1 con respecto al contenido de lignina y 2,5 - 2,8 veces más material que LS1 y LS2, respectivamente. Como se evidencia en la tabla 3, el contenido de glúcidos complejos es LS1 y LS2 es menor de un

8 % y la cantidad correspondiente de glúcido complejo añadida al medio se presenta en la tabla.

El tiempo de cultivo fue 169 horas.

5 Tabla 8. Actividad enzimática de *T. reesei* para los experimentos CE1, CE2, CE3, WE4 y WE5.

	Fuente de carbono	Concentración en entorno de cultivo (% base seca)		Celulásica total, FPU	β-Glucosidasa	Xilanasa
		Lignina	Glúcido complejo			
Contenido de actividad después de 169 horas, U/ml						
CE1	WS	1,65	3,02	2,57	1,20	329,96
CE2	Lignina pura	7,92	0	0,13	0,09	13,04
CE3	Lignina pura	7,92	0	0,07	0,11	13,01
WE4	LS1	3,04	0,59	0,02	0,00	10,94
WE5	LS2	2,79	0,50	0,19	0,00	26,01
Rendimiento relativo para CE1, %						
CE1	WS	--	--	--	--	--
CE2	Lignina pura	480 %	0 %	5 %	8 %	4 %
CE3	Lignina pura	480 %	0 %	3 %	9 %	4 %
WE4	LS1	184 %	20 %	1 %	0 %	3 %
WE5	LS2	169 %	17 %	7 %	0 %	8 %

Según parece claro de los datos presentados, en el caso de WE4 y WE5, la cantidad de glúcidos complejos, correspondiente a un 20 % de los glúcidos complejos en el caso de CE1, no es suficientes para promover la producción de enzimas, mientras que se informó de que la presencia de un 45 % de los glúcidos complejos usados en CE1 aumentaba la producción de enzimas (experimento WE3).

10 Experimento 3

Se realizaron experimentos adicionales para producir enzimas usando *Penicillium decumbens* como célula hospedadora. El ejemplo comparativo (CE4) se realizó usando biomasa pretratada AR como fuente de carbono, mientras que WE6 se realizó añadiendo una cantidad suficiente de composición HFA para proporcionar aproximadamente la misma cantidad de lignina usada en CE4. El tiempo de cultivo fue el mismo para todos los experimentos (138 horas).

20 La tabla 9 presenta las actividades obtenidas después de 138 h de producción de enzimas. Los experimentos muestran que podría producirse al menos la misma cantidad de enzimas totales cuando se cultiva *Penicillium decumbens* en presencia de biomasa lignocelulósica pretratada o reducida en glúcidos.

Tabla 9: Actividad enzimática producida usando *Penicillium decumbens* como célula hospedadora

	Fuente de carbono	Concentración en entorno de cultivo (% base seca)		Celulásica total, FPU	β-Glucosidasa	Xilanasa
		Lignina	Glúcidos complejos			
Contenido de actividad después de 138 horas, U/ml						
CE4	AR	4,90	2,43	0,54	2,38	16,69
WE6	HFA	4,98	1,69	0,68	2,20	13,40
Rendimiento relativo para CE4, %						
CE4	AR	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
WE6	HFA	102 %	70 %	126 %	92 %	80 %

25 Es evidente a partir de la tabla 9, que las enzimas derivadas de la célula hospedadora alimentada con la composición sólida reducida en glúcidos obtenida de la hidrólisis y fermentación de biomasa lignocelulósicas son muy parecidas a las derivadas del ejemplo comparativo obtenido usando material pretratado.

30 Experimento 4

Las enzimas producidas en WE3 sobre composición sólida de paja de trigo HFW se usaron adicionalmente para hidrolizar biomasa pretratada de paja de trigo WS.

5 La biomasa pretratada se mezcló con agua para obtener una mezcla que tenía un 7,5 % de contenido de materia seca y la mezcla se insertó en un matraz de 100 ml. Se cargaron mezclas de enzimas que crecieron en WE3 a 60 y 90 mg de proteína/g de glucanos de la biomasa pretratada en los experimentos WE7 y WE8 respectivamente, y se realizó hidrólisis a pH 5,0 y 50 °C durante 72 h. El experimento CE5 se realizó usando una solución de enzimas comercial siguiendo las especificaciones del productor.

