

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 575**

51 Int. Cl.:

C12P 7/10 (2006.01)

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

C12P 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08835021 .0**

96 Fecha de presentación: **18.08.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2179048**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2010**

54 Título: **Proceso de sacarificación de biomasa concentrada**

30 Prioridad:
22.08.2007 US 843114

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.06.2012

73 Titular/es:
**E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
1007 MARKET STREET
WILMINGTON, DE 19898, US y
ALLIANCE FOR SUSTAINABLE ENERGY, LLC**

72 Inventor/es:
**HENNESSEY, Susan, Marie;
SEAPAN, Mayis;
ELANDER, Richard, T. y
TUCKER III, Melvin, P.**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 382 575 T3

DESCRIPCIÓN

Proceso de sacarificación de biomasa concentrada

Campo de la invención

- 5 Se proporcionan procesos de sacarificación de biomasa pretratada para obtener altas concentraciones de azúcares fermentables. Específicamente, se desarrolló un proceso que utiliza un enfoque de alimentación por lotes con reducción de tamaño de partícula para proporcionar una reacción de sacarificación enzimática de alto contenido de peso seco de biomasa, lo que produce un hidrolizado de concentración alta de azúcares, utilizando un sistema de reactor de bajo costo.

Antecedentes de la invención

- 10 Materias primas lignocelulósicas y celulósicas y desechos, tales como residuos agrícolas, maderas, residuos forestales, todos procedentes de la fabricación de papel y residuos sólidos municipales e industriales, proporcionan una materia prima renovable potencialmente grande para la producción de valiosos productos como combustibles y otros productos químicos. Materias primas celulósicas y lignocelulósicas y desechos, compuestos de polímeros de carbohidratos que comprenden celulosa, hemicelulosa, glucanos y lignina generalmente son tratados con una
15 variedad de medios químicos, mecánicos y enzimáticos para liberar principalmente azúcares hexosa y pentosa, que luego pueden ser fermentados para lograr productos útiles.

- Los métodos de pretratamiento se utilizan para hacer los polímeros de hidratos de carbono de materiales lignocelulósicos y celulósicos más fácilmente manejable para las enzimas de sacarificación. La mezcla de pretratamiento, a continuación, se hidroliza más en presencia de un consorcio de enzimas de sacarificación para
20 liberar monosacáridos y oligosacáridos en un hidrolizado. Las enzimas de sacarificación utilizadas para producir azúcares fermentables de la biomasa pretratada suelen incluir una o más glicosidasas, tal como glicosidasas hidrolizadoras de celulosa, glicosidasas hidrolizadoras de hemicelulosa y glicosidasas hidrolizadoras de almidón, así como peptidasas, lipasas, ligninasas y/o esterasa de feruloilo. Las enzimas de sacarificación y los métodos para el tratamiento de la biomasa están revisados en Lynd, L. R, et al. (Microbiol. Mol. Biol. Rev. (2002) 66:506-577).

- 25 El documento de patente de los Estados Unidos US5498766 revela un método de tratamiento para la biomasa lignocelulósica fibrosa para hacer la biomasa más susceptible a la hidrólisis. En una realización, el proceso comprende los siguientes pasos: a) proporcionar una biomasa lignocelulósica fibrosa molida; b) mezclar dicha biomasa molida con agua para producir una papilla; c) someter dicha papilla a fuerzas de cizalladura alta mediante la inyección de dicha papilla a través de la corriente en un flujo turbulento de Couette creado con un dispositivo de
30 rotor-estator de alta frecuencia en condiciones de microcavitación de la papilla para destrozarse la estructura fibrosa de la biomasa en la papilla creando una papilla cizallada, dicho dispositivo comprende una cámara que contiene un estator fijo equipado con una herramienta de boquilla con anillos concéntricos con perforaciones de taladro que encajan con anillos coaxiales dentados opuestos acoplados a un rotor que está acoplado a un eje giratorio (reivindicación 1); d) mezclar la papilla de cizalladura del paso (c) con una celulasa para formar una mezcla; e)
35 someter dicha mezcla a dichas fuerzas de cizalladura altas creadas por dicho dispositivo para formar una mezcla cizallada; f) separar dicha mezcla cizallada del paso (e) para producir un filtrado y un retenido; g) agregar el retenido a una recién formada papilla cizallada del paso (c) y formar una mezcla; y h) simultáneamente agregar una enzima a dicha mezcla y someter dicha mezcla a dichas fuerzas de cizalladura altas creadas por dicho dispositivo. En un ejemplo una papilla de aproximadamente 14% de sólidos es tratada de esta manera.

- 40 El documento de patente internacional WO2006/056838 revela un proceso de licuefacción y sacarificación de biomasa que contienen polisacáridos con un contenido de materia seca por encima del 20%, caracterizado por someter dicha biomasa a: a) hidrólisis enzimática y b) mezcla por tipo de mezclado basado en la gravedad que proporciona el tratamiento mecánico y/o la degradación de la biomasa. En un ejemplo, llevado a cabo utilizando un mezclador rotatorio de cemento, una papilla con contenido de materia seca final del 30% se sacarifica e hidroliza,
45 por lo cual se obtiene una solución que contiene 70 g/l de glucosa y 30 g/l de xilosa.

- A fin de que el producto de sacarificación, el hidrolizado de biomasa, pueda usarse en la producción de la fermentación posterior en una manera económica, debería contener una alta concentración de azúcares. Una concentración de azúcar que sea superior al 14% en el hidrolizado utilizado para la fermentación a etanol, para producir etanol a un nivel económicamente viable es lo deseado. Para la mayoría de los tipos de biomasa
50 lignocelulósica esto corresponde al uso de un contenido de materia seca de biomasa por encima del 20% en un proceso de sacarificación. La sacarificación de biomasa con rendimiento alto de azúcar a esta concentración tan alta de biomasa en un sistema reactor económicamente posible ha sido hasta ahora difícil de lograr.

- Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de un proceso económico de sacarificación de biomasa que pueda llevarse a cabo utilizando un alto peso seco de biomasa de modo que los rendimientos sean altos y el hidrolizado
55 resultante contenga una alta concentración de azúcares fermentables. Para lograr dichas economías y resultados, el proceso debe proporcionar suficiente control de temperatura y pH. Los solicitantes han sido capaces de desarrollar

ese proceso mediante la manipulación de la biomasa en formas que sustentan la mezcla profunda en un sistema de reactor de bajo costo tradicional de tanque agitado.

Compendio de la invención

La invención presente proporciona un proceso de sacarificación de biomasa pretratada en una biomasa de peso seco alto para producir azúcares fermentables. El proceso de la invención utiliza un sistema de reactor de alimentación por lotes que incluye varios pasos de reducción de tamaño y mezclado para mantener la mezcla completa en un tanque vertical, agitado. En una realización de la invención el proceso comprende:

a) proporcionar una parte de los componentes de la reacción en un tanque agitado vertical que tiene un mecanismo de reducción de partículas, dichos componentes de la reacción comprenden

i) una parte de una papilla de biomasa pretratada; y

ii) una parte de un primer consorcio de enzimas de sacarificación que comprende al menos una enzima capaz de hidrolizar celulosa;

b) hacer reaccionar dicha papilla y enzimas en condiciones adecuadas;

c) aplicar el mecanismo de reducción del tamaño de partícula en donde dicho mecanismo se selecciona del grupo que consiste en mezclar, moler, cizallar, partir, dispersar y dispersar por cizalla;

d) añadir una porción adicional de la biomasa pretratada que produce una papilla de biomasa más alta en sólidos;

e) opcionalmente añadir una porción adicional de un consorcio de enzimas de sacarificación;

f) hacer reaccionar dicha papilla de biomasa más alta en sólidos en condiciones adecuadas; y

g) opcionalmente repetir uno o más pasos (c), (d), (e), y (f) una o más veces,

de modo que se produzca un hidrolizado que contiene azúcar en donde la fluencia de la papilla se mantiene a menos de 30 Pa y en donde el peso seco de biomasa en todas las porciones de biomasa pretratada combinadas es mayor del 30% del peso del producto hidrolizado final.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un gráfico de los límites de estancamiento de la biomasa de mazorca de maíz en un sacarificador.

La figura 2 muestra un gráfico del efecto de distintas cantidades de carga de enzimas en la reducción del estancamiento de la biomasa de mazorca de maíz.

La figura 3 muestra un gráfico de la variación de la viscosidad del hidrolizado frente al % de DWB (peso seco de biomasa).

La figura 4 muestra un gráfico del efecto del tiempo de reacción de la sacarificación frente a la viscosidad

Descripción detallada de la invención

La invención presente proporciona un proceso para sacarificar una biomasa de alto peso en seco que produce una alta concentración de azúcares fermentables en el hidrolizado resultante. En el presente proceso, la biomasa se introduce en un reactor utilizando un sistema de alimentación por lotes, la biomasa se somete a varios pasos de reducción de tamaño, y el contenido del reactor se mezcla bien permitiendo el buen control del pH y temperatura durante la sacarificación usando enzimas de sacarificación. El proceso es adecuado para hacer la mezcla en un reactor vertical con agitación en cabeza, lo que puede ser escalado para grandes volúmenes económicamente. Los pasos de reducción de tamaño que se incluyen en el proceso de sacarificación propician una mayor velocidad de reacción de la celulosa y/o la hemicelulosa con las enzimas de sacarificación, lo que permite una rápida licuefacción de la biomasa de sólidos pretratada húmeda y el uso de este reactor de bajo costo. La combinación de la reducción de tamaño, la más rápida sacarificación enzimática y el proceso de alimentación por lotes de la carga de biomasa, impide que el contenido del reactor desarrolle una resistencia a la tracción significativa, permitiendo una completa mezcla en un reactor de tanque vertical (incluyendo turbinas y motor). La mezcla completa y la prevención del estancamiento, proporciona un mejor control del pH y la temperatura. Con dicho control, los hidrolizados con biomasa de peso seco alto pueden hacerse con altos rendimientos de azúcares. El hidrolizado de azúcar de alta concentración resultante puede utilizarse en fermentaciones para producir valiosos productos como los combustibles y otros productos químicos, incluyendo el etanol.

