

PROCESO PARA HIDRÓLISIS AUTOSUFICIENTE DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

La presente invención se refiere a un procedimiento para hidrólisis autosuficiente de material lignocelulósico. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un producto orgánico y el producto orgánico se produce según este procedimiento.

Debido a los limitados recursos de aceite mineral y a las demandas para reducir las emisiones de CO₂, la industria química busca rutas de producción más sostenibles para la fabricación de productos químicos básicos como combustibles líquidos y productos químicos básicos. Parte de esa estrategia se centra en la conversión de la biomasa lignocelulósica en productos químicos versátiles o combustibles como el etanol. La biomasa lignocelulósica contiene celulosa (~25-40% p/p b.s.), hemicelulosa (~15-25% p/p b.s.) y lignina (~15-30% p/p b.s.) como componentes principales y cantidades menores de otros carbohidratos, ceras, proteínas y compuestos inorgánicos. Entre las formas de biomasa vegetal, la biomasa lignocelulósica derivada de cualquier flujo de residuos forestales y agrícolas, tales como residuos de madera y paja de cereales, son particularmente adecuados para la conversión a productos químicos y combustibles básicos debido a su disponibilidad, bajo costo y producción ambientalmente racional. Además, el análisis del ciclo de vida de los procesos de producción que utilizan materias primas lignocelulósicas indica una reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero en comparación con los procesos a base de otras materias primas.

Se han explicado varias opciones de proceso que describen la conversión de biomasa lignocelulósica en etanol y otros productos químicos de base (Pejo et al.,

2008). Para realizar estos procesos a escala industrial es particularmente deseable transferir a los productos finales la cantidad máxima de contenido de energía, carbono y masa contenida en la materia prima renovable. En la actualidad ninguno de los procesos de conversión descritos ha logrado esto en toda su extensión.

Ejemplos de operaciones unitarias para la conversión biotecnológica de material lignocelulósico (e.g., paja) a productos de valor añadido (e.g., etanol) son: disminución mecánica de tamaño y/o pretratamiento fisicoquímico, hidrólisis enzimática, fermentación y recuperación del producto. Para determinar la máxima eficiencia del proceso es obligatorio convertir una cantidad máxima de polisacáridos en azúcares solubles durante la unidad de hidrólisis enzimática.

En cuanto a la producción de etanol celulósico a escala industrial, la barrera clave sigue siendo el gasto por costo para la hidrólisis enzimática eficiente de la lignocelulosa pretratada a altas concentraciones de sólidos.

Así, la hidrólisis de la fracción de celulosa ha sido identificada como uno de los principales obstáculos en la conversión de lignocelulosa en etanol. En la actualidad, el costo de la enzima y el rendimiento requerido una hidrólisis eficiente de la biomasa son los principales cuellos de botella.

La descomposición de la suspensión de biomasa pretratada en azúcares monoméricos fermentables puede llevarse a cabo mediante hidrólisis catalizada por un ácido o una enzima. La hidrólisis enzimática es más selectiva y menos energéticamente intensa que las metodologías químicas comparables (como las basadas en ácidos), proporcionando por lo tanto una economía de proceso más

favorable y potencialmente un mayor rendimiento de etanol durante la fermentación.

Los sistemas enzimáticos adecuados que convierten azúcares poliméricos tales como celulosa y hemicelulosa en monómeros de hexosa (i.e., glucosa) y pentosa (i.e., xilosa) contienen típicamente actividades de celulasa, hemicelulasa y beta-glucosidasa. Los sistemas enzimáticos que contienen actividades de celulasa y beta-glucosidasa se producen a menudo en cultivos líquidos sumergidos de hongos, e.g., *Trichoderma* sp., y/o *Aspergillus* sp. El residuo de la biomasa fúngica generalmente se separa del caldo de fermentación y se desecha. Luego se concentra el caldo de fermentación, se estabiliza y se formula para que el producto enzimático resultante sea enviado.

Según Kristensen et al. (2009) la hidrólisis enzimática de la biomasa se realiza a menudo con un contenido de sólidos inferior de 10-20% p/p. Un contenido de sólidos por encima del 15% p/p conduce a menudo a pérdidas significativas en los rendimientos monoméricos de azúcar. Este efecto se debe a problemas asociados con la mezcla homogénea de suspensión de alto contenido en sólidos que conduce a una distribución desigual de la enzima. Además, la acumulación de productos finales como la celobiosa y la glucosa liberada durante la hidrólisis enzimática puede conducir a la inhibición inherente de las actividades de celulasa y beta-glucosidasa (Xiao et al., 2004a).

Rao et al. (1985) indican el uso de la suspensión total de fermentación fúngica para hidrólisis eficiente de sustratos de celulosa. Sin embargo, se usaron medios artificiales para la producción de enzimas, que no permiten adaptar la producción de la enzima de hidrólisis a una materia prima específica y/u opción de pretratamiento y por lo tanto la eficiencia de la producción de la enzima es

bastante baja. Tolan (Clean Techn Environ Policy 3 (2002) 339-345) describe en el "proceso de logen para producir etanol a partir de biomasa celulósica" el uso de caldo bruto de la hidrólisis como medio para la producción de enzimas para ahorrar costos de proceso. Otro inconveniente de los métodos descritos por Rao et al., y Tolan es la limitación para las actividades enzimáticas secretadas, porque no se emprende nada para facilitar la liberación de enzimas no secretoras o ligadas a la superficie celular.

Las técnicas convencionales antes mencionadas para la degradación de la biomasa son ineficientes o dependen de la adición de tiempo y del costo del consumo de las enzimas producidas por separado comercialmente o las mezclas de enzimas que sean apropiadas para la degradación de la biomasa específica. Además, también el uso de suspensión en bruto o caldo no supera estos inconvenientes, ya que conduce no sólo a la provisión deseada de los azúcares necesarios para la fermentación por hongos, sino que inevitablemente también aporta una variedad de sustancias no deseadas inhibidoras y/o tóxicas al proceso de fermentación. De este modo, la ventaja de usar un medio de fermentación barato será compensada por un severo inconveniente en la eficiencia con respecto a la producción de enzimas.

En el documento EP 2 471 940 se describe un proceso eficiente de hidrólisis de lignocelulosa con producción enzimática integrada. En este proceso, los medios para la fermentación enzimática consisten en altas cantidades de sólidos suspendidos. Para mejorar aún más la economía, el objetivo de la invención es desarrollar una hidrólisis de lignocelulosa y un proceso de fermentación enzimática con una cantidad minimizada de sólidos suspendidos e inhibidores, mientras que la cantidad de carbohidratos solubles se incrementa adicionalmente.