10 Se midieron las concentraciones de glucosa y xilosa a las 6, 24, 48 y 72 horas y se presentan en la tabla 10. La glucosa y xilosa liberadas se presentaron respecto a la cantidad inicial de glucanos y xilanos en la biomasa pretratada WS para cuantificar el rendimiento de hidrólisis de glucanos y el rendimiento de hidrólisis de xilanos. La figura 1 presenta los gráficos de rendimiento de hidrólisis de glucanos (figura 1a) y el rendimiento de hidrólisis de xilanos (figura 1b). Este experimento resalta que las enzimas producidas de acuerdo con la presente divulgación pueden usarse para hidrolizar de forma eficaz biomasa lignocelulósicas pretratadas.

Tabla 10. Resultados de hidrólisis de los experimentos CE5, WE7 y WE8.

Tiempo, h	Rendimiento de hidrólisis de glucanos				Rendimiento de hidrólisis de xilanos			
	6	24	48	72	6	24	48	72
	Concentración de glucosa, g/dm ³				Concentración de xilosa, g/dm ³			
CE5	7,0	18,6	22,0	23,2	7,9	9,6	10,4	10,6
WE7	8,5	18,0	20,2	23,5	3,8	7,2	8,0	9,07
WE8	10,7	20,6	23,3	24,5	4,7	8,2	9,2	9,6
	Rendimiento de hidrólisis de glucanos, %				Rendimiento de hidrólisis de xilanos, %			
CE5	24 %	64 %	75 %	80 %	75 %	91 %	98 %	100 %
WE7	29 %	62 %	69 %	81 %	36 %	68 %	76 %	86 %
WE8	37 %	71 %	80 %	84 %	45 %	77 %	86 %	90 %

Métodos analíticos

20 Determinación de la actividad

La FPU (actividad en papel de filtro), la actividad de beta-glucosidasa y xilanasa se determinaron usando métodos conocidos en industria de determinación de la actividad enzimática. Siendo la diferencia que el papel de filtro era el sustrato para FPU y se usaron salicina y la mezcla de xilanos descrita a continuación como ensayos de actividad de beta-glucosidasa y xilanasa.

Sustrato	Tipo de actividad	Preparación
Salicina	Glucosidasa	0,1 g en 10 ml de solución de tampón 50 mM
Xilano	Xilanasa	2 g de xilano de madera de haya 70 ml de agua ultrapura Calentar hasta ebullición con agitación. Enfriar hasta temperatura ambiente y añadir 5 ml de solución madre de tampón 1 N

Determinación de la composición

30 Las composiciones se realizaron de acuerdo con las siguientes normas NREL

Método analítico NREL

35 Determinación de carbohidratos estructurales y lignina en biomasa

Laboratory Analytical Procedure (LAP) fecha de publicación: 25/04/2008
Technical Report NREL/TP-510-42618 revisado en abril de 2008

40 Determinación de contenido a extraerse en biomasa

Laboratory Analytical Procedure (LAP) fecha de publicación: 17/07/2005
Technical Report NREL/TP-510-42619 enero de 2008

Preparación de muestras para análisis de composición

Laboratory Analytical Procedure (LAP) fecha de publicación: 28/09/2005
Technical Report NREL/TP-510-42620 enero de 2008

5

Determinación de sólidos totales en biomasa y sólidos disueltos totales en muestras del proceso líquidas

Laboratory Analytical Procedure (LAP) fecha de publicación: 31/03/2008
Technical Report NREL/TP-510-42621 revisado en marzo de 2008

10

Determinación de cenizas en biomasa

Laboratory Analytical Procedure (LAP) fecha de publicación: 17/07/2005
Technical Report NREL/TP-510-42622 enero de 2008

15

Determinación de glúcidos, subproductos y productos de degradación en muestras del proceso de fracción líquida

Laboratory Analytical Procedure (LAP) fecha de publicación: 08/12/2006
Technical Report NREL/TP-510-42623 enero de 2008

20

Determinación de sólidos insolubles en material de biomasa pretratada

Laboratory Analytical Procedure (LAP) fecha de publicación: 21/03/2008
NREL/TP-510-42627 marzo de 2008