Definiciones:

En esta solicitud, se utiliza una serie de términos. Se proporcionan las siguientes definiciones:

- El término "biomasa" se refiere a cualquier material celulósico o lignocelulósico e incluye materiales que comprenden celulosa y opcionalmente además comprenden hemicelulosa, lignina, almidón, polisacáridos, oligosacáridos y/o monosacáridos. La biomasa también puede comprender componentes adicionales, tales como proteínas y/o lípidos. De acuerdo con la invención, la biomasa puede derivarse de una sola fuente, o la biomasa puede comprender una mezcla derivada de más de una fuente; por ejemplo. La biomasa podría comprender una mezcla de mazorcas de maíz y mezcla de rastrojos de maíz, o una mezcla de hierba y hojas. La biomasa incluye, pero no se limita a cultivos de bioenergía, residuos agrícolas, residuos sólidos municipales, desechos sólidos industriales, lodos de fabricación de papel, residuos de jardín, madera y residuos de silvicultura. Ejemplos de biomasa incluyen, pero no están limitados a, granos de maíz, mazorcas de maíz, residuos de cultivos tales como cáscaras de maíz, rastrojos de maíz, pastos, trigo, paja de trigo, cebada, paja de cebada, heno, paja de arroz, mijo, residuos de papel, , bagazo de caña de azúcar, sorgo, soja, componentes obtenidos de la molienda de granos, árboles, ramas, raíces, hojas, virutas de madera, serrín, arbustos y matorrales, verduras, frutas, flores y estiércol. La biomasa que es útil incluye biomasa que tiene un valor relativamente alto en carbohidratos, es relativamente densa y/o es relativamente fácil de recoger transportar, almacenar y/o manejar. La biomasa que es útil incluye mazorcas de maíz, rastrojos de maíz y bagazo de caña de azúcar.
- El término "biomasa pretratada" significa biomasa que ha sido sometida a un pretratamiento o tratamiento previo antes de la sacarificación. Los tratamientos tales como los pretratamientos son descritos a continuación en este documento.
- El término "lignocelulósico" se refiere a una composición que comprende ambas, lignina y celulosa. Los materiales lignocelulósicos también pueden comprender hemicelulosa.
- El término "celulósico" se refiere a una composición que comprende celulosa.
- El término "sacarificación" se refiere a la producción de azúcares fermentables de polisacáridos.
- El término "azúcares fermentables" se refiere a oligosacáridos y monosacáridos que pueden utilizarse como una fuente de carbono por un microorganismo en un proceso de fermentación.
- El término "hidrolizado" se refiere al producto de sacarificación, que contiene los azúcares producidos en el proceso de sacarificación, la biomasa no hidrolizada restante y las enzimas utilizadas para sacarificación.
- El término "papilla" se refiere a una mezcla de material insoluble y un líquido.
- El término "papilla mezclable" se refiere a una mezcla que se convierte en sustancialmente homogénea bajo la acción del sistema de agitación a que es sometido. "Capacidad de mezcla" hace referencia a esta propiedad de una papilla.
- El término "papilla completamente mezclada" se refiere a un estado donde los componentes de la papilla están sustancialmente distribuidos uniformemente (homogéneamente) a lo largo de la papilla.
- El término "talón" se refiere al líquido inicial o papilla inicial cargada en un reactor antes de que la biomasa se introduzca y la sacarificación comience.
- Se entiende por "peso seco" de biomasa el peso de la biomasa que tiene toda o esencialmente casi todo el agua eliminada. Peso seco normalmente se mide de acuerdo con el estándar E1756-01 (método estándar de prueba para la determinación de sólidos totales en una biomasa) de la American Society for testing and Materials (ASTM) o el estándar T-412 orn-02 (humedad de pulpa, papel y cartón) de la Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Inc. (TAPPI).
- El término "peso seco de la concentración de biomasa" se refiere a la cantidad total de peso seco de biomasa total agregada al sistema de reactor de alimentación por lotes, calculado en el momento de la adición, como un porcentaje del peso total de la composición de la reacción en el reactor al final del proceso.
- El término "condiciones de reacción adecuadas" se refiere al tiempo, temperatura, pH y concentración del reactivo que se describen en detalle a continuación. Las condiciones de reacción incluyen la mezcla o agitación por la acción de un sistema de agitación en el reactor de tanque vertical, que incluye pero no se limita a turbinas. La mezcla o agitación puede ser continua o no continua con, por ejemplo, interrupciones que resultan de agregar componentes adicionales o para la evaluación de la temperatura y pH.
- En el presente proceso, puede utilizarse cualquier biomasa pretratada.
- La biomasa puede ser pretratada por cualquier método conocido por un experto en la técnica tal como con ácido, base, disolvente orgánico, agente oxidante u otros productos químicos. También, la biomasa puede ser tratada con

uno o más productos químicos en combinación con vapor o con vapor solo. El pretratamiento puede también incluir rotura por medios mecánicos tales como trituración, molienda o picado, así como la aplicación de otras energías físicas de rotura tales como ultrasonido o microondas. Además, puede utilizarse la biomasa no tratada, pero más adecuado es el uso de biomasa que ha sido pretratada para mejorar la sacarificación posterior. La biomasa puede estar inicialmente en una alta concentración de peso en seco o en forma más diluida como es el caso de vinazas.

Los solicitantes han desarrollado un proceso de sacarificación para la biomasa que combina varias reducciones de tamaño y múltiples adiciones de biomasa en un sistema de tanque vertical agitado estándar que sorprendentemente mantiene la viscosidad suficientemente baja para permitir la carga del reactor con más de 20% de peso seco de biomasa, mientras que se mantiene la mezcla homogenizada para proporcionar un control de pH y de temperatura eficientes. Este proceso produce altos rendimientos de azúcares. En una realización, se alcanzó la concentración de peso seco de biomasa de alrededor del 38%. Por lo tanto se ha logrado un proceso de sacarificación de biomasa económico.

La biomasa se introduce en un tanque reactor vertical equipado con un sistema de agitador en cabeza tal como un motor y un eje con una o más turbinas. El número y tipo de turbinas utilizadas en el eje esta diseñado para proporcionar flujo adecuado y suspensión de sólidos adecuada dentro del reactor en las diversas etapas de sacarificación. Las turbinas preferidas son diseños de alto flujo que tienen números de baja potencia y por lo tanto bajos requisitos de energía, disminuyendo así el tamaño del motor requerido en el sistema de reactor de bajo costo

Las turbinas de alto flujo con bajos números de potencia que pueden utilizarse son bien conocidas por un experto en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, turbinas de álabes inclinados o hidroalas. Turbinas de alto flujo están disponibles comercialmente, por ejemplo: Lightnin A310 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL.) APV LE hydrofoil (Invensys APV, Getzville, NY) y Chemineer HE-3 (Chemineer, Inc., Dayton, OH).

En otros sistemas de sacarificación de sólidos altos, tales como un sistema de tanque horizontal rotativo, los requerimientos de energía inicial para mezclar la biomasa sólida húmeda inicial son altos y luego disminuyen según el sólido húmedo se licúa. Otros inconvenientes con los sistemas de mezclas horizontales son el gran agitador con poca distancia a la pared y el sellado del agitador sumergido, que tiende a tener pérdidas y ser un problema de mantenimiento.

En el presente proceso está presente en el reactor la biomasa desde el inicio del proceso de sacarificación en la forma de una papilla mezclable. Una mezcla de material insoluble y un líquido es una papilla mezclable cuando se convierte sustancialmente en homogénea bajo la acción del sistema de agitación a que es sometido. El presente proceso mantiene la resistencia a la tracción de la papilla de biomasa mezclable a lo largo de la sacarificación en menos de unos 30 Pa, la resistencia a la tracción es una medida de la tensión mínima que se requiere para romper la estructura suficientemente antes de que ocurra cualquier movimiento (Mixing in the Process Industries, 2ª edición, N. Hamby et. al. página 20 (1997)). En papillas de biomasa con mayor resistencia a la tracción, la resistencia a la tracción puede superarse agregando turbinas adicionales y llevándolo a cabo a mayor velocidad por lo que se requiere un motor más grande. A medida que la resistencia a la tracción del fluido aumenta, el sistema de agitación necesitado para obtener la mezcla se convierte en no rentable. De esta forma manteniendo la resistencia a la tracción de la papilla de biomasa mezclable a menos de unos 30 Pa el sistema de agitación requerido para la mezcla es un sistema económico en términos de requerimiento de estructura y energía

En el presente proceso, la biomasa pretratada cargada en el reactor puede estar ya en forma de una papilla mezclable, o si tiene un contenido de sólidos que hace que no sea mezclable, a continuación se incluye el líquido hasta el punto de hacerla una papilla mezclable. La biomasa que puede estar en una forma inicial como una papilla mezclable puede incluir, por ejemplo, vinaza o biomasa pretratada en un proceso que utiliza un alto componente líquido. Para la biomasa que no está en forma de papilla mezclable, el líquido puede añadirse antes de la carga o la biomasa puede ser cargada en un reactor que está precargado con un líquido. El líquido puede ser agua, fresca o reciclada de otras partes del proceso, vinaza fina de una operación de molido en seco de maíz, una porción del hidrolizado separado de un lote anterior, como tal o diluido, o varias otras corrientes de mucha agua. Por ejemplo, un talón inicial de líquido se carga en el reactor y luego se introduce la biomasa para formar una papilla de biomasa que se sostiene a través del mezclado bajo la acción del agitador vertical. La papilla puede ser llevada hasta tan alto contenido de peso seco de biomasa como se pueda incluir, mientras no presente una resistencia a la tracción que no pueda superar el sistema de agitador vertical para mantener la capacidad de mezcla y no superior a unos 30 Pa. El peso exacto variará dependiendo del tipo de biomasa, tamaño del reactor y mecanismo de agitación, y puede determinarse fácilmente por un experto en la materia. La capacidad de mezcla puede evaluarse por cualquier método aplicable tal como la inspección visual, utilizando una sonda como una sonda óptica láser para evaluar el movimiento de las partículas, o por muestreo y ensayos de homogeneidad o viscosidad. La biomasa de esta carga inicial es una parte de la biomasa total utilizada en una carga de sacarificación. Se agregan porciones adicionales de biomasa durante la sacarificación como se describe a continuación.

Una parte puede ser inferior a 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100% de la biomasa u otros componentes de reacción añadida en un paso cualquiera.

Durante la mezcla, la papilla se lleva al pH deseado mediante adición de ácido o base según sea necesario, en función del pH inicial de la biomasa, que variará según el pretratamiento usado. El pH específico deseado se basa en el pH óptimo para las enzimas de sacarificación que se vayan a usar con el tipo particular de biomasa que se procesa, como se describe a continuación. La mezcla total de la papilla de biomasa asegura que se consigue un pH sustancialmente uniforme en todo el material de la biomasa, permitiendo un funcionamiento óptimo de las enzimas de sacarificación. La importancia de mantener el pH deseado se demuestra en el ejemplo 5 de este documento, donde se muestra que una desviación en el pH objeto reduce el rendimiento de azúcares.

Durante la mezcla, la papilla es también conducida a la temperatura deseada por calefacción o refrigeración de la mezcla de biomasa. La temperatura específica deseada se basa en la temperatura óptima para las enzimas de sacarificación que se usen con el tipo particular de biomasa que se esté procesando, como se describe a continuación, para conseguir la mejor tasa de reacción de sacarificación posible. Uno también puede elegir funcionar a temperaturas, más bajas por otras razones de procesamiento, sin efecto perjudicial para la enzimas, aunque la actividad enzimática puede reducirse a temperaturas inferiores a la temperatura óptima. Las enzimas de sacarificación se agregan a la papilla de biomasa tras el ajuste del pH y la temperatura. Se trata de la parte de las enzimas de sacarificación que se agrega a la biomasa pretratada inicial mezclable. Enzimas de sacarificación adicionales pueden agregarse después siguiendo la adición de más porciones de biomasa en el proceso de alimentación por lotes descrito a continuación, o podrían añadirse al principio. Además, pueden añadirse enzimas diferentes en momentos diferentes para lograr una eficiencia de sacarificación óptima.