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

Los inventores de la presente invención han encontrado ahora sorprendentemente que este objeto de la presente invención puede conseguirse mediante un

Proceso para la hidrólisis enzimática autosuficiente de material que contiene lignocelulosa, que comprende las etapas

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

y

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

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

El procedimiento para la hidrólisis enzimática del material que contiene lignocelulosa de la presente invención es particularmente ventajoso porque es autosuficiente y también altamente eficiente como hidrolizado integrante del proceso total en la etapa (d) de producción de la enzima permitiendo una producción económica y la integración directa en el sitio de una cantidad máxima de enzimas hidrolíticas adecuadas que conduce a una cantidad máxima de carbohidratos solubles. Además, la eliminación de sustancias inhibidoras durante al menos una etapa del proceso permitirá un proceso que no sólo se puede ejecutar de forma autosuficiente sino también continuamente con alta eficiencia, ya que la producción de enzimas hidrolíticas no se ralentizará o inhibirá por sustancias no deseadas que conduce a ventajas económicas adicionales.

En la presente invención, el término "material que contiene lignocelulosa" debe entenderse que comprende todo tipo de material conocido por el versado en el arte que comprende lignocelulosa. Los términos "material que contiene lignocelulosa", "biomasa que contiene lignocelulosa", "material lignocelulósico" y "biomasa lignocelulósica" deben entenderse como sinónimos En la presente invención. El material que contiene lignocelulosa particularmente preferido de acuerdo con la presente invención incluye madera, paja y/o cáscaras de cereal, bagazo, cascaras de avena, hierba de cambio, celulosa, pasta de papel cruda (obtenida a partir de pasta y papel) y mezclas de los mismos. Fuentes alternativas o componentes adicionales pueden comprender uno o más de los siguientes componentes: celulosa purificada, pulpa, suero lácteo, melazas o azúcares tales como glucosa y lactosa. En una implementación preferida, el material que contiene lignocelulosa contiene al menos 25% en peso, preferiblemente al menos 40% en peso, más preferiblemente al menos 70% en peso, incluso más preferiblemente al menos 80% en peso y lo más preferido al menos 90% en peso de lignocelulosa. Debe entenderse que el material que contiene lignocelulosa también puede

comprender otros compuestos tales como material proteínico, almidón, azúcares, tales como azúcares fermentables y/o azúcares no fermentables.

En la presente invención, el término "hidrólisis enzimática" debe entenderse como un proceso en el que las enzimas adecuadas convierten azúcares poliméricos tales como celulosa y hemicelulosa en monómeros de hexosa (i.e., glucosa) y/o pentosa (i.e., xilosa).

En la presente invención, el término "pretratamiento" debe entenderse como un proceso que conduce a la eliminación al menos parcial y la separación de la hemicelulosa de la celulosa y la interrupción y eliminación de la vaina de lignina, con el fin de disminuir la cristalinidad de la celulosa y, por lo tanto aumentar el área superficial accesible de celulosa y/o para aumentar el tamaño de poro de la celulosa. El pretratamiento moviliza preferentemente la fracción de pentosa del material que contiene lignocelulosa, al mismo tiempo que mejora la digestibilidad de la fracción que contiene celulosa sólida.

Los métodos adecuados para el pretratamiento del material que contiene lignocelulosa de acuerdo con la etapa (a) de la presente invención incluyen cualquier tipo de métodos de pretratamiento mecánicos, biológicos, químicos y/o físicos conocidos por un versado en el arte. Dentro de una implementación preferida, el método de pretratamiento se selecciona de los métodos de trituración mecánica, tratamiento con ácidos y/o álcalis, oxidación en húmedo, hidrotermolisis controlada por pH y/o explosión de vapor.

La "explosión de vapor" de acuerdo con la presente invención comprende preferiblemente un tratamiento hidrotérmico a presión a una temperatura de 60 a 350°C, preferiblemente de 80 a 300°C, particularmente preferida de 100 a 250°C y

más preferiblemente de 110 a 220°C del material que contiene lignocelulosa en ausencia o en presencia de catalizadores ácidos (tales como H_2SO_4 , HCl , H_3PO_4) o básicos/alcalinos (i.e., NH_4OH , NaOH , KOH , cal), que se añaden a concentraciones de 0,01 a 15% (p/p), preferiblemente de 0,05 a 12,5% (p/p), más preferiblemente de 0,1 a 10% (p/p) y más preferiblemente de 0,25 a 7,5%. En una implementación preferida de la presente invención, la presión se selecciona preferiblemente de 1 a 100 bar, preferiblemente de 2 a 50 bar, también se prefiere de 3 a 25 bar y muy preferiblemente de 5 a 15 bar. Los tiempos de reacción durante la explosión de vapor han de seleccionarse de 10s a 2h, preferiblemente de 1 minuto a 1,5 horas, y muy preferiblemente de 5 minutos a 1 hora para proporcionar una transformación eficiente de los componentes de biomasa en preparación para la hidrólisis enzimática. Dentro de una implementación particularmente preferida, se lleva a cabo un pretratamiento "de trituración mecánica" del material que contiene lignocelulosa antes o durante el pretratamiento con explosión de vapor, en el que la trituración mecánica se selecciona del grupo que consiste de un procesamiento mecánico, de molienda, de picado, de trituración, de corte, de irradiación, de fresado y combinaciones de los mismos.

El "pretratamiento ácido" de acuerdo con la presente invención constituye preferentemente un tratamiento continuo con ácido diluido y/o suave, tal como tratamiento con ácido sulfúrico, u otros ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, cloruro de hidrógeno o mezclas de los mismos. También se pueden utilizar otros ácidos. Un "tratamiento de ácido suave" de acuerdo con la presente invención debe entenderse que se lleva a cabo a un pH de 1 a 5, preferiblemente un pH de 2 a 3 (respecto al material que contiene lignocelulosa). En una implementación preferida, el ácido se añade en concentraciones de 0,01 a 15% (p/p), preferiblemente de 0,05 a 12,5% (p/p), más

preferiblemente de 0,1 a 10% (p/p) y lo más preferido de 0,25 a 7,5% en peso. El ácido es preferiblemente ácido sulfúrico. El ácido puede ponerse en contacto con el material que contiene lignocelulosa a una temperatura en el intervalo de 120 a 280°C, preferiblemente de 135 a 225°C y lo más preferido de 150 a 200°C durante un período de 1 a 60 minutos, preferiblemente de 2 a 30 minutos y lo más preferido de 5 a 15 minutos. La adición de ácidos fuertes, tales como ácido sulfúrico, se puede aplicar en implementaciones particularmente preferidas para eliminar la hemicelulosa.