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir al menos una primera enzima que puede hidrolizar una primera biomasa lignocelulósica pretratada, que comprende la etapa de cultivar la célula hospedadora en un entorno de cultivo reducido en glúcidos que comprende la célula hospedadora, agua y una composición sólida, obtenida de una segunda biomasa lignocelulósica pretratada que comprende un glúcido complejo seleccionado del grupo de glucanos y xilanos insolubles en agua poliméricos, y una lignina; en el que la relación de la cantidad total de los glúcidos complejos a la cantidad total de la lignina en la composición sólida es menor que la relación de la cantidad total de los glúcidos complejos a la cantidad total de la lignina en la segunda biomasa lignocelulósica pretratada; y en el que dicha composición sólida se obtiene retirando una fracción de, pero no todos, los glúcidos complejos contenidos en la segunda biomasa lignocelulósica pretratada.
2. El proceso de la reivindicación 1, en el que el cultivo se hace en condiciones de reducción de glúcidos simples, de tener una cantidad de glúcido simple o glúcidos simples añadidos en el intervalo de un 0 a un 10 % en peso del entorno de cultivo reducido en glúcidos en una base seca, durante una parte del tiempo de cultivo que es al menos un 50 % del tiempo de cultivo; en el que dichos glúcidos simples se seleccionan de glúcidos monoméricos.
3. El proceso de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la composición sólida se obtiene de la segunda biomasa lignocelulósica pretratada mediante un proceso que comprende las etapas de:
- a) hidrolizar al menos una parte de la segunda biomasa lignocelulósica pretratada en presencia de un catalizador de hidrólisis, para producir una composición hidrolizada que comprende una composición sólida y una solución de agua y glúcidos solubles y;
 - b) retirar al menos un 50 % de la solución de agua y glúcidos solubles de la composición hidrolizada.
4. El proceso de la reivindicación 3, en el que la retirada de la solución de agua y glúcidos solubles se hace mediante al menos un método seleccionado del grupo que consiste en decantación, sedimentación, centrifugación, filtración, filtración en prensa y lavado.
5. El proceso de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la composición sólida se obtiene de la segunda biomasa lignocelulósica pretratada mediante un proceso que comprende las etapas de:
- a) hidrolizar al menos una parte de la segunda biomasa lignocelulósica pretratada en presencia de un catalizador de hidrólisis, para producir una composición hidrolizada que comprende dichos glúcidos complejos y lignina y la solución de agua y glúcidos solubles;
 - b) convertir al menos una fracción de los glúcidos solubles en la composición hidrolizada para producir una composición convertida que comprende al menos un producto derivado de glúcido, y la composición sólida;
 - c) retirar una fracción del al menos un producto derivado de glúcido.
6. El proceso de la reivindicación 5, en el que la retirada de la fracción del al menos un producto derivado de glúcido se hace mediante al menos un método seleccionado del grupo que consiste en decantación, sedimentación, centrifugación, filtración, filtración en prensa, lavado, evaporación y destilación.
7. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que el catalizador de hidrólisis comprende una segunda enzima o mezcla de enzimas.
8. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que el catalizador de hidrólisis se selecciona del grupo que consiste en iones de hidrógeno, ácidos orgánicos y ácidos inorgánicos.
9. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que la conversión de la composición hidrolizada comprende una fermentación.
10. El proceso de la reivindicación 9, en el que el al menos un producto derivado de glúcido comprende etanol.
11. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que la parte del tiempo de cultivo en condiciones de reducción de glúcidos simples es al menos un 75 % del tiempo de cultivo.
12. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que la parte del tiempo de cultivo en condiciones de reducción de glúcidos es igual que el tiempo de cultivo.
13. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en el que la cantidad de glúcido o glúcido o glúcidos simples añadidos está en el intervalo de un 0 a un 5 % en peso del entorno de cultivo reducido en glúcidos en una base seca.
14. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en el que no hay glúcidos simples añadidos en el entorno de cultivo reducido en glúcidos.

- 5 15. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que al menos la primera enzima se recoge separando el entorno de cultivo reducido en glúcidos en al menos una composición recogida, que comprende al menos una fracción de la cantidad de la primera enzima, y una composición agotada, que comprende al menos una fracción de la cantidad del residuo sólido de la composición sólida.
16. El proceso de la reivindicación 15, en el que la cantidad total de dichos glúcidos complejos en la composición agotada está presente en un intervalo de un 0 a un 30 % en peso en una base seca.
- 10 17. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que la primera enzima se usa además para hidrolizar la primera biomasa lignocelulósica y la primera biomasa lignocelulósica y la segunda biomasa lignocelulósica pretratada comprenden, ambas, biomasa lignocelulósica derivada del grupo que consiste en el mismo género de gramínea o la misma especie de gramínea.