Las enzimas de sacarificación, que también pueden ser referidas como un consorcio de enzimas de sacarificación, se utilizan para hidrolizar la biomasa liberando oligosacáridos y/o monosacáridos en el hidrolizado. Las enzimas de sacarificación se revisan en Lynd. L. R., et al (Microbiol. Mol. Biol. Rev. (2002) 66:506-577). Un consorcio de enzimas de sacarificación comprende una o más enzimas seleccionadas principalmente, pero no exclusivamente, del grupo "glicosidasas" que hidrolizan los enlaces de éter de di-oligo-, y polisacáridos y se encuentran en la clasificación enzimática EC 3.2.1.x (Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego, CA con Suplemento 1 (1993), Suplemento 2 (1994), Suplemento 3 (1995), suplemento 4 (1997) y suplemento 5 [en Eur. J. Biochem. 1994), 223:1-5, Eur. J. Biochem. (1995), 232:1-6, y Eur. J. Biochem. (1996), 237:1-5, Eur J. Biochem. (1997), 250:1-6 y Eur. J. Biochem. (1999), 264:610-650, respectivamente]) del grupo general "hidrolasas" (EC 3.). Glicosidasas útiles en el presente método se pueden clasificar mediante el componente de la biomasa que hidrolizan. Glicosidasas útiles para el presente método incluyen glicosidasas hidrolizadoras de celulosa (por ejemplo, celulasas, endoglucanasas, exoglucanasas, celobiohidrolasas, β -glucosidasas), glicosidasas hidrolizadoras de hemicelulosa, llamadas hemicelulasas, (por ejemplo, xilanasas, endoxilanasas, exoxilanasas, β -xilidasas, arabinoxilanasas, manasas, galactasas, pectinasas, glucuronidasas) y glicosidasas hidrolizadoras de almidón (por ejemplo, amilasas, α -amilasas, β -amilasas, glucoamilasas, α -glucosidasas, isoamilasas). Además, puede ser útil agregar otras actividades para el consorcio de enzimas de sacarificación tales como peptidasas (EC 3.4.x.y), lipasas (EC 3.1.1.x y 3.1.4.x), ligninasas (EC 1.11.1.x) y feruloiloesterasas (EC 3.1.1.73) para ayudar a liberar polisacáridos de otros componentes de la biomasa. Es bien sabido en la técnica que los microorganismos que producen enzimas hidrolizantes de polisacáridos a menudo exhiben una actividad, tal como la degradación de la celulosa, que está catalizada por varias enzimas o un grupo de enzimas que tienen especificidades de sustrato diferentes. Así, una celulasa de un microorganismo puede comprender un grupo de enzimas, todas las cuales puede contribuir a la actividad de degradar la celulosa. Preparados enzimáticos comerciales o no comerciales, tales como celulasa, pueden comprender numerosas enzimas dependiendo del esquema de purificación utilizado para obtener la enzima. Así, las enzimas de sacarificación utilizadas en el presente método comprenden al menos una "celulasa", y esta actividad puede estar catalizada por más de una enzima. Opcionalmente, las enzimas de sacarificación usadas en el presente método pueden comprender al menos una hemicelulasa en función del tipo de biomasa utilizada en el presente proceso. Por ejemplo, la hemicelulasa normalmente no es necesaria cuando la biomasa de sacarificación es pretratada con ácido y está generalmente incluida cuando la biomasa de sacarificación es pretratada bajo condiciones neutras o básicas. Las enzimas de sacarificación pueden obtenerse comercialmente, tales como Spezyme® CP celulasa (Genencor International, Rochester, NY) y Multifect® xilanasas (Genencor). Además, las enzimas de sacarificación pueden producirse biológicamente, incluyendo el uso de microorganismos recombinantes. Pueden desarrollarse nuevas enzimas de sacarificación, que pueden ser utilizadas en el presente proceso.

Un experto en la técnica sabrá cómo determinar las cantidades eficaces de enzimas a utilizar en el proceso actual y cómo ajustar las condiciones para la actividad enzimática óptima. Un experto en la técnica sabrá también cómo optimizar las clases de actividades de las enzimas necesarias para obtener óptima sacarificación de un determinado producto de pretratamiento bajo las condiciones seleccionadas. Preferiblemente, la sacarificación se lleva a cabo en o cerca del pH y la temperatura óptima para las enzimas de sacarificación que se utilizan. El pH óptimo puede oscilar entre unos 4 y alrededor de 10 y suele ser más general entre unos 4,5 y alrededor de 6. La temperatura óptima oscila entre unos 20° C a alrededor de 80° C y está más generalmente entre unos 25° C y unos 60° C.

Según la sacarificación procede, se producen azúcares solubles a partir de la celulosa y/o hemicelulosa en la biomasa, produciendo así la licuefacción de los componentes no solubles de la papilla de la biomasa. La biomasa en la papilla se vuelve parcialmente hidrolizada. La papilla se vuelve menos viscosa, permitiendo que biomasa adicional sea agregada a la papilla, mientras que se mantiene la capacidad de mezcla de la papilla con el agitador vertical en el reactor. Biomasa adicional puede añadirse a la papilla en una cantidad inferior a la que aumentaría la resistencia a

la tracción de la papilla a > 30 Pa, para permitir el mezclado a fondo con un sistema económico de agitador vertical. La porción adicional de biomasa agrega más sólidos y por lo tanto aumenta el porcentaje de sólidos totales cargados en la papilla de sacarificación. Según se agrega biomasa adicional, el pH y la temperatura son controlados dentro de los rangos preferidos durante la mezcla y la reacción de sacarificación continua. La mezcla completa de la papilla permite el control del pH en un intervalo estrecho según se agrega más biomasa y se agregan ácido o base para realizar ajustes de pH. El control del pH ajustado permite en el presente proceso mejorar la sacarificación mediante la mejora de la función de las enzimas de sacarificación. La mezcla completa de la papilla permite el control de la temperatura del contenido del reactor en un intervalo estrecho según se agrega más biomasa, lo que también mejora la función de las enzimas de sacarificación. Fuentes de calor o enfriamiento que pueden ser usadas son bien conocidas para un experto en la técnica, y pueden incluir una camisa sobre el reactor, espirales internas en el reactor, o un intercambiador de calor a través del cual se bombea el contenido del reactor. El control de temperatura ajustado llevado a cabo en el presente proceso mejora la sacarificación, permitiendo que la sacarificación se realice a la temperatura más alta posible sin sobrepasar la temperatura del reactor que inactiva térmicamente las enzimas.

Porciones adicionales de un consorcio de enzimas de sacarificación opcionalmente pueden añadirse después de uno o más nuevas cargas de biomasa. Cada porción agregada de un consorcio de enzimas de sacarificación puede incluir las mismas enzimas que las enzimas de sacarificación del consorcio inicialmente añadidas, o puede incluir una mezcla de diferentes de enzimas. Por ejemplo, el primer consorcio de enzimas de sacarificación añadido puede incluir sólo o principalmente celulasas, mientras que un consorcio de enzimas de sacarificación añadido más tarde puede incluir sólo o principalmente hemicelulasas. Puede usarse cualquier régimen de carga de consorcio de enzimas de sacarificación, como se determinara que es mejor para sacarificar la biomasa específica en el reactor. Un experto en la materia puede determinar fácilmente un régimen de carga de consorcio de enzimas de sacarificación útil tal como se describe en el ejemplo 10 en este documento.

La licuefacción de la biomasa sucede por la sacarificación adicional, así nuevamente se reduce la viscosidad de la papilla de biomasa y la resistencia a la tracción de la biomasa, si está presente y permite la adición de más biomasa conservando la capacidad de mezcla. Por lo tanto la biomasa adicional puede agregarse siguiendo un sistema de alimentación por lotes, mientras que se mantenga la agitación por el agitador vertical. La alimentación de biomasa adicional puede ser semicontinua, permitiendo períodos de licuefacción entre las adiciones. Alternativamente, la alimentación de biomasa puede ser continua a una tasa que es lo suficientemente lenta como para equilibrar la licuefacción continua que ocurre durante la sacarificación. En cualquier caso, la capacidad de mezcla de la papilla se monitoriza y la adición de biomasa se controla para mantener la mezcla completa según lo determinado por el sistema de agitador para superar la resistencia a la tracción de la papilla.

En el presente proceso, también reiteradamente se reduce el tamaño de partícula de la biomasa no soluble. La reducción de tamaño de partícula se demostró aquí que reduce significativamente el tiempo de reacción y aumenta el rendimiento. Alguna reducción en el tamaño de las partículas se produce durante la agitación y sacarificación descrita en este documento en los ejemplos 2 y 3. La reducción del tamaño de partícula se aumenta en el presente documento por múltiples aplicaciones de fuerza mecánica con este objetivo. El mecanismo de reducción del tamaño de partícula mecánico es una mezcladora, molino, cizalla, picador, dispersor de cizalla o dispersor. El tamaño de partícula puede reducirse antes de la producción inicial de una papilla de sacarificación, antes de la adición de la biomasa pretratada a una papilla de sacarificación existente, y/o durante la sacarificación de una papilla. Por ejemplo una hoja para picar o un dispersor de velocidad alta puede estar inmerso en la papilla de sacarificación para reducir el tamaño de partícula. También puede reducirse el tamaño de la biomasa pretratada entrante pasándola por un molino o refinador de disco. En una realización, un bucle de reciclaje con un molino incorporado en línea se adjunta al reactor de la biomasa de tal forma que las partículas se reducen en tamaño según la papilla entra en el bucle, pasa por el molino y luego reentra en el reactor. En cualquiera de estos casos, la capacidad de mezcla de la papilla puede ser monitorizada para optimizar la reducción de tamaño de partícula para la máxima incorporación de peso seco de la biomasa y máxima producción de azúcares en el hidrolizado resultante.

El bucle de reciclar con el molino en línea también puede incorporar un punto de control de temperatura, tal como mediante la inclusión de un intercambiador de calor en línea. El control de la temperatura de la papilla de biomasa que reingresa en el reactor desde el bucle de reciclado proporciona el control de la temperatura de la papilla de sacarificación mediante la mezcla completa por el agitador vertical. De la misma manera, el control de la temperatura de la biomasa añadida en el sistema de alimentación por lotes proporciona un medio de control de la temperatura de la papilla de sacarificación. La temperatura es controlada para proporcionar una temperatura necesaria para una óptima actividad de las enzimas de sacarificación como se señaló anteriormente.

En el presente proceso mediante un sistema alimentado por lotes, se agrega la biomasa hasta que se alcanza una carga de peso seco de la biomasa de por lo menos por encima de un 30%.

El porcentaje de carga de peso seco de biomasa se da como la cantidad de peso seco de biomasa agregada al reactor respecto al peso total de la composición de reacción, o hidrolizado, en el reactor al final de la carga. Una carga de alimentación por lote puede durar desde alrededor de 12 horas a 7 días. Una ejecución de 72 horas es particularmente adecuada. En una realización las adiciones de biomasa se producen periódicamente durante las primeras 12 a 24 horas. La biomasa se agrega al menos dos veces en el presente proceso. En una realización la biomasa se agrega más de tres veces para llegar a un peso en seco de carga de biomasa del 30%. La biomasa

puede añadirse hasta justo por debajo del punto donde la papilla de sacarificación tendría una resistencia a la tracción por encima de unos 30 Pa, tal que el sistema agitador no lo superaría para alcanzar la capacidad de mezcla.

- 5 Los solicitantes han encontrado sorprendentemente que a través de la combinación de varias reducciones de tamaño y múltiples adiciones de biomasa mediante el presente proceso, la sacarificación de un peso seco de concentración de biomasa de más del 30% puede lograrse manteniendo la capacidad de mezcla de la papilla en un sistema de tanque de agitación vertical.

- 10 En una realización, se logró un peso seco de concentración de biomasa de alrededor del 38%. Debido a la alta licuefacción de la biomasa de tamaño de partícula reducida en el presente proceso, se alcanza el contenido de sólidos de alta biomasa mientras que se mantiene una resistencia a la tracción de menos de 30 Pa lo que permite la mezcla completa utilizando el reactor de agitación vertical. Los solicitantes han encontrado sorprendentemente que se alcanzan rendimientos de azúcar grandes con la sacarificación de esta biomasa de contenido de sólidos alto usando este proceso que incluye agitación, reducción del tamaño, mantenimiento del pH y la temperatura e, inclusión de biomasa adicional con el tiempo.

- 15 El uso del sistema de tanque de agitador vertical con reducción de tamaño requiere mucho menos energía que un sistema rotatorio horizontal y el costo de capital es significativamente menor permitiendo por tanto realizar la producción de azúcares a partir de alto peso seco de la biomasa en un sistema de reactor económico mientras se producen altos rendimientos de azúcares solubles, comparables a rendimientos utilizando una sacarificación de sólidos de porcentaje inferior. El alto rendimiento de azúcares solubles no se ha demostrado en el sistema de reactor horizontal. Producir azúcares a partir de un elevado peso seco de biomasa permite la producción de un hidrolizado que contiene una alta concentración de azúcares. La concentración de azúcares en el hidrolizado producido en el presente proceso es por lo menos de unos 100 g/l de azúcares solubles totales, incluso superiores a 80 g/l lo que normalmente se considera como una alta concentración de azúcares. Concentraciones de azúcares de 150 g/l, o de 200 g/l y aún mayores, tales como 240 g/l pueden obtenerse. Los rendimientos de glucosa son mayores de 25 alrededor del 80%, mientras que puede lograrse hasta un 90% e incluso 95% o superior. La concentración de glucosa en el hidrolizado es al menos de unos 90 gramos por litro, mientras que concentraciones de 100 g/l, o mayores, tal como unos 140 g/l, pueden lograrse. Juntos, el producto hidrolizado de concentración de azúcares alto y el sistema de producción de bajo costo que requiere bajo consumo de energía hacen que el actual proceso pueda ser económicamente utilizado como parte de un proceso para hacer combustibles valiosos y otros productos químicos.