El "pretratamiento químico" de acuerdo con la presente invención también se refiere al tratamiento del material que contiene lignocelulosa con H_2O_2 , ozono, ácidos de Lewis, $FeCl_3$, $(Al)_2SO_4$ en alcoholes acuosos, glicerol, dioxano, fenol, etilenglicol, NaOH, Na_2CO_3 y/o amoníaco. Las concentraciones, la temperatura y la duración preferidas se eligen análogamente a las condiciones mencionadas anteriormente con respecto al pretratamiento ácido.

El "pretratamiento por oxidación en húmedo" de acuerdo con la presente invención implica el uso de agentes oxidantes, tales como agentes oxidantes a base de sulfito.

El término "tritución mecánica" se refiere a cualquier tratamiento mecánico que promueva la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina a partir de material que contiene lignocelulosa. La tritución mecánica se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en procesamiento mecánico, molienda, picado, tritución, corte, irradiación, fresado, molienda tal como molienda en seco, molienda en húmedo y molienda por bolas vibratorias, y combinaciones de los mismos.

El "pretratamiento biológico" de acuerdo con la presente invención se refiere a cualquier pretratamiento biológico que promueva la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina del material que contiene lignocelulosa. Las técnicas de pretratamiento biológico pueden implicar la aplicación de microorganismos solubilizantes de lignina tales como actinomicetos (e.g., cepas de *Streptomyces*), hongos de podredumbre blanca.

Los métodos de pretratamiento adecuados para el procedimiento de la presente invención se llevarán a cabo dentro de dispositivos adecuados conocidos por un versado en el arte. Un dispositivo adecuado para llevar a cabo el pretratamiento químico puede ser cualquier tipo de recipiente tal como un reactor discontinuo. Un dispositivo adecuado para llevar a cabo la explosión de vapor puede ser cualquier tipo de recipiente tal como un reactor discontinuo, pero también puede llevarse a cabo dentro de un reactor de tornillo, preferiblemente un reactor de tornillo continuo.

En una implementación preferida, el contenido en sólidos del material que contiene lignocelulosa pretratada es hasta 75% (p/p), preferiblemente 25 a 65% (p/p) y particularmente preferido desde 40 hasta 55% (p/p).

En el proceso de la presente invención, el material que contiene lignocelulosa pretratada se pone entonces en contacto con al menos una enzima que pertenece a la clase de hidrolasas para descomponer el material pretratado que contiene lignocelulosa en azúcares fermentables tales como hexosas monoméricas (i.e. glucosa) y pentosas (i.e., xilosa). El contacto se puede llevar a cabo por cualquier método conocido por el versado en el arte como adecuado para el propósito inventivo.

El hidrolizado formado por hidrólisis enzimática del material pretratado que contiene lignocelulosa es preferiblemente de alto contenido en azúcar fermentable, preferentemente en el orden de 5 a 20% (p/v). El contenido de azúcar en este contexto debe entenderse como el contenido de todas las pentosas y hexosas. En una implementación preferida de la invención, el hidrolizado tiene un contenido de azúcar de 8 a 12,5% (p/v). En una implementación más preferida de la invención, el hidrolizado también contiene nutrientes adicionales (i.e., proteínas, sales y azúcares superiores tales como oligosacáridos).

El contacto de acuerdo con la etapa (b) de la presente invención se lleva a cabo preferiblemente en condiciones en las que la dosificación total de enzimas comprende de 0,05 a 10% (p/p) de materia prima, preferiblemente de 0,1 a 5% (p/p), preferiblemente de 0,15 a 4% (p/p) de materia prima y particularmente preferida de 0,2 a 3,5% (p/p) de materia prima. Dependiendo del régimen de dosificación y de la composición de actividad específica del sistema enzimático aplicado, la biomasa se hidroliza entre 40 y 60°C durante 1 a 7 días, preferiblemente entre 45 y 55°C durante 18 a 96 horas. El contacto según la etapa (b) de la presente invención se lleva a cabo preferiblemente a un pH en el intervalo de 3 a 8, preferiblemente a un pH de 4 a 6, especialmente a un pH de 4,5 a 5,5. En una implementación particularmente preferida de esta invención, la hidrólisis discontinua o alimentada de la paja de cereal pretratada se lleva a cabo en dosificaciones enzimáticas de materia prima de 0,25 a 0,8% (p/p) con o sin suplementación adicional de beta-glucosidasa y a una temperatura de 47°C a 53°C en 72 horas. Sorprendentemente, incluso con bajos regímenes de dosificación enzimática, se pueden obtener rendimientos de hidrólisis por encima del 70% (p/p) con respecto a los azúcares totales contenidos en dicha materia prima.

El contacto según la etapa (b) de la presente invención se lleva a cabo dentro de un recipiente de hidrólisis. Los recipientes adecuados son conocidos por un versado en el arte y preferiblemente seleccionados de reactores discontinuos y alimentados por lotes.

En la presente invención, el término "enzimas que pertenecen a la clase de hidrolasas" debe entenderse que comprende cualquier enzima, capaz de la hidrólisis de un enlace químico. Las enzimas que pertenecen a la clase de las hidrolasas se clasifican como EC 3 en la clasificación de las enzimas por el número EC. En una implementación preferida, las actividades enzimáticas de la al menos una enzima que pertenece a la clase de hidrolasas de acuerdo con la presente invención comprenden una o más actividades seleccionadas de las actividades de exo y endocelulasas (i.e., Cellobiohidrolasa (CBH) I, II, endoglucanasa (EG) I-IV), beta-glucosidasa (BGL)), Exo y endohemicelulasas (i.e., xilanasas, xilosidasas, xilobiasas, arabinasas, arabinofucosidasas, mananasas, manosidasas, galactasas y galactosidasas). Dentro de una implementación preferida, al menos una enzima que pertenece a la clase de hidrolasas de acuerdo con la presente invención tiene una o más actividades seleccionadas del grupo que consiste en: Cellobiohidrolasa tipo I o tipo II (CBH I o CBH II), endoglucanasa tipo I, II, III o IV (EGI, EGII, EGIII, EGIV), beta-glucosidasa (BGL), esterasa, exo-hemicelulasa y endo-hemicelulasa. Incluso más preferido es que la exo-hemicelulasa y la endo-hemicelulasa se seleccionan preferentemente de xilanasas, xilosidasas, xilobiasas, arabinasas, arabinofucosidasas, mananasas, manosidasas, galactasas y galactosidasas.