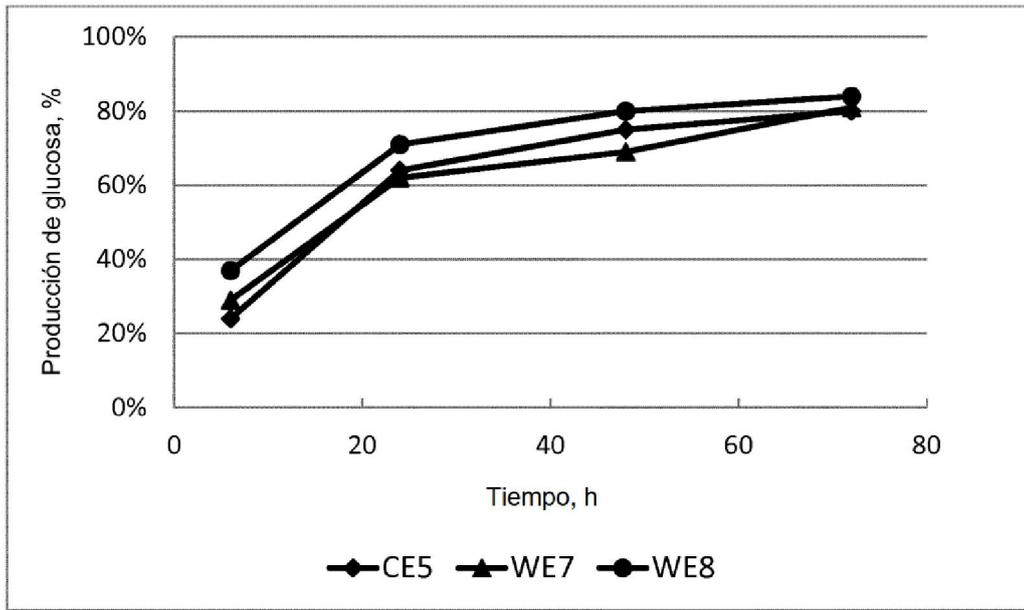


FIG. 1a

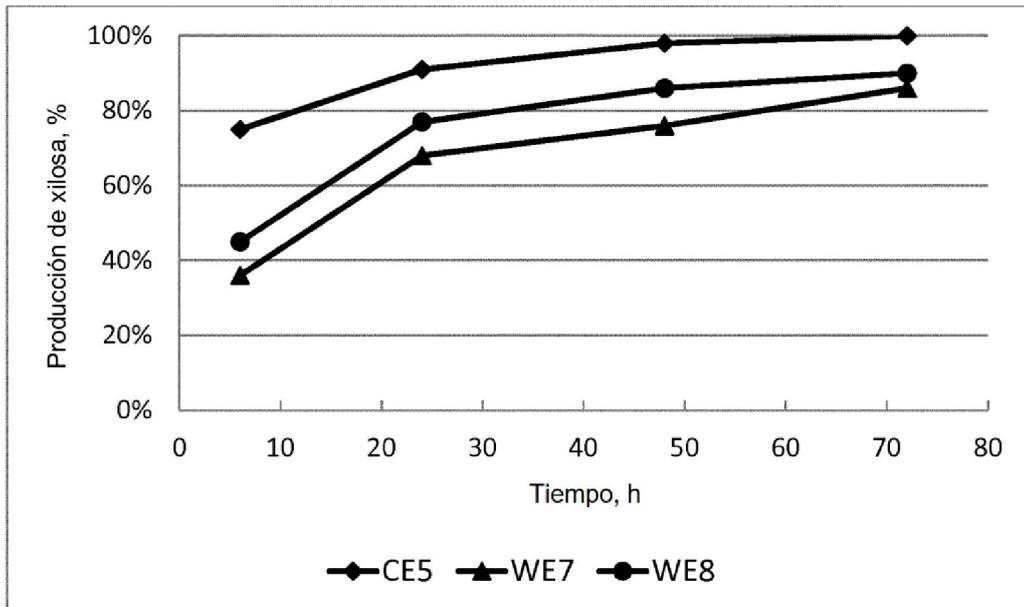


FIG. 1b