Alternativamente para proporcionar un producto hidrolizado completamente sacarificado, la sacarificación puede ejecutarse hasta que se cumpla el objetivo final de porcentaje de sólidos y, a continuación, la biomasa sacarificada pueden ser transferida a un proceso de fermentación donde continúa la sacarificación junto con la fermentación (llamado SSF: sacarificación y fermentación simultánea.)

- 35 Los azúcares fermentables producidos en el presente proceso pueden ser fermentados por microorganismos adecuados que naturalmente o mediante la manipulación genética son capaces de producir grandes cantidades de productos químicos diana deseados. Los productos químicos diana que pueden ser producidos por fermentación incluyen, por ejemplo, ácidos, alcoholes, alcanos, alquenos, aromáticos, aldehídos, cetonas, biopolímeros, proteínas péptidos, aminoácidos, vitaminas, antibióticos y productos farmacéuticos. Los alcoholes incluyen, pero no se limitan a metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, etilenglicol, propanodiol, butanodiol, glicerol, eritritol, xilitol y sorbitol. Los ácidos pueden incluir ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, ácido 3-hidroxi propiónico, ácido butírico, ácido glucónico, ácido itacónico, ácido cítrico, ácido succínico y ácido levulínico. Los aminoácidos pueden incluir ácido glutámico, ácido aspártico, metionina, lisina, glicina, arginina, treonina, fenilalanina y tirosina. Productos químicos diana adicionales incluyen metano, etileno, acetona y enzimas industriales.

- 45 La fermentación de azúcares a productos químicos diana podrá realizarse por uno o más biocatalizadores adecuados en fermentaciones únicas o de multietapa. Los biocatalizadores pueden ser microorganismos seleccionados a partir de bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Los biocatalizadores pueden ser microorganismos de tipo silvestre o microorganismos recombinantes y pueden incluir *Escherichia*, *Zymomonas*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Clostridium*. Normalmente, los biocatalizadores pueden ser *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clostridia thermocellum*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* y *Pichia stipitis* recombinantes.

- 50 Han sido descritos muchos biocatalizadores utilizados en fermentación para producir productos químicos diana y otros pueden ser descubiertos producidos por mutación o vía ingeniería recombinante. Cualquier biocatalizador que use azúcares fermentables producidos en el presente método pueden utilizarse para hacer el (los) producto(s) químico(s) diana que se sabe que se producen por fermentación.

Particularmente de interés son los biocatalizadores que producen biocombustibles como etanol y butanol. Por ejemplo, la fermentación de hidratos de carbono a acetona, butanol y etanol (fermentación ABE) mediante *Clostridia solvntogénica* es bien conocida (Jones y Woods (1986) Microbiol Rev. 50:484-524). En el documento de patente de los Estados Unidos 5192673 se describe un proceso de fermentación para producir altos niveles de butanol, también

produce acetona y etanol, utilizando una cepa mutante de *Clostridium acetobutylicum*. El uso de una cepa mutante de *Clostridium beijerinckii* para producir altos niveles de butanol, produciendo también acetona y etanol, se describe en el documento de patente de los Estados Unidos 6358717. Las solicitudes en propiedad y en tramitación con los presentes documentos de patentes internacionales WO2007/041269 y WO 2007/050671 divulgan la producción de 1-butanol e isobutanol, respectivamente, en hospedantes microbianos de ingeniería genética. Las solicitudes en propiedad y en tramitación con los presentes documentos de patentes de los Estados Unidos 2007/0259410 y 2007/0292927 divulgan la producción de 2-butanol en hospedantes microbianos de ingeniería genética. Isobutanol, 1-butanol o 2-butanol pueden ser producidos por fermentación del hidrolizado producido mediante el proceso actual por un hospedante microbiano que sigue los métodos descritos.

Cepas modificadas genéticamente de *E. coli* también han sido utilizadas como biocatalizadores para la producción de etanol (Underwood et al., (2002) Appl. Environ. Microbiol. 68:6263-6272). Una cepa genéticamente modificada de *Zymomonas mobilis* que ha mejorado la producción de etanol se describe en el documento de patente de los Estados Unidos US 2003/0162271 A1. Una posterior cepa de ingeniería de *Zymomonas mobilis* productora de etanol y su utilización para la producción de etanol se describe en las solicitudes en propiedad y en tramitación con los presentes documentos de patentes de los Estados Unidos 60/847813 y 2008/0187973 respectivamente. El etanol puede ser producido por la fermentación del hidrolizado producido mediante el proceso actual por *Zymomonas mobilis* siguiendo los métodos divulgados. En el ejemplo 13 de esta solicitud, el proceso presente se utiliza para la sacarificación de biomasa de mazorca de maíz pretratada a azúcares fermentables, seguida de la fermentación de los azúcares para la producción de etanol usando *Z. mobilis* como el biocatalizador

El presente proceso también puede utilizarse en la producción de 1,3-propanotriol a partir de biomasa. Se han utilizado las cepas de *E. coli* recombinantes como biocatalizadores en la fermentación para producir 1,3 propanodiol (documentos de patente de los Estados Unidos US 6013494, U.S. 6514733). El hidrolizado producido por sacarificación mediante el presente proceso puede fermentarse por *E. coli* para producir 1, 3-propanodiol como se describe en el ejemplo 10 de la solicitud en propiedad y en tramitación con los presentes documentos de patente de los Estados Unidos 2007/0031919.

El ácido láctico ha sido producido en fermentaciones por cepas recombinantes de *E. coli* (Zhou et al., Appl. Environ. Microbiol. (2003) 69:399-407), cepas naturales de *Bacillus* (documento de patente de los Estados Unidos US20050250192), y *Rhizopus oryzae* (Tay y Yang Biotechnol. Bioeng. (2002) 80:1-12). Cepas recombinantes de *E. coli* se han utilizado como biocatalizadores en fermentación para producir 1,3 propanodiol (documentos de patente de los Estados Unidos U.S. 6013494, US 6514733), y ácido adípico (Niu et al., Biotechnol. Prog. (2002) 18:201-211). El ácido acético se ha producido por fermentación utilizando *Clostridia* recombinante (Cheryan et al., Adv. Appl. Microbiol. (1997) 43:1-33) y recientemente cepas de levadura identificadas (Freer World J. Microbiol. Biotechnol. (2002) 18:271-275). La producción del ácido succínico por *Escherichia coli* recombinante y otras bacterias es divulgada en el documento de patente de los Estados Unidos US 6159738 y por *E. coli* mutante recombinante en Lin et al., Metab. Eng. (2005) 7:116-127). El ácido pirúvico ha sido producido por la levadura mutante *Torulopsis glabrata* (Li et al., Appl. Microbiol. Technol. (2001) 55:680-685) y de *E. coli* mutante (Yokota et al, Biosci Biotech. Biochem. (1994) 58:2164-2167). Cepas recombinantes de *E. coli* se han utilizado como biocatalizadores para la producción de ácido para-hidroxicinámico (documento de patente de Estados Unidos US20030170834) y ácido quínico (documento de patente de los Estados Unidos US20060003429).

Un mutante de *Propionibacterium acidipropionici* ha sido utilizado en fermentación para producir ácido propiónico (Suwannakham y Yang Biotechnol Bioeng. (2005) 91:325-337), y ácido butírico ha sido producido por *Clostridium tyrobutyricum* (Wu y Yang Biotechnol. Bioeng. (2003) 82:93-102). Propionato y propanol han sido producidos por fermentación de treonina por *Clostridium* sp. cepa 17cr1 (Janssen Arch. Microbiol. (2004) 182:482-486). Una levadura como *Aureobasidium pululans* ha sido utilizada para hacer ácido glucónico (Anantassiadis et al., Biotechnol Bioeng. (2005). 91:494-501), por un mutante de *Aspergillus niger* (Singh et al., Indian J. Exp. Biol (2001) 39:1136-43). Ácido 5-ceto-D-glucónico fue producido por un mutante de *Gluconobacter oxydans* (Elfari et al, Appl Microbiol. Biotech. (2005) 66:668-674), ácido itacónico se produjo por mutantes de *Aspergillus terreus* (Reddy y Singh Bioresour. Technol. (2002) 85:6971), ácido cítrico fue producido por una cepa mutante de *Aspergillus niger* (Ikram-UI-Haq et al., Bioresour. Technol. (2005) 96:645-648), y xilitol fue producido por *Candida guilliermondii* FTI 20037 (Mussatto y Roberto J. Appl. Microbiol. (2003) 95:331-337). Biopoliésteres que contienen 4-hidroxivalerato, que también contienen cantidades significativas de ácido 3-hidroxivalérico y ácido 3-hidroxibutírico fueron producidos por *Pseudomonas putida* y *Ralstonia eutropha* recombinantes (Gorenflo et al, Biomacromolecules. (2001) 2:45-57). L-2, 3-butanodiol fue producido con *E. coli* recombinante (Ui et al., Lett. Appl. Microbiol. (2004) 39:533-537).

La producción de aminoácidos por fermentación se ha realizado utilizando cepas auxotróficas y cepas resistentes a análogos de aminoácidos de *Corynebacterium*, *Brevibacterium* y *Serratia*. Por ejemplo, producción de histidina utilizando una cepa resistente a un análogo de histidina se describe en el documento de la publicación de la patente japonesa N°. 56008596 y utilizando una cepa recombinante se describe en el documento de patente europea EP 136359. Producción de triptófano utilizando una cepa resistente a un análogo de triptófano se describe en la publicación de los documentos de patente japonesa Nos. 47004505 y 51019037. Producción de isoleucina utilizando una cepa resistente a un análogo de isoleucina se describe en la publicación de los documentos de patente japonesa Nos. 47038995, 51006237 y 54032070. Producción de fenilalanina utilizando una cepa resistente a un

análogo de fenilalanina se describe en la publicación del documento de patente japonesa N° 56010035. Se ha descrito la producción de tirosina mediante una cepa que requiere fenilalanina para el crecimiento, resistente a tirosina (Agr. Chern. Soc Japón 50 (1) R79-R87 (1976), o una cepa recombinante (documentos de patente europea EP263515, EP332234) y la producción de arginina utilizando una cepa resistente a un análogo de L-arginina (Agr. Biol. Chem. (1972) 36:1675-1684, documentos de publicación de las patentes japonesa Nos. 54037235 y 57150381). Fenilalanina también fue producida por la fermentación de cepas de *Eschericia coli* ATCC 31882, 31883 y 31884. Producción de ácido glutámico en una bacteria coryneforme recombinante se describe en el documento de patente de los Estados Unidos US 6962805. La producción de treonina por una cepa mutante de *E. coli* se describe en Okamoto y Ikeda J. Biosci. Bioeng. (2000) 89:87-79. Metionina fue producida por una cepa mutante de *Corynebacterium ilium* (Kumar et al, Bioresour Technol., (2005) 96: 287-294).

También se han producido péptidos, enzimas y otras proteínas útiles por biocatalizadores (por ejemplo, en los documentos de patente de los Estados Unidos US6861237, US6777207 y US6228630).