De acuerdo con la etapa (c) del procedimiento de la presente invención, el hidrolizado se separa después del recipiente de hidrólisis y se divide a continuación en dos partes (i) y (ii). La separación se lleva a cabo preferiblemente

cuando al menos el 70% de los azúcares totales presentes en la materia prima original se liberan, se prefiere al menos 75% y lo más preferido al menos 80%. Dentro de una implementación preferida, la proporción de la parte (i) del hidrolizado a la parte (ii) se selecciona del intervalo de 0,01 a 1, preferiblemente de 0,02 a 0,5, también se prefiere de 0,04 a 0,25 y muy preferiblemente de 0,05 a 0,1.

La separación de acuerdo con la etapa (c) del procedimiento de la presente invención puede llevarse a cabo por cualquier método conocido por el versado en el arte como adecuado para el propósito inventivo. En una implementación preferida, la separación se lleva a cabo mediante separación sólido-líquido, tal como filtración, prensado, separación por membrana, flotación, precipitación, decantación y centrifugación o combinaciones de los mismos. Se prefieren las separaciones sólido-líquido basadas en filtros. Además, se prefiere particularmente utilizar un filtro prensa. Los residuos después de la filtración deben tener un contenido de sólidos mínimo de 20% (p/p), preferiblemente 30% (p/p), particularmente preferido 40% (p/p) y lo más preferido 50% (p/p). Otro método para la separación de acuerdo con la etapa (c) es la centrifugación, e.g., usando un decantador.

Según la etapa (c) del procedimiento de la presente invención, la parte (i) del hidrolizado se dirige entonces a un recipiente de cultivo. Los recipientes adecuados son conocidos por un versado en el arte y preferiblemente seleccionados de reactores discontinuos y alimentados por lotes. El recipiente de cultivo está equipado preferiblemente con un agitador y un dispositivo de aireación. Dentro de otra implementación preferida de la presente invención, una parte del material pretratado que contiene lignocelulosa puede añadirse directamente al recipiente de cultivo. Las cantidades preferidas de material con

contenido de lignocelulosa pretratado añadido son de 1 a 35% (p/p en relación con el peso total del material de cultivo), preferiblemente de 5 a 30% (p/p en relación con el peso total del material de cultivo) y lo más preferido de 10 a 20% (p/p en relación con el peso total del material de cultivo).

De acuerdo con la etapa (d) del procedimiento de la presente invención, la parte (i) del hidrolizado se fermenta a continuación con al menos un microorganismo capaz de producir al menos una enzima que pertenece a la clase de hidrolasas.

El "por lo menos un microorganismo capaz de producir al menos una enzima que pertenece a la clase de hidrolasas" se selecciona preferiblemente de las especies *Actinobacter sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Burkholdria sp.*, *Clostridia sp.*, *Caldicellulosiruptor Sp.*, *Cellvibrio sp.*, *Halobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Xanthomonas sp.* y *Thermobifida sp.*, *Pyrochoccus sp.*, *Sulphobolus sp.*, *Staphylothermus sp.*, y *Thermococcus sp.*

Preferiblemente, el "al menos un hongo capaz de producir al menos una enzima que pertenece a la clase de hidrolasas" se selecciona entre las especies *Trichoderma sp.*, *Hypocrea sp.*, *Aspergillus sp.*, *Chaetomium sp.*, *Chrysosporium sp.*, *Fusarium Sp.*, *Humicola sp.*, *Orpinomyces sp.*, *Pencillium sp.*, *Phanerochaete sp.*, *Piromyces sp.*, *Talaromyces sp.*, *Trametes sp.*, y *Trichoderma sp.*, o sus respectivos holomorfos. Se prefiere especialmente un hongo seleccionado de *Trichoderma sp.*, y *Talaromyces sp.*, Mientras que también son posibles combinaciones de uno o más hongos, pero también combinaciones de uno o más hongos y/o microorganismos.

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

La fermentación de acuerdo con la etapa (d) del procedimiento de la presente invención se lleva a cabo durante un periodo de tiempo de 1 hora a 14 días, preferiblemente de 10 horas a 7 días, más preferiblemente de 24 horas a 5 días, preferiblemente bajo mezcla constante con una entrada de potencia de 150 a 1900 W/m³ y más preferiblemente de 500 a 1500 W/m³ y preferiblemente a un pH de 2,5 a 8, preferiblemente de 3,0 a 7, particularmente preferida de 3,5 a 6,0 y preferiblemente a una temperatura de 15 a 70°C, preferiblemente de 20 a 55°C y particularmente preferido de 25 a 35°C, bajo condiciones controladas con oxígeno. El nivel promedio de oxígeno disuelto se selecciona preferiblemente de 0,01% a 80%, preferiblemente de 0,1% a 50%, particularmente preferido de 1% a 30% y lo más preferido de 3% a 15%. Dentro de una implementación particularmente preferida, el nivel de oxígeno disuelto se controla mediante un agitador o flujo de aire comprimido o presión interna del reactor o una combinación de dos o tres de estas medidas.

En una implementación preferida, la concentración de azúcares solubles durante la fermentación de acuerdo con la etapa (d) del procedimiento de la invención está por debajo del 10% (p/v), preferiblemente por debajo del 8% (p/v) y particularmente preferido por debajo del 5% (p/v). La parte (i) del hidrolizado se dirige preferentemente al recipiente de cultivo por alimentación. La "alimentación" de acuerdo con la presente invención significa la adición subsiguiente de la parte (i) del hidrolizado al recipiente de cultivo. La "velocidad de alimentación" utilizada en la presente invención se define como el volumen de hidrolizado transferido al recipiente de cultivo medido en m³/hora. El versado en el arte es capaz de

seleccionar la velocidad de alimentación adecuada para el procedimiento particular. La alimentación del hidrolizado se lleva a cabo preferiblemente con una velocidad de alimentación constante o una velocidad de alimentación variable o una combinación de ambos durante la etapa (d) del procedimiento de la invención. La alimentación del hidrolizado se lleva a cabo preferentemente de forma continua durante la etapa (d) del procedimiento de la invención o en intervalos de tiempo. Los intervalos preferidos son: e.g., relacionado con un tiempo de fermentación de 100 horas completo- e.g., una alimentación constante durante 60 horas, que después se detiene hasta el final del tiempo de fermentación de 100 horas. Otro ejemplo posible es comenzar con una alimentación constante durante 20 horas, que se interrumpe después de 20 horas y se reanuda tan pronto como el azúcar fermentable en el hidrolizado ha sido completamente fermentado.

Después de la fermentación, el hidrolizado fermentado se dirige al recipiente de hidrólisis de acuerdo con la etapa (e) del procedimiento de la presente invención. La redirección de acuerdo con la etapa (e) del procedimiento de la presente invención puede llevarse a cabo por cualquier método conocido por el versado en el arte como adecuado para el propósito inventivo. Durante la redirección de acuerdo con la etapa (e) del procedimiento de la invención, el hidrolizado se trata preferiblemente física, mecánica y/o químicamente. Los métodos preferidos de reorientación incluyen el bombeo u otros métodos de suspensiones de transporte que requieran potencia, tales como mezcla en línea de alta fuerza de cizalla. Dentro de una implementación particularmente preferida, la redirección se lleva a cabo por bombeo del hidrolizado al recipiente de hidrólisis. Procesar el hidrolizado antes de la fermentación de acuerdo con la etapa (d) del procedimiento de la invención dará como resultado una cinética de hidrólisis aún más rápida y un rendimiento superior de azúcar monomérico cuando las enzimas unidas a células se liberen más fácilmente del hongo y/o microorganismo.

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

El procedimiento inventivo de acuerdo con las etapas (a) a (e), como se ha definido anteriormente, proporciona, desde luego, varias ventajas en relación con el costo y la eficiencia debido a la producción de enzimas autosuficientes integradas, sin embargo, el funcionamiento del proceso de forma continua durante varios días puede conducir a una acumulación de estas sustancias inhibidoras que compensará algunas de estas ventajas conduciendo a una ralentización de la producción de la enzima y/o hidrólisis. Para garantizar un proceso de hidrólisis de enzimas autosuficiente que también sea atractivo para ser implementado en procesos de producción a escala industrial tales como la producción subsiguiente de productos de fermentación (e.g., bioetanol), los inventores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que estos riesgos pueden evitarse por eliminación de una o más de estas sustancias integradas en ciertas etapas del proceso.

Estas sustancias inhibidoras son productos de degradación de lignocelulosa incluyendo productos de degradación de lignina, productos de degradación de celulosa y productos de degradación de hemicelulosa. Los productos de degradación de la lignina pueden ser de naturaleza fenólica. Los productos de degradación de hemicelulosa incluyen furanos de azúcares (tales como hexosas y/o pentosas), incluyendo xilosa, manosa, galactosa, ramnosa y arabinosa. Ejemplos de hemicelulosas incluyen xilano, galactoglucomanano, arabinogalactano, arabinoglucuronoxilano, glucuronoxilano, y derivados y

combinaciones de los mismos. Ejemplos de productos de degradación de lignocelulosa, incluyen alcohol 4-OH bencílico, 4-OH benzaldehído, ácido 4-OH benzoico, trimetilbenzaldehído, ácido 2-furoico, ácido cumárico, ácido ferúlico, fenol, guaiacol, veratrole, pirogalolol, mono-metiléter de pirogalol , Alcohol vainillínico, vainillina, isovanilina, ácido vanílico, ácido isovanílico, ácido homovanílico, alcohol veratrílico, veratraldehído, ácido veratrico, ácido 2-O-metil gálico, alcohol siringílico, siringaldehído, ácido siringico, ácido trimetil gálico, homocatecol, Creosol, p-metil anisol, anisalaldehído, ácido anisico, furfural, hidroximetilfurfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido fórmico, ácido acético, ácido levulínico, ácido cinámico, coniferil aldehído, isoeugenol, hidroquinona, eugenol o combinaciones de los mismos.

Para garantizar un proceso más eficiente dentro de una implementación preferida del procedimiento de la presente invención, la al menos una sustancia inhibidora de al menos una enzima y/o inhibidora de al menos un microorganismo a eliminar es una sustancia inhibidora de al menos una enzima que pertenece a la clase de hidrolasas y/o inhibidor de al menos un microorganismo y/u hongo capaz de producir al menos una enzima que pertenece a la clase de hidrolasas.

Dentro de otra implementación particularmente preferida, la sustancia es inhibidora de al menos un hongo seleccionado del grupo que consiste en *Trichoderma sp.*, y *Talaromyces sp.* Tal como *Trichoderma reesei* y/o inhibidor de al menos un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en *Saccharomyces sp.*, *Clostridium sp.*, *Lactobacillus sp.*, y *Pichia sp.*

Dentro de una implementación preferida del procedimiento de la presente invención, esta, al menos una sustancia se elimina del material que contiene

lignocelulosa pretratada de acuerdo con la etapa (a) y/o de la parte (i) y/o (ii) del hidrolizado según Etapa (c).

En otras implementaciones preferidas, la eliminación se lleva a cabo añadiendo por lo menos un adsorbente al material pretratado que contiene lignocelulosa y/o a la parte (i) y/o (ii) del hidrolizado según la etapa (c). El adsorbente se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en carbón activado, sílice, minerales de silicato, zeolitas, carbón vegetal, arcilla, resinas de intercambio iónico y mezclas de los mismos, mientras que el carbón activado y/o carbón vegetal son particularmente preferidos.

Se prefiere además que al menos un adsorbente se añada al material pretratado que contiene lignocelulosa añadiendo el adsorbente antes de que el material pretratado que contiene lignocelulosa se transfiera al recipiente de hidrólisis. Sin embargo, también está dentro del alcance de la presente invención añadir el adsorbente directamente al recipiente de hidrólisis o añadir el adsorbente justo antes de la separación de acuerdo con la etapa c).

La eliminación del al menos un compuesto inhibidor mediante la adición de un adsorbente proporciona amplias ventajas. Por un lado, la filtrabilidad se mejora considerablemente. Además, en el caso de que se utilice carbón activado o carbón vegetal como adsorbente, se aumenta la combustibilidad de la torta de filtro y no se debe gastar o sólo una cantidad mínima de energía en el secado. De este modo, se puede conseguir un proceso independiente de la energía mediante la combustión de la torta de filtración.