Productos químicos diana producidos por fermentación mediante biocatalizadores pueden recuperarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Los productos pueden ser separados de los otros componentes de fermentación por centrifugación, filtración, microfiltración y nanofiltración. Los productos pueden extraerse por intercambio iónico, extracción con disolvente o electrodiálisis. Pueden usarse agentes floculantes para ayudar en la separación de producto. Como un ejemplo concreto, 1-butanol bioproducido puede ser aislado en el medio de fermentación mediante métodos conocidos en la técnica por fermentaciones de ABE (véase por ejemplo, *Durre, Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1998) 49:639-648, Groot et al, *Process. Biochem.* (1992) 27:61-75 y las referencias en él). Por ejemplo, los sólidos pueden ser extraídos del medio de fermentación por centrifugación, filtración, decantación o similares. Después, el 1-butanol puede ser aislado en el medio de fermentación mediante métodos como destilación, destilación azeotrópica, extracción líquido-líquido, adsorción, extracción por corriente de gas, evaporación de membrana o preevaporación. Purificación de 1,3-propanodiol desde los medios de fermentación puede lograrse, por ejemplo, sometiendo la mezcla de reacción a extracción con un solvente orgánico, destilación, y cromatografía de columna (documento de patente de los Estados Unidos 5.356.812). Un disolvente orgánico especialmente bueno para este proceso es ciclohexano (documento de patente de los Estados Unidos, US 5008473). Aminoácidos pueden recogerse del medio de fermentación por métodos tales como la adsorción en resina de intercambio iónico y/o cristalización.

Ejemplos

Métodos generales y materiales

Se utilizan las siguientes abreviaturas:

"HPLC" es cromatografía líquida de alta rendimiento, "C" es centígrado, "kPa" es kiloPascal, "m" es metro, "mm" milímetro, ".kW" es kilovatio, "µm" es micrómetro, "µl" es microlitro, "l" es litro, "min" es minuto "mM" es milimolar, "cm" centímetro, "g" es gramo, "kg" es kilogramo, "p" es peso, "h" es hora, "temp." o "T" es temperatura, "teor." es teórico, "pret" es pretratamiento, "DWB" es el peso seco de la biomasa, "ASME" es "American Society of Mechanical Engineers", "ss" es acero inoxidable, "en" o "in" es pulgada, "PSD" es la distribución del tamaño de partícula, "d-50" es el diámetro de la partícula tal que el 50% del volumen acumulado de las partículas está por debajo de este tamaño, "d-95" se refiere a un diámetro de partícula tal que el 95% del volumen acumulado de las partículas está por debajo de este tamaño, "rpm" es revoluciones por minuto.

Ácido sulfúrico, hidróxido de amonio, ácido acético, acetamida, extracto de levadura, glucosa, xilosa, sorbitol, MgSO₄ 7 H₂O, ácido fosfórico y ácido cítrico se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Medición de la celulosa y hemicelulosa en la biomasa

La composición de la biomasa se mide por cualquiera de los métodos estándar bien conocidos en la técnica, tales como ASTM E1758-01 "Método estándar para la determinación de carbohidratos por HPLC".

Medida del contenido de azúcares, acetamida, ácido acético y ácido láctico.

Los azúcares solubles (glucosa, celobiosa, xilosa, xilobiosa, galactosa, arabinosa y manosa), acetamida, ácido acético y ácido láctico en las aguas de sacarificación se midieron por HPLC (Agilent modelo 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) usando las columnas Bio-Rad HPX-87P y Bio-Rad HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) con columnas de guarda apropiadas.

Los monosacáridos se midieron directamente en el hidrolizado. El material insoluble se separó del hidrolizado por centrifugación. El pH del líquido separado fue ajustado, si fue necesario a 5-6 mediante la columna de Bio-Rad HPX-87P y a 1-3 mediante la columna de Bio-Rad HPX-87 H, con ácido sulfúrico. El líquido separado fue diluido, si fue necesario, luego filtrado pasándole a través de un filtro de jeringa de 0,2µm directamente en un vial de HPLC.

Para el análisis de los azúcares disueltos totales, 10 ml de muestra diluida fue colocada en un vial de presión y se agregó 349 µl de H₂SO₄ al 75%. El vial fue encapsulado y colocado en la autoclave durante una hora para hidrolizar

los azúcares a monosacáridos. Las muestras se enfriaron y su pH fue ajustado por carbonato de sodio al pH necesario, como se describió anteriormente, después las muestras fueron filtradas a los viales de HPLC y analizadas por HPLC.

Las condiciones de ejecución de la HPLC fueron las siguientes:

- 5 Biorad Aminex HPX-87 P (para carbohidratos):
Volumen de inyección: 10-50 µl, dependiendo de los límites de concentración y de detección
Fase móvil: agua grado HPLC, 0.2µm filtrada y desgasificada
Caudal: 0,6 ml/minuto
Temperatura de la columna: 80-85° C, temperatura de la columna de guardia < 60° C
 - 10 Temperatura del detector: tan cercana a la temperatura de la columna principal como sea posible
Detector: índice de refracción
Tiempo de ejecución: recopilación de datos de 35 minutos más 15 minutos después de la ejecución (con ajuste posible para los compuestos que se eluyen más tarde)
Biorad Aminex HPX-87 H (para carbohidratos, acetamida, ácido acético y ácido láctico)
 - 15 Volumen de inyección: 5-10 µl, dependiendo de la concentración y los límites de detección
Fase móvil: 0,01N ácido sulfúrico, 0,2 µm filtrado y desgasificado
Caudal: 0,6 ml/minuto
Temperatura de la columna: 55° C
Temperatura del detector: tan cercana a la temperatura de la columna como sea posible
 - 20 Detector: índice de refracción
Tiempo de ejecución: recopilación de datos de 25-75 minutos
- Después de la ejecución, se determinaron las concentraciones en la muestra a partir de las curvas estándar para cada uno de los compuestos.
- Medición de tamaño de partícula
- 25 Las distribuciones de tamaño de partícula (PSD) de biomasa pretratada y de muestras de hidrolizado se midieron utilizando una o ambas de las técnicas que se describen a continuación, dependiendo del intervalo de tamaño de las partículas. Para partículas gruesas mayores de 2 mm, se utilizó una técnica de tamizado húmedo. Las partículas más pequeñas fueron analizadas por medio de un instrumento Beckman Coulter LS13320.
 - 30 En el tamizado húmedo, toda la muestra fue lavada a través de cuatro tamices seleccionados, apilados en orden con el tamiz más fino en la parte inferior. Los cuatro tamices utilizados en este trabajo tenían aberturas de 2300, 2360, 2800 y 3350 micrómetros. Cada tamiz se colocó en un vaso que contenía sólo suficiente agua para cubrir la malla de alambre y se desalojaron las partículas finas retenidas. El tamiz se sumergió y emergió varias veces, permitiendo que las partículas más finas pasaran a través del tamiz al líquido. Los sólidos retenidos fueron recogidos, secados y tarados. La papilla, que pasó a través de un tamiz único, se vertió en el tamiz siguiente. Este proceso fue repetido
 - 35 para cada tamiz seleccionado.
- El Beckman Coulter LS13320 (Beckman Coulter Inc., Miami FI) es un instrumento que utiliza la técnica de difracción de láser para medir el PSD de materiales mediante un módulo húmedo. El LS13320 puede medir partículas entre 40 nanómetros a 2000 micrómetros. Las muestras se diluyeron con agua de Millipore DI y se sonicaron con sonda ultrasónica durante 10 minutos con un vaso de precipitados de camisa, con circulación de agua fría para mantener las muestras frías mientras que se sonicaban. La papilla diluida se introdujo en el sistema de recirculación del instrumento a una velocidad del 50% de la velocidad de recirculación, hasta llegar al oscurecimiento óptimo. Después de 30 minutos de recirculación para permitir la mezcla completa y el equilibrio, se midió el PSD. Las mediciones se repitieron dos veces para verificar la estabilidad de la suspensión y la reproducibilidad de la medición. El promedio de las dos mediciones estables se estableció como el PSD de la muestra.
- 40
 - 45 Los resultados se registran como d-50, lo que se refiere a un diámetro de partícula donde el 50% del volumen acumulado de las partículas está por debajo de este tamaño. De forma similar, d-95 se refiere al diámetro de partícula donde el 95% del volumen acumulado de las partículas está por debajo de este tamaño.

Medición de la viscosidad

La viscosidad de los hidrolizados se midió en una célula de almidón mediante un Reómetro AR-G2 de TA Instruments (New Castle, DE). La reología de los hidrolizados no puede medirse en un cilindro concéntrico regular, cono y placa, o incluso viscosímetros de paleta y cilindros. La célula de almidón tiene una geometría de cilindro concéntrico de una taza y hélice. Sin embargo, la hélice es un rotor especial diseñado para mantener las partículas mezcladas y evitar la sedimentación mientras se lleva a cabo la medición. El instrumento está diseñado para aumentar la temperatura en tramos a velocidad constante de cizalladura. Sin embargo, también puede utilizarse para la medición a temperatura constante con el aumento de velocidad de cizalladura, en un intervalo de cizalladura de $0,1$ a 10 s^{-1} con una precisión del 10%. Los datos pueden ser analizados por un aparato modelo Herschel Bulkley, (Bird, RB., et al., Rev. Chem. Eng. (1983) 1:1-70), o se pueden representar en un gráfico a escala lineal, como la velocidad de cizalladura frente a la fuerza de cizalladura. Para los fluidos con ninguna resistencia a la tracción, este gráfico pasa por el origen. Sin embargo, para los fluidos con resistencia a la tracción, el gráfico pasa por un punto donde la velocidad de cizalladura se convierte en cero, mientras que la fuerza de cizalladura tiene un valor positivo, que es considerado como la resistencia a la tracción.

Preparación de mazorcas de maíz pretratadas

Las mazorcas de maíz utilizadas en estas ejecuciones se prepararon en uno de los reactores siguientes, como se describe en la solicitud en propiedad y en tramitación con el presente documento del documento de patente de Estados Unidos US20070031918A1.

Reactor de Jaygo

El reactor de Jaygo es un reactor de 130 litros (aproximadamente de 51 cm de diámetro x 91 cm de longitud), de tipo paleta horizontal (Jaygo Manufacturing, Inc., Mahwah, NJ) fabricado de aleación de Hastelloy® C-22. El reactor está equipado con una camisa de vapor capaz de calentar a 177°C aproximadamente (862 kPa). La inyección directa de vapor también se utiliza para llevar rápidamente la biomasa hasta temperaturas de pretratamiento. Se ajusta la presión de vapor y se controla para mantener la temperatura deseada de pretratamiento.

Reactor de pistola de vapor

El reactor de explosión de vapor de 4 litros (Autoclave Engineers, Erie, PA) es un reactor con camisa de vapor que consta de una tubería de 102 mm de longitud de Hastelloy® de esquadra 80 cerrado por dos válvulas de bola. Calentadores eléctricos adicionales están colocados en todas las superficies del reactor expuestas, que no tiene camisa y están controlados a la temperatura de pretratamiento establecida. Se usa también la inyección directa de vapor para llevar rápidamente la biomasa hasta temperaturas de pretratamiento. Se ajusta la presión de vapor y se controla para mantener la temperatura deseada de pretratamiento. La parte inferior del reactor se corta a 51 mm. Todo el material pretratado sale a través de un troquel que puede reemplazarse en la parte inferior del reactor y se recoge en una bolsa de nylon (Hotfill®) de $0,21 \text{ m}^3$ apoyada en un tanque de evaporación de paredes gruesas enfriado y provisto de camisa.

Reactor de pretratamiento e hidrólisis enzimática (PEHR)

Este reactor es divulgado en la solicitud en propiedad y en tramitación con el presente documento del documento de patente de Estados Unidos US20070029252.