Dentro de otra implementación preferida de la presente invención, la eliminación de la al menos una sustancia inhibidora de la parte (i) y/o (ii) del hidrolizado se

lleva a cabo por evaporación. Debido al carácter volátil de la mayoría de las sustancias inhibidoras, la evaporación es otro método eficaz de eliminación. La "evaporación" de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo preferiblemente bajo presión reducida, preferiblemente presión por debajo de la presión atmosférica, preferida por debajo de 750 mbar absolutos, más preferiblemente por debajo de 500 mbar absolutos, incluso más preferiblemente por debajo de 250 mbar absolutos. Los intervalos preferidos son de 75 a 750 mbar absolutos y de 75 a 250 mbar absolutos. Durante la evaporación, la temperatura se mantiene preferiblemente por debajo de 120°C, más preferiblemente por debajo de 100°C incluso más preferiblemente por debajo de 90°C y muy preferiblemente por debajo de 80°C. Los intervalos preferidos son de 45 a 120°C y de 45 a 100°C. Los tiempos de residencia se eligen preferiblemente de 0,1 s a 10 h, preferidos de 1 s a 1 h, más preferiblemente de 10 s a 30 min, lo más preferido de 30 s a 10 min. El pH se mantiene preferiblemente por debajo de pH 6, más preferiblemente por debajo de 5,5, incluso más preferiblemente por debajo de 5,0 y lo más preferido por debajo de 4,8. Los intervalos preferidos son de 3,5 a 6 y de 4,0 a 5,0. Los evaporadores preferidos son evaporadores de circulación, evaporadores de película delgada, evaporadores de película limpia y evaporadores de película descendente.

La eliminación de la al menos una sustancia inhibidora por evaporación proporciona otras ventajas ya que la evaporación proporciona también el beneficio de una esterilización del hidrolizado. Por lo tanto, se puede prevenir la contaminación cruzada durante la fermentación. Además, junto a la mayoría de las sustancias inhibidoras, se evaporará una cantidad sustancial de agua conduciendo a un hidrolizado concentrado (i.e., un volumen disminuido y una concentración de azúcar más alta) dando como resultado una reducción de costos adicional debido a un mayor rendimiento y un volumen de reactor minimizado. La evaporación es

un método de extracción tan eficaz que ya se pueden conseguir ventajas sustanciales del procedimiento inventivo aplicando este método únicamente a la parte (i) del hidrolizado.

En otra forma de implementación preferida también es posible combinar varios métodos de eliminación, en el que se prefiere particularmente combinar la adición de un adsorbente antes de transferir el hidrolizado al recipiente de hidrólisis con evaporación aplicada a la parte (i) y/o (ii) del hidrolizado. Dentro de esta implementación particular, también se prefiere añadir el adsorbente antes de la separación de acuerdo con la etapa c), particularmente preferido antes de la hidrólisis de acuerdo con la etapa b). Se prefiere particularmente que el procedimiento de acuerdo con la invención no comprenda la eliminación por lavado del material pretratado y/o hidrolizado.

En otra implementación preferida del procedimiento de la presente invención, una cantidad adicional de 0,01 a 30% (p/v) de material que contiene lignocelulosa, preferiblemente de 0,1 a 25% (p/v) que contiene lignocelulosa, más preferida se añade al recipiente de cultivo de 0,5 a 22% (p/v) y se prefiere particularmente de 1 a 20% (p/v). En una implementación particularmente preferida, el material que contiene lignocelulosa se obtiene separándolo del recipiente de pretratamiento. La adición de material pretratado que contiene lignocelulosa conducirá a la liberación lenta de carbono y funcionará como un inductor para la expresión de la celulasa.

En otro aspecto, la presente invención se refiere además a un procedimiento para la producción de un compuesto orgánico de la parte (ii) del hidrolizado como se ha definido anteriormente que comprende la etapa

(F1) poner en contacto la parte (ii) del hidrolizado con al menos un microorganismo y/o un hongo capaz de la producción de un compuesto orgánico seleccionado del grupo que consiste en ácidos orgánicos, aminoácidos, caprolactamas, antibióticos, vitaminas, enzimas, nucleótidos/nucleósidos, biogás, proteínas, polisacáridos, amino glucanos, solventes orgánicos, biocombustibles, biosurfactantes, aminoglucanos, derivados de azúcar y mezclas de los mismos;

o

(F2) someter la parte (ii) del hidrolizado a una conversión química, conversión catalítica, separación cromatográfica, separación por membrana y/o proceso de cristalización.

De acuerdo con el procedimiento para la producción de un compuesto orgánico según la etapa (f1) como se ha definido anteriormente, la temperatura durante el contacto de la parte (ii) del hidrolizado con el al menos un microorganismo se selecciona desde 10 hasta 65°C, preferiblemente de 15 a 55°C, especialmente preferidos de 20 a 50°C, lo más preferido de 25 a 45°C.

Se prefiere particularmente que el al menos un microorganismo se seleccione de levaduras mesófilas tales como todas las especies del genero *Saccharomyces*, especialmente *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces bulderi*, *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces cariocus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces dairenensis*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces eubayanus*, *Saccharomyces exiguus*, *Saccharomyces Florentinus*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces martiniae*, *Saccharomyces Monacensis*, *Saccharomyces*

norbensis, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces spencerorum*, *Saccharomyces turicensis*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces zonatus*, así como también *Arxula adeninovorans*, *Ashbya gossypii*, *Hansenula polymorpha*, *Debaryomyces hansenii*, *Hortea werneckii*, *Kluyveromyces lactis*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Thrichosporon domesticum*, *Thrichosporon montevidense*, *Xanthophyllomyces dendrohous*, *Yarrowia lypolytica*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia stipitis*, *Pichia segobiensis*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis*, *Candida boidinii*, *Candida tenuis*, *Pachysolen tannophilus*, *Hansenula polymorpha*, *Candida famata*, *Candida parapsilosis*, *Candida rugosa*, *Candida sonorensis*, *Candida maltosa*, *Issatchenkia terrícola*, *Kloeckera apis*, *Pichia barkeri*, *Pichia cactophila*, *Pichia deserticola*, *Pichia norvegensis*, *Pichia membranefaciens*, *Pichia mexicana* y *Torulaspora delbrueckii* y cualquier combinación de los mismos.

En una implementación preferida alternativa del procedimiento para la producción de un compuesto orgánico de la parte (ii) del hidrolizado, el al menos un microorganismo se selecciona de microorganismos termofílicos que se seleccionan preferiblemente de *Candida bovina*, *Candida picachoensis*, *Candida emberorum*, *Candida pintolopesii*, *Candida thermophila*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kazachstania telluris*, *Issatchenkia orientalis*, *Lachancea thermotolerans* y cualquier combinación de los mismos. Las bacterias termofílicas preferidas incluyen *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermohydrosulphuricum*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Thermoanaerobium brockii*, *Thermobacteroides acetoethylicus*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Clostridium thermoaceticum*, *Clostridium thermoautotrophicum*, *Acetogenium kivui*, *Desulfotomaculum nigrificans*, *Desulfovibrio thermophilus*, *Thermoanaerobacter*

tengcongensis, *Bacillus stearothermophilus*, *Thermoanaerobacter mathranii* y cualquier combinación de los mismos.

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

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

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

Además, cualquier combinación de los microorganismos y/u hongos enumerados anteriormente debe ser entendida como dentro del alcance de la presente invención.

La fermentación se lleva a cabo preferiblemente en un modo por lotes (discontinuo), en el modo alimentado por lotes o en un modo continuo. Lo más preferiblemente, la fermentación se lleva a cabo en el modo por lotes.

Dentro de una implementación preferida adicional, a la parte (ii) del hidrolizado antes de la etapa f1) del procedimiento para la preparación de minerales tales como compuestos que contienen cobre, zinc, magnesio, calcio, hierro y nitrógeno tales como nitrato, aminoácidos, amoníaco para la producción de un compuesto orgánico.

Los compuestos orgánicos valiosos resultantes de la fermentación bacteriana de la parte (ii) del hidrolizado comprenden, pero no se limitan a, ácidos orgánicos (tales como ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, ácido itacónico, ácido fumárico, ácido propiónico y ácido glucurónico), aminoácidos (tales como ácido glutámico, leucina, lisina, treonina, ácido aspártico, fenilalanina, cisteína), caprolactamas (tales como alfa-amino-caprolactama), antibióticos (tales como bleomicina, virginiamicina, lincomicina, monensina, blasticidina, tetraciclina), vitaminas (tales como vitamina B2, B12 y C), enzimas, nucleótidos/nucleósidos (tales como NADH, ATP, cAMP, FAD, coenzima A), biogás, biopolímeros (tales como polihidroxibutirato, poliamidas/fibroínas), proteínas, polisacáridos (tales como Xantano, dextrano), amino glucanos (tales como ácido hialurónico), así como solventes orgánicos y biocombustibles (tales como acetona, etanol, butanol, propanodiol).

Los compuestos orgánicos valiosos resultantes de la fermentación de levadura de la parte (ii) del hidrolizado comprenden, pero no se limitan a, solventes orgánicos (e.g. etanol, propanol), nucleótidos (e.g., ARN), biosurfactantes (e.g., lípidos de soforosa), enzimas y biopolímeros (e.g., espidroinas).

Los compuestos orgánicos valiosos resultantes de la fermentación fúngica de la parte (ii) del hidrolizado comprenden ácidos orgánicos (tales como ácido cítrico,

ácido fumárico, ácido itacónico), antibióticos (tales como penicilina, cefalosporina), enzimas y polisacáridos (tales como quitina).

En una implementación preferida adicional de este procedimiento, el compuesto orgánico se selecciona entre alcoholes, ácidos orgánicos, biopolímeros, antibióticos, aminoácidos, caprolactamas, polisacáridos, solventes orgánicos, biocombustibles, aminoglucanos, nucleótidos/nucleósidos, vitaminas, biosurfactantes, enzimas y mezclas de los mismos.

De acuerdo con el procedimiento para la producción de un compuesto orgánico de acuerdo con la etapa (f2) someter la parte (ii) del hidrolizado a un proceso de conversión química, conversión catalítica, separación cromatográfica, separación por membrana y/o cristalización se lleva a cabo por métodos cromatográficos y/o etapas de filtración para el uso de azúcares purificados en fermentación (e.g., polímeros basados en ácido láctico) y/o conversión química (producción de FDCA).

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a un compuesto orgánico producido de acuerdo con el procedimiento definido anteriormente.

En las siguientes implementaciones particularmente preferidas de la presente invención se describen y no se deben entender como limitantes de la invención en ningún aspecto.

Implementación 1 particularmente preferida

Procedimiento para hidrólisis enzimática autosuficiente de material que contiene lignocelulosa, que comprende las etapas

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

En el que el material pretratado que contiene lignocelulosa se trata para eliminar al menos una sustancia inhibidora de al menos una enzima y/o al menos un microorganismo y/u hongo por adición de al menos un adsorbente seleccionado preferiblemente de carbón activado, carbón vegetal y mezclas de los mismos.

Implementación 2 particularmente preferida

Procedimiento para hidrólisis enzimática autosuficiente de material que contiene lignocelulosa, que comprende las etapas

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

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

En el que la parte (i) y/o parte (ii) del hidrolizado se trata para eliminar por evaporación al menos una sustancia inhibidora de al menos una enzima y/o al menos un microorganismo y/u hongo.

Implementación 3 particularmente preferida

Procedimiento para hidrólisis enzimática autosuficiente de material que contiene lignocelulosa, que comprende las etapas

- (a) someter un material que contiene lignocelulosa a un pretratamiento en un dispositivo de pretratamiento;
- (b) poner en contacto el material pretratado que contiene lignocelulosa de la etapa a) con al menos una enzima que pertenece a la clase de hidrolasas en un recipiente de hidrólisis para formar un hidrolizado;
- (c) separar el hidrolizado y dividir posteriormente el hidrolizado en dos partes (i) y (ii), donde la parte (i) se dirige a un recipiente de cultivo;

- (d) fermentar la parte (i) del hidrolizado con al menos un microorganismo y/u hongo capaz de producir al menos una enzima que pertenece a la clase de hidrolasas;

y

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

En el que el material pretratado que contiene lignocelulosa se trata para eliminar al menos una sustancia inhibidora de al menos una enzima y/o al menos un microorganismo y/u hongo por adición de al menos un adsorbente seleccionado preferiblemente de carbón activado, carbón vegetal y mezclas de los mismos y la parte (i) y/o la parte (ii) del hidrolizado se tratan para eliminar por evaporación al menos una sustancia inhibidora de al menos una enzima y/o al menos un microorganismo y/u hongo.