El PEHR de 9 l (construido en NREL, Golden, CO) tiene un recipiente de reacción de aproximadamente $15 \times 51 \text{ cm}$ de acero inoxidable con una lanza de inyección para la introducción de reactivos de procesamiento. La lanza de inyección está conectada mediante una junta rotatoria a un puerto en una cubierta en un extremo del recipiente, que tiene un puerto adicional de acceso al recipiente. Cuatro deflectores están en la longitud de la pared del recipiente y se adjuntan perpendicularmente a la pared. Los deflectores y veintidós cilindros de cerámica de medio de desgaste de $3,2 \text{ cm} \times 3,2 \text{ cm}$ (E.R. Advanced Ceramics, East Palestine, OH) que flotan libremente en el recipiente, proporcionan una mezcla mecánica de biomasa y reactivo cuando el recipiente es girado, lo que promueve la asimilación de reactivo en la biomasa. El reactor de PEH se coloca en un aparato de rodillos de Bellco Cell-Production (Bellco Technology, Vineland, NJ) que proporciona un mecanismo de rotación, y el reactor con aparato de rodillos está alojado en una cámara de temperatura controlada que proporciona calor. Pueden aplicarse vacío y presión al recipiente de reacción mediante la fijación de fuentes externas al puerto conectado a la lanza de la cubierta.

Reactor de pistón de barril grande

Este reactor es divulgado en la solicitud en propiedad y en tramitación con el presente documento del documento de patente de Estados Unidos CL3949.

El reactor de pistón de barril consistía en un barril de acero inoxidable de $5,1 \text{ cm} \times 68,6 \text{ cm}$ equipado con un pistón, orientado horizontalmente. El pistón fue sellado al barril con cuatro juntas tóricas y era presurizado con nitrógeno en la parte trasera del pistón durante el ciclo de descarga. El barril de $68,6 \text{ cm}$ estaba equipado con ocho puertos de

varios usos lo que permitía la aplicación de vacío, inyección de amoníaco acuoso, inyección de vapor y la inserción de termopares para medición de temperatura en el interior del barril. El barril del reactor estaba equipado con una camisa de vapor para la calefacción uniforme del barril. El barril del reactor fue directamente conectado a un tanque de evaporación de 15,2 cm x 61 cm de acero inoxidable, orientado verticalmente. El barril fue aislado del tanque de evaporación por un ensamblaje de boquilla cónica y válvula de asiento final. El diámetro del troquel de corte de la válvula final era 3,5 cm. La contrapresión en el tubo cónico y el asiento era ajustable, con la mayoría de las pruebas realizadas utilizando ~138 kPa (medidor de presión) de presión de retorno en un cilindro de aire de 10,2 cm de diámetro conectado al cono de la válvula de corte final. El cono de la válvula de corte final podía retroceder hasta 1,6 cm para permitir la descarga de las partículas en el evaporador. Un codo a la salida de la válvula de corte final dirigía los sólidos pretratados hacia abajo a la parte inferior del evaporador donde los sólidos se eliminaban fácilmente abriendo una brida final abovedada en la parte inferior del tanque. Una brida abovedada superior al evaporador incorporaba una salida especial de conexión con ranuras mecanizadas perpendicularmente al eje del evaporador, lo que causaba que los vapores liberados recorrieran un camino esquinado a una conexión de salida, lo que ayudaba a prevenir el arrastre de las partículas de biomasa en suspensión y gotitas de agua al condensador de ventilación. Se añadieron tres calentadores eléctricos de banda (fijados a 60° C) y aislamiento a lo largo del evaporador para permitir que los sólidos calientes pretratados se vaporizaran instantáneamente en un recipiente caliente, simulando mejor un proceso de escala comercial.

Equipo de sacarificación

Se realizaron experimentos de sacarificación en tres tipos de sistemas.

Un sistema fue el reactor de pretratamiento e hidrólisis enzimática (PEHR) que se describe anteriormente y se conoce como "botella de rodillos". Una variante alternativa de un sistema de botella de rodillos fue una botella de rodillos de cerámica con un volumen de 1,3 galones (US Stoneware, East Palestine, Ohio). Los medios de desgaste y sistemas de rodillos y calefacción fueron idénticos a los descritos para el PEHR anteriormente. Los experimentos en la botella de rodillos se realizaron siempre en modo de lote.

El segundo sistema consistió en reactores de tanque agitados, en donde los experimentos fueron realizados en modo de lotes o alimentación por lotes. El sistema consistía en un recipiente de reacción cilíndrico de cristal con camisa, bien de 500 ml o de 2000 ml (LabGlass número LG-8079C, LabGlass, Vineland, NJ), equipado con una tapa de recipiente de reactor de cuatro cuellos (LG-8073). Se montó un agitador a través del puerto central para agitar el contenido del reactor. Un condensador de vidrio fue conectado a uno de los cuellos y se mantuvo refrigerado a 5° C, por recirculación de agua de un refrigerador. Los otros dos puertos fueron utilizados para la carga de reactivos y para mediciones de temperatura y pH. La temperatura del reactor se controló por recirculación de agua caliente, suministrada por un baño de agua caliente circulante. Se usó un agitador de ancla revestido de Teflon® en el reactor de 2000 ml y un agitador de vidrio de cuatro-palas con palas en ángulo de 45 grados fue usado en el reactor de 500 ml.

El tercer sistema consistió en un reactor de fermentación de B. Braun Biotech International tipo 10 K de 15 litros, que fue utilizado como reactor de sacarificación. Estaba controlado por un BioStat ED DCU (unidad de control de datos) y un módulo de control asociado que contenía; bomba de circulación, bombas de ácido y base, válvulas solenoides, intercambiadores de calor para control de temperatura, abastecimiento de vapor, agua del proceso, válvulas de control del suministro de aire, válvulas de control de la filtración y la presión de retorno y filtros de escape. El reactor estaba equipado con dos turbinas Lightnin A310 de alta eficiencia de tres hojas de 4,5 pulgadas (11,4 cm) de diámetro. La turbina de la parte inferior estaba situada a 3 pulgadas (7,6 cm) de la parte inferior del reactor y la turbina superior estaba situada a 9 pulgadas (22,9 cm) de la parte inferior del reactor. El recipiente tenía un diámetro de 7,5 pulgadas (19,1 cm) y una altura máxima de 22 pulgadas (55,9 cm). Se utilizaron cuatro deflectores extraíbles en las ejecuciones de sacarificación por lotes de alimentación, cada uno de los cuales tenía un ancho de 5/8 pulgadas (1,6 cm) y una longitud de 19 pulgadas (48,3 cm) (desde la parte inferior del reactor hasta dentro de unas 3 pulgadas (7,6 cm) de la parte superior). Existe un hueco estrecho de aproximadamente 1/8 pulgada (0,3 cm) entre el borde del deflector y la pared del reactor, pero la biomasa normalmente no queda atrapada en este hueco. Al comienzo de la sacarificación por lotes de alimentación, el volumen de la papilla ocupaba alrededor de las 5 pulgadas del fondo (12,7 cm) del reactor, lo que es lo suficientemente profundo para cubrir el puerto lateral cerca del fondo del reactor utilizado en el bucle alrededor de la bomba cuando el bucle está lleno de papilla de sacarificación. Este nivel inicial se situaba entre las dos turbinas. Durante el curso de las adiciones de alimentado, el nivel de papilla eventualmente se elevaba hasta cubrir la turbina superior.

La placa superior del reactor fue modificada para incorporar un ajuste sanitario de 2 pulgadas (5,1 cm) apropiado para la carga de biomasa y carga de enzimas. Además, se instaló una bomba alrededor de bucle asociada en los puertos de abajo y arriba del sistema reactor. La bomba alrededor de bucle fue aislada del recipiente de fermentación con válvulas de bola de puerto completo de 1-1/2 pulgadas (3,8 cm) de Valmicro y SVF con cuerpos de CF8M, bolas de SS 316 y asientos PTFE. Las mangueras flexible de 1-1/2-pulgadas (3,8 cm) que comprenden parte de la bomba alrededor de bucle se construyeron de manguera interior de silicona curada con platino con refuerzo de cable 316 SS y camisa exterior de silicona con una presión de trabajo de 150 psi, un tope de temperatura de 250° C y conexiones sanitarias finales. Se sumergió un indicador de flujo de teflón en la entrada del lóbulo de la bomba a través de los ajustes sanitarios. Se incorporaron marcas en la bomba alrededor de bucle lo que permitió inyección

directa de vapor y drenaje de condensado lo que permitió la esterilización separada de las mangueras de la bomba alrededor de bucle, bomba de lóbulo APV, tubo indicador de teflón, válvulas de bola y válvulas V de los puertos. Todos los componentes de la bomba alrededor de bucle fueron limpiados y esterilizados por separado antes del montaje aséptico en el bucle. En particular, se abrieron parcialmente las válvulas de bola, se limpiaron detrás de los asientos, y luego se esterilizaron con vapor en posición parcialmente abierta en un autoclave antes de montar la bomba alrededor de bucle para minimizar la posibilidad de que material atrapado detrás de los asientos y bolas pudiera permitir que contaminantes sobrevivieran la esterilización e infectaran la fermentación. Después de conectar todos los componentes de la bomba alrededor de bucle, la bomba alrededor de bucle y componentes nuevamente fueron esterilizados con vapor en el sitio de uso una segunda vez.

La bomba alrededor de bucle estaba centrada alrededor de una bomba de lóbulo APV. La bomba de lóbulo APV (modelo M1/028/06) construida de 316 SS fue accionada por un motor Reliance Electric de 3 hp acoplado a la bomba de lóbulo a través de un reductor de velocidad Dodge Master XL. Las rpm del motor de 1755 rpm fueron reducidas por el reductor de velocidad de ángulo recto Dodge con una reducción de marcha 5:1 acoplada a la bomba de lóbulo. El motor de Reliance Electric estaba controlado por un mecanismo de transmisión Reliance SP500 de frecuencia variable. La bomba de lóbulo fue puesta a 85 psig a 960 rpm. Las conexiones de la bomba a la bomba alrededor de bucle externa fueron a través de conexiones sanitarias. La bomba de lóbulo fue esterilizada en el lugar de uso haciendo funcionar los lóbulos lentamente mientras que se exponía la parte interna de la bomba a una presión de vapor de 30 psig. La bomba se hizo funcionar en la dirección hacia adelante lo que permitió bombear cualquier condensado formado en la bomba a la trampa de vapor situada en el extremo de descarga de la tubería de la bomba. Se utilizó un medidor de presión sanitario aislado tipo diafragma para monitorizar la presión de vapor durante la esterilización, así como la presión de la bomba durante los ciclos de bombeo alrededor de la válvula de cizallamiento de puerto V.

La válvula de cizallamiento del puerto V fue incorporada en la bomba alrededor de bucle y se encontraba abajo del flujo de la bomba de lóbulo justo antes de la válvula de bola que aislaba la bomba alrededor de bucle del puerto superior del fermentador. La válvula de bola de control del puerto Triac Controls "V" serie 88 fue encargada con una bola de 1-1/2 pulgadas (3,8 cm) y el cuerpo con una muesca Vee en la bola de 60°. El cuerpo de esta válvula estaba construido de CF8M SS calificado a 1500 psig, con bola de puerto de 316 SS 60° V y asientos de PTFE. Las conexiones de rosca en el cuerpo de la válvula V de puerto estaban conectadas a la bomba alrededor de bucle con tubo de rosca de 1-1/2 pulgadas (3,8 cm) a conectores sanitarios.

Ejemplo 1

Sacarificación de biomasa pretratada con y sin agitación

Se realizaron dos ejecuciones (# 25 y 26) con biomasa molida pretratada a 50° C, pH = 5,5 con una carga de alrededor del 20% de DWB (peso seco de la biomasa). La biomasa utilizada en estas ejecuciones fue una mezcla de tres lotes de mazorcas de maíz pretratadas que fueron reducidas a 1 mm de tamaño. Un solo lote, etiquetado HT-4, se preparó en el reactor de pistola de vapor, descrito anteriormente, tratando las mazorcas de maíz fracturadas con 4 g de NH₃ por cada 100 gramos de peso seco de biomasa y vapor a 145° C durante 20 minutos. Los otros dos lotes se prepararon en el reactor de pistón de barril, descrito anteriormente, al tratar las mazorcas de maíz con 6 g de NH₃ por cada 100 gramos de peso seco de biomasa y vapor a 145° C durante 10 minutos. La mezcla de estos tres lotes de biomasa pretratada fue molida en una licuadora comercial de Waring y cribada a través de una criba de 1,1 mm, antes de utilizarla en los experimentos de sacarificación.

Las ejecuciones se llevaron a cabo en recipientes de reacción de vidrio cilíndricos de 500 ml con camisa. Descritos en los métodos generales. El talón consistió en alrededor de 100 g de agua desionizada; y alrededor de 100 g de un hidrolizado sacarificado de una ejecución anterior, que se agregó para ayudar a incrementar el contenido de sólidos del hidrolizado final. Después de aumentar la temperatura a 50° C, se ajustó el pH a 5,5 y se añadió alrededor de 180 g de la biomasa pretratada molida. Los porcentajes de peso seco de biomasa en los hidrolizados finales fueron 20,97% y 17,83% en las ejecuciones 25 y 26, respectivamente.

Las enzimas que se agregaron a cada reactor fueron Spezyme® CP (Genencor International, Rochester, NY) a 10 mg de proteína/g celulosa y Multifect® Xylanase (Genencor) a 4,1 mg de proteína/g de hemicelulosa. En la ejecución 25, después de la mezcla inicial de ingredientes durante unos 30 minutos el agitador fue 5 detenido, mientras que en la ejecución 26 se mantuvo el agitador funcionando a 500 rpm. El contenido de azúcar del licor de sacarificación resultante se determinó después de 17 horas de sacarificación según el protocolo de medición de azúcar descrito en los métodos generales. La liberación de azúcar después de 17 horas se presenta en la tabla 1.

La ejecución 25 mostró que las enzimas habían sacarificado la celulosa y hemicelulosa incluso sin agitación. Sin embargo, las cantidades de azúcar formadas en la ejecución 26 fueron superiores a las de la ejecución 25, indicando que la tasa de sacarificación fue más rápida en el reactor agitado. La tasa de sacarificación de glucano a glucosa total y a monómero de glucosa fue aproximadamente un 50% más rápida en el reactor agitado que en el reactor sin agitación.

Tabla 1. Formación de varios azúcares a las 17 horas después de la adición de las enzimas

Nº de ejecución	Agitador, rpm	DWB %	Glucosa total g/l	Monómero de glucosa g/l	Xilosa total g/l	Monómero de xilosa g/l
25	0	20,97	30,08	16,03	33,54	9,78
26	500	17,83	43,99	23,69	39,13	9,39

Este ejemplo mostró claramente que un proceso de sacarificación más rápido y más rentable requeriría la agitación continua de sólidos en la mezcla del reactor.

5 Durante la sacarificación, la celulosa y hemicelulosa insolubles fueron convertidas en glucosa, xilosa y sus oligómeros solubles en agua. A medida que progresaba la reacción, la fracción de sólidos insolubles disminuía y la cantidad de líquido aumentaba. Además, la distribución de tamaño de partícula también disminuyó, medido siguiendo los procedimientos de los métodos generales. La mediana del tamaño de partículas (d-50) disminuyó de 614 micrómetros en los piensos a 309 micrómetros en la ejecución 25, mientras que disminuyó a 113 micrómetros en la ejecución 26, confirmando una vez más que la agitación aumentó la tasa de solubilización de los sólidos.

10 Ejemplo 2

Sacarificación de biomasa pretratada de tamaño inicial variable

15 Las ejecuciones 50-52 y 64-65 se realizaron con biomasa pretratada molida hasta diferentes tamaños. La biomasa pretratada se preparó con mazorcas de maíz trituradas que fueron molidas por martillos y cribadas a través de una criba de ½ pulgada. Fueron tratadas en el Reactor de Jaygo, descrito en los métodos generales, con 4 g de NH₃ por cada 100 gramos de peso seco de biomasa y vapor a 145° C durante 20 minutos. Esta biomasa de mazorca de maíz pretratada fue etiquetada Jaygo-10. Antes de la sacarificación, las mazorcas de maíz pretratadas se molieron adicionalmente en varias etapas y se cribaron a través de cribas de tamaño adecuado para preparar la biomasa para cada ejecución de sacarificación. El tamaño de la criba utilizado para la preparación de muestras para cada ejecución se muestra en la tabla 2 a continuación. Las ejecuciones 50 y 51 se llevaron a cabo en reactores de 2 l y las ejecuciones 52, 64 y 65 se llevaron a cabo en reactores de 0,5 l. En todos los casos, se usó agua desionizada como talón de la reacción. Se añadió biomasa pretratada para hacer hidrolizados de alrededor de 12% de DWB en las ejecuciones 50-52 y alrededor de 21% DBW en las ejecuciones 64 y 65. La temperatura se incrementó a 50° C y el pH se ajustó a 5,5 con ácido fosfórico. En las ejecuciones 50-52, se cargó el Spezyme® CP a 40 mg de proteína/g de celulosa y Multifect® Xylanase a 15,6 mg/g de hemicelulosa. En las ejecuciones 64 y 65 se cargó el Spezyme® CP a 35,4 mg de proteína/g de celulosa y Multifect® Xylanase a 14,4 mg/g de hemicelulosa. Los reactores se agitaron continuamente a 300-500 rpm para mantener las partículas suspendidas y bien agitadas. Después de 72 horas, el contenido de azúcar de los licores de sacarificación se midió según el protocolo de medición de azúcar descrito en los métodos generales y los resultados se muestran en la tabla 2 como porcentaje del rendimiento teórico.

30 Hubo una clara relación entre el tamaño de partícula de la biomasa pretratada y el rendimiento de azúcares formados en la sacarificación, como se muestra en la tabla 2, partículas de mazorca de tamaño inicial pequeño produjeron mayores cantidades de azúcares.

Tabla 2. Porcentaje del rendimiento teórico a las 72 horas después de la adición de enzimas

Nº de ejecución	Tamaño de partícula inicial	Monómero de glucosa	Glucosa total	Monómero de xilosa	Xilosa total
50	< 10 mm	38,1	41,4	20,6	35,9
51	< 6,2 mm	58,3	64,6	34,4	60,3
52	< 1,12 mm	78,8	86,2	52,4	76,6
64	< 1,12 mm	80,5	88,8	47,7	84,7
65	< 0,5 mm	77,0	95,7	46,8	90,1
La ejecución 64 es una réplica de la ejecución 52 y muestra la reproducibilidad de las ejecuciones.					

35 La distribución de tamaño de partícula del producto hidrolizado después de 72 horas se determinó para cada ejecución y los resultados se muestran en la tabla 3. Las ejecuciones con menor tamaño de partícula inicial tenían partículas más pequeñas en el hidrolizado del producto. Estos resultados confirmaron que la reducción de tamaño facilita la sacarificación y mostraron que se obtuvieron mayores rendimientos con partículas más finas, de manera que se obtuvieron rendimientos de 90-95% de sacarificación con tamaños finales de partícula de d-95 menor de 75 micrómetros.

Tabla 3. Distribución de tamaño de partícula de los hidrolizados del producto

Nº de ejecución	Tamaño de partícula inicial	Hidrolizado d-50 micrómetros	Hidrolizado d-95 micrómetros
50	< 10 mm	29,7	484
51	< 6,2 mm	116	560
52	< 1,12 mm	17,1	136
64	< 1,12 mm	20,3	158
65	< 0,5 mm	12,9	74,7

Estos experimentos mostraron que la tasa de sacarificación es un fenómeno controlado por la transferencia de masas. Por lo tanto, se puede lograr un alto rendimiento de más del 90% a ritmo rápido si las partículas en el hidrolizado se reducen en tamaño a menos de unos 75 micrómetros.

5 Ejemplo 3

Licuefacción de la biomasa durante la sacarificación enzimática

La ejecución 52, descrita anteriormente, también se utilizó para determinar los cambios en la distribución del tamaño de partícula y la licuefacción de la biomasa a medida que el proceso de sacarificación continuaba. Se midió las distribuciones de tamaño de partícula para la biomasa de mazorca de maíz inicial molida pretratada y para el hidrolizado después de 6 y 72 horas.

Tabla 4. Reducción del tamaño de partícula durante la sacarificación – Ejecución 52

Tiempo de ejecución	Hidrolizado d-50 micrómetros	Hidrolizado d-95 micrómetros
0 horas	177,5	1020,8
6 horas	38,9	163,5
72 horas	17,1	136

Estos resultados indican claramente que la sacarificación enzimática reduce la distribución de tamaño de las partículas sólidas causando así la licuefacción de los sólidos, permitiendo la adición de sólidos adicionales al hidrolizado.

15 Ejemplo 4

Determinación de las limitaciones en la carga de sólidos

La economía de un proceso de lignocelulosa a etanol es favorable cuando hay una gran concentración de azúcares en los hidrolizados de sacarificación para su uso en fermentación. Esto requiere que los sacarificadores operen con altas concentraciones de sólidos. Las ejecuciones 43-45 se llevaron a cabo para determinar las limitaciones operativas de altas carga de sólidos en el reactor de sacarificación.

La ejecución 43 se llevó a cabo en un reactor de 500 ml con mazorcas de maíz pretratadas, molidas y cribadas a través de una criba de 1,12 mm. Las mazorcas molidas se agregaron gradualmente a 200 g del talón de agua en el reactor y se agitaron. A cada velocidad de agitación, comenzando con 100 rpm, se agregó la biomasa para determinar visualmente el punto donde los sólidos de la biomasa se estancaban y dejaban de moverse con la mayor parte del líquido. La adición de alrededor de 13,6% de DWB causó el estancamiento a 100 rpm. El proceso fue continuado a velocidades de agitación más altas de 200, 300 y 500 rpm, llegando al estancamiento a 13,8%, 15,5% y 15,7%, de DWB, respectivamente. Inicialmente, toda la biomasa se dispersó en el agua y se agitó bien con el agitador. A medida que el porcentaje de peso seco de biomasa alcanzó aproximadamente 13,8% a 100 rpm, una porción de los sólidos se separó de la mezcla de agitación y se acumuló en la parte inferior del reactor. Al aumentar la velocidad de rotación, más biomasa pudo ser añadida y mantenida en la mezcla. Sin embargo, a medida que la velocidad de agitación alcanzó 500 rpm, el % de DWB que podía añadirse sin estancamiento alcanzó un tope de aproximadamente 15,7%, como se muestra en la figura 1.

En la ejecución 46, se repitió la prueba de capacidad de carga de la biomasa con partículas que fueron molidas y cribadas a través de la malla de 6,2 milímetros. Los sólidos gruesos mostraron un comportamiento similar a las partículas más finas de la ejecución 43, y comenzaron a separarse de la mezcla de masa y a estancarse en la parte inferior del reactor a medida que el % de DWB aumentaba. Como muestra la figura 1, las partículas gruesas fueron más propensas al estancamiento que las partículas más finas. Tanto para las partículas finas como gruesas, 15,7% de DWB pareció ser el límite de carga de sólidos. Este porcentaje de sólidos es el límite para la geometría del

reactor y turbina utilizados en este experimento, y su valor sería diferente en otros sistemas. Sin embargo, en todas las geometrías y arreglos de turbina debe esperarse que un cierto porcentaje de sólidos sea el factor limitante de la mezcla adecuada.