Implementación 4 particularmente preferida

Procedimiento según la forma de implementación particularmente preferida 1, 2 ó 3, en el que la proporción de la parte (i) del hidrolizado a la parte (ii) es de 0,01 a 1, preferiblemente de 0,02 a 0,5 y muy preferiblemente de 0,05 a 0,1.

Implementación 5 particularmente preferida

Procedimiento según implementación particularmente preferida 1, 2, 3 ó 4, en el que una cantidad adicional de 0,01 a 30% (p/v) de material que contiene lignocelulosa, preferiblemente de 0,15 a 25% (p/v), más preferiblemente de 0,51 a 22% (p/v) y particularmente preferido de 15 a 20% (p/v) se añade al recipiente de cultivo. Es muy preferido dentro de esta implementación que el material que

contiene lignocelulosa sea material pretratado que contenga lignocelulosa, obtenida preferiblemente a partir del dispositivo de pretratamiento.

Implementación 6 particularmente preferida

Procedimiento según cualquiera de las implementaciones particularmente preferidas 1 a 5, en el que el al menos un microorganismo capaz de producir la al menos una enzima que pertenece a la clase de hidrolasas se selecciona entre exo y endocelulasas, beta-glucosidasa (BGL)), Exo y endohemicelulasas y esterasas y/o el al menos un hongo capaz de producir la al menos una enzima que pertenece a la clase de hidrolasas, se selecciona entre especies de *Trichoderma* y *Talaromyces* y mezclas de las mismas y es más preferiblemente *Trichoderma reesei*.

Implementación 7 particularmente preferida

Proceso de acuerdo con cualquiera de las implementaciones particularmente preferidas 1 a 6, que comprende además la etapa

(F1) poner en contacto la parte (ii) del hidrolizado con al menos un microorganismo y/o un hongo capaz de la producción de un compuesto orgánico seleccionado del grupo que consiste en ácidos orgánicos, aminoácidos, caprolactamas, antibióticos, vitaminas, enzimas, nucleótidos/nucleósidos, biogás, proteínas, polisacáridos, amino glucanos, solventes orgánicos, biocombustibles, biosurfactantes, aminoglucanos, derivados de azúcar y mezclas de los mismos;

Ejemplo y figura

La presente invención se describe adicionalmente mediante el siguiente ejemplo y figura. El ejemplo y la figura son sólo con fines ilustrativos y no deben entenderse como limitativos de la invención.

Fig. 1 muestra el flujo de proceso del procedimiento según la presente invención.

La línea discontinua representa la opción de añadir parte del material de lignocelulosa pretratada directamente al recipiente de cultivo.

Fig. 2 muestra el rendimiento de glucosa, xilosa y NaDL-lactato así como la cantidad de ácido acético y ácido fórmico cuando se detoxifica el hidrolizado por evaporación

Ejemplo 1

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

La fermentación se lleva a cabo en un sistema de biorreactor de tanque agitado con una temperatura, un pH y un dispositivo de control de oxígeno disuelto (= recipiente de cultivo). El cultivo se inicia con un cultivo de siembra al 5% (p/p). Además, el medio contiene sales y minerales y el hidrolizado concentrado como principal fuente de carbono. La fermentación se lleva a cabo a pH 5, a 30°C y a un nivel de oxígeno disuelto del 25%. La alimentación de la parte (i) del hidrolizado se inicia después de 15 horas y se hizo continuamente durante otras 85 horas. El volumen de alimentación total es del 50% basado en el volumen total de fermentación final.

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

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

La hidrólisis se realiza a 50°C, pH 5, durante 96 h con agitación a 50 rpm. Después de la hidrólisis, se añade carbón activado (granulado) al 1% (p/v) al contenido del recipiente de hidrólisis. El contenido se incuba con el carbón activado a temperatura ambiente con agitación a 250 rpm. Después de 1 h, se realiza una separación sólido-líquido para recuperar el hidrolizado detoxificado separándolo de los sólidos restantes por centrifugación o filtración (tamaño de poro de filtro <1 mm). El 15% del hidrolizado detoxificado se somete entonces a una etapa de evaporación para eliminar adicionalmente los inhibidores volátiles y reducir el volumen de esta parte del hidrolizado a un tercio del volumen inicial. Este hidrolizado doble detoxificado y concentrado se introduce entonces en la fermentación como se ha descrito anteriormente. El resto del hidrolizado (que no sufrió) evaporación se puede usar para la producción de un compuesto orgánico.

Ejemplo 2

Paja de trigo, eliminación de la sustancia inhibidora por triple evaporación.

La fermentación se llevó a cabo en un sistema de biorreactor de tanque agitado con una temperatura, un pH y un dispositivo de control de oxígeno disuelto (= recipiente de cultivo). El cultivo se inició con un cultivo de siembra al 5% (p/p). Además, los medios contenían sales y minerales e hidrolizado concentrado como

principal fuente de carbono. La fermentación se llevó a cabo a pH 5, a 30°C y a un nivel de oxígeno disuelto del 25%. La alimentación de la parte (i) del hidrolizado se inició después de 15 horas y se hizo continuamente durante otras 85 horas. El volumen de alimentación total fue del 45% basado en el volumen total de fermentación final.

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

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

La hidrólisis se realizó a 50°C, pH 5, durante 96 h con agitación a 50 rpm.

Después de la hidrólisis, el hidrolizado se sometió luego a una etapa de evaporación para eliminar los inhibidores volátiles y para reducir el volumen del hidrolizado en un factor de 6,4. Este hidrolizado detoxificado y concentrado se introdujo después en la fermentación como se ha descrito anteriormente.

Para la evaporación, el pH se ajustó a 4 utilizando ácido sulfúrico y después se llevó a cabo la evaporación a 75°C y 100 mbar. La evaporación se detuvo cuando se alcanzó una concentración de azúcar de 500 g/l. Los rendimientos respectivos de glucosa, xilosa y NaDI y las cantidades de ácido fórmico y acético se muestran en la tabla 1 y la Fig. 2. Esta desintoxicación resultó en una reducción de ácido acético en más del 80% y de ácido fórmico en aproximadamente 30%.

Los resultados se muestran en la tabla 1 y la figura 2.

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

Tabla 1: rendimientos de glucosa, xilosa y las cantidades de ácido fórmico y acético después de la evaporación.