Este ejemplo muestra que en un modo de operación por lotes, donde toda la carga de biomasa se agrega al principio del lote, hay un límite de alrededor del 16% sobre el porcentaje de peso seco de la biomasa por encima del cual los sólidos empezarán a estancarse. El ejemplo 1 mostró que incluso en una mezcla sin agitación, la sacarificación enzimática puede proceder lentamente, pero a gran escala industrial, no se pueden mezclar fácilmente la biomasa y enzimas para iniciar la sacarificación más lenta. Así, un 16% aproximado de DWB se convierte en el límite para la operación por lotes. Además, en un reactor de tanque grande, si se permitiera que la biomasa se estancara, su resuspensión en la papilla requeriría grandes cantidades de energía.

Ejemplo 5

Control del pH en la sacarificación de alimentación de lote

El ejemplo 4 demostró que en un DWB superior a alrededor del 16%, parte de la biomasa se separaba de la papilla y se estancaba. En ausencia de una agitación adecuada, no puede ajustarse el pH de los sólidos pretratados. Incluso, con papillas difíciles de mezclar las variaciones localizadas en el pH podrían ser perjudiciales para la sacarificación enzimática. Mientras que el intervalo óptimo de pH para cada enzima podría ser diferente, la mayoría de las enzimas de sacarificación tienen un pH óptimo de 5 a 5,5. Las enzimas requieren un control ajustado del pH para funcionar eficazmente.

Se llevaron a cabo las ejecuciones 96-99 para determinar la sensibilidad de las enzimas a las variaciones de pH. Estas ejecuciones fueron realizadas con mazorcas de maíz pretratadas designadas como Jaygo-10, que se prepararon en el Reactor de Jaygo, descrito anteriormente, con 4 g de NH_3 por 100 gramos de peso seco de biomasa y vapor a 145° C durante 20 minutos. Antes de la sacarificación, la biomasa pretratada fue molida adicionalmente en un molino de martillo y cribada a través de una criba de 1,12 mm. Las ejecuciones se realizaron en modo de lote en reactores de 500 ml con % de DWB de 13,1 a 14,5%, por lo tanto la mezcla fue siempre uniforme, como se observó visualmente. Todas las cuatro ejecuciones comenzaron a pH = 5,5 y a 50° C, con una carga de Spezyme® CP de 35,4 mg de celulosa/g y una carga de Multifect® Xylanase de 14,4 mg/g de hemicelulosa. Dos horas después del inicio de cada ejecución, se ajustó el pH a un valor nuevo y se mantuvo durante una hora. El pH de la ejecución 97 se mantuvo a 5,5 pero el pH de las ejecuciones 96, 98 y 99 se ajustó a 4,0, 6,5 y 7,5, respectivamente. Después de una hora, se reajustó después el pH a su valor original de 5,5 y las ejecuciones continuaron durante 48 horas. La tabla 5 muestra los rendimientos de diversos azúcares en 48 horas. Los resultados indicaron claramente que la actividad enzimática fue sensible a las fluctuaciones del pH, con la producción de glucosa y monómero de xilosa siendo las más delicadas.

Tabla 5 Efectos de una hora de cambio del pH en los rendimientos

Nº de ejecución	Cambio del pH	Porcentaje de rendimiento de azúcares			
		Monómero de glucosa	Glucosa total	Monómero de xilosa	xilosa total
96	4,0	49,6	60,3	33,2	62,1
97	5,5	67,8	81,5	41,8	75,5
98	6,5	58,6	69,5	36,4	66,9
99	7,5	43,2	54,0	26,0	64,1

Este ejemplo confirma que es necesario una mezcla adecuada para mantener el pH en el intervalo óptimo para la sacarificación de una carga de hidrolizado con muchos sólidos.

Ejemplo 6

Aumento de la carga de sólidos en la sacarificación de alimentación por lote

La ejecución 43 (descrita en el ejemplo 4), después de alcanzar su nivel crítico de sólidos para la fluidez de 15,7% DWB, se continuó y sacarificó a pH 5,5 y 50° C, con una carga de Spezyme® CP de 35,4 mg/g de celulosa y una carga de Multifect® Xylanase de 14,4 mg/g de hemicelulosa. Como se muestra en la figura 2, en dos horas la mezcla se convirtió en líquido nuevamente y todos los sólidos comenzaron a agitarse en el reactor. Se añadió más biomasa de mazorca de maíz pretratada molida de tamaño < 1,12 mm al contenido del reactor, lo que aumentó el % total de DWB en el reactor a alrededor del 19% antes de que los sólidos se separaran de nuevo. Los sólidos en el contenido del reactor estaban basados en el % de material agregado como sólidos en el volumen final del contenido del reactor. Después de 18 horas, el contenido del reactor estaba agitándose nuevamente y se añadió más biomasa de mazorca de maíz de tamaño < 1,12 mm para llevar la concentración de sólidos total a 23,7%, mientras que el

contenido del reactor se mantenía en un estado de agitación. De esta manera fue posible durante la sacarificación enzimática alimentar biomasa de mazorca de maíz molida y pretratada en un modo de semi-lote o de alimentación por lotes para alcanzar un mayor nivel de sólidos en la reacción de sacarificación.

La ejecución 44 se realizó utilizando condiciones idénticas a las de la ejecución 43, salvo que las cargas de enzimas fueron 10 veces más bajas que en la ejecución 43. Como se muestra en la figura 2, de nuevo la sacarificación enzimática condujo a la licuefacción de los sólidos, permitiendo añadirse más en el modo de alimentación por lotes al contenido del reactor manteniendo el estado de agitación. Sin embargo, a menor carga de enzima, la tasa de licuefacción fue más lenta, por lo tanto la tasa de adición de sólidos fue también más lenta, de manera que con 0,1 veces de carga de enzima se tardó 48 horas hasta poder cargar los sólidos para aumentar el porcentaje de sólidos al 24% manteniendo un estado agitado de los contenidos del reactor.

Este ejemplo indica claramente que la sacarificación enzimática, combinada con la mezcla adecuada y el proceso de alimentación por lotes permite que se alcancen concentraciones grandes de biomasa (% DWB) en el sacarificador, mientras que se mantiene a todos los sólidos en un estado de agitación.

Ejemplo 7

Viscosidad y resistencia a la tracción en hidrolizados de mucha cantidad de sólidos en la biomasa

El hidrolizado es una mezcla no newtoniana y su viscosidad cambia con la carga de biomasa, alcance de la sacarificación, la fuerza de cizalladura aplicada, así como la temperatura. Las ejecuciones 149-152 se llevaron a cabo con distintos niveles de % de DWB y las muestras se recogieron en diferentes momentos para medir las características reológicas de los hidrolizados. Estas ejecuciones se llevaron a cabo en el reactor de 2 litros con mazorcas de maíz pretratadas. Las mazorcas de maíz fracturadas fueron pretratadas en el Reactor de Jaygo, descrito anteriormente, con 6 g de NH_3 por cada 100 gramos de peso seco de biomasa y vapor a 145°C durante 20 minutos, y la muestra fue designada como Jaygo-9. Las mazorcas pretratadas fueron molidas adicionalmente a menos de 1,12 mm de tamaño antes de ser utilizadas en el sacarificador. Las sacarificaciones se realizaron a 50°C y $\text{pH} = 5,5$, con una carga de Spezyme® CP de 35 mg de proteína/g de celulosa y una carga de Multifect® Xylanase de 15 mg de proteína/g de hemicelulosa.

La viscosidad se midió con el cambio de velocidad de cizalladura como se describió en los métodos generales en muestras de hidrolizado tomadas 30 horas después de la adición de las enzimas para biomasa de 22%, 26% y 30% de peso seco, y a las 24 horas para la muestra de 26%. Los datos mostrados en la figura 3 indican claramente que los hidrolizados son fluidos no newtonianos que muestran disminución de la viscosidad con mayor fuerza de cizalladura. La figura 3 también muestra que la viscosidad depende fuertemente del % de DWB en el hidrolizado, variando por dos órdenes de magnitud cuando el % de DWB se aumentó del 22% al 30%.

En la muestra de 26% de sólidos, la viscosidad se midió con el cambio de velocidad de cizalladura en muestras de hidrolizado tomadas a 6, 24, 48 y 72 horas después de la adición de las enzimas. Los resultados dados en la figura 4 muestran el efecto del tiempo o alcance de la sacarificación en la viscosidad. El hidrolizado con 26% de sólidos tuvo una viscosidad muy alta incluso 6 horas después de la sacarificación y su viscosidad disminuyó continuamente con el tiempo a medida que las enzimas sacarificaron la celulosa y hemicelulosa y disminuyeron el volumen de los sólidos no disueltos en el hidrolizado.

Análisis adicionales de estos datos mediante un modelo Herschel Bulkley muestran que un hidrolizado con 26% de sólidos tiene resistencia a la tracción durante las primeras 24 horas de sacarificación. La tabla 6 muestra los parámetros del modelo Herschel Bulkley y específicamente la resistencia a la tracción indicada por σ_{HB} .

Experimentalmente, se observa la resistencia a la tracción por el estancamiento de los contenidos del reactor específicamente cerca de las paredes.

Tabla 6 - Parámetros de Herschel Bulkley para hidrolizados de 26 % de DWB $\sigma = \sigma_{\text{HB}} + K_{\text{HB}} \dot{\gamma}^q$

Muestra	Sólidos	Tiempo de reacción	σ_{HB} (Pa)	K_{HB} (pa)	q (-)
152-1	26%	6 horas	3,4	1,17	0,066
152-2	26%	24 horas	0,52	1,02	0,260
152-4	26%	48 horas	0,0	0,687	0,248
152-6	26%	72 horas	0,0	0,425	0,256

Ejemplo 8Sacarificación de biomasa con mucha carga de sólidos

La ejecución 63, se llevó a cabo para demostrar la sacarificación en una concentración mucho mayor de biomasa que actualmente se concibe como un proceso económico. Las mazorcas de maíz pretratadas designadas como Jaygo-10 como se recibieron, como se describe en el ejemplo 2 anterior, contenían aproximadamente 36% de DWB. Después del molido hasta tamaño de 1,12 mm, fueron secadas al aire para reducir su contenido de humedad a menos del 11%. Este material fue sacarificado en modo alimentación por lotes en el reactor de 500 ml, pH = 5,5 y 50° C, con una carga de Spezyme® CP de 35,4 mg de proteína/g de celulosa y una carga de Multifect® Xylanase de 14,4 mg de proteína/g de hemicelulosa. Inicialmente se añadieron 44,55 g de biomasa pretratada (aproximadamente el 36% de los sólidos totales de la ejecución) a 170 g de agua de talón y se comenzó el agitador a 500 rpm. Después de ajustar el pH, se añadieron las enzimas requeridas para esta cantidad de biomasa pretratada. La biomasa estaba al borde del estancamiento y estaba agitándose muy lentamente cerca de la pared del reactor, mientras que se estaba agitando rápidamente en el centro cerca del agitador. Después de unos 30 minutos, parte de la biomasa se había licuado, permitiendo que la biomasa en el reactor se agitara razonablemente bien, incluyendo cerca de la pared del reactor. En este momento, se agregaron aproximadamente un 17% más de la biomasa pretratada total, se ajustó el pH y se añadieron las cantidades correspondientes de enzimas, llevando al reactor al borde del estancamiento. Después de 1 hora y 15 minutos, el contenido del reactor se estaba agitando bien. Se añadió un 17% más de la biomasa pretratada junto con los correspondientes importes de ácido y enzimas. Después de otras 3 horas y 15 minutos, el reactor se estaba agitando razonablemente bien, entonces se agregó el 30% restante de la biomasa total. Después de ajustar el pH y añadir las enzimas, el contenido del reactor estaba en su mayoría estancado. Después de 16 horas, el contenido del reactor se estaba agitando lentamente, principalmente debido a la alta viscosidad de la mezcla. La ejecución continuó durante un total de 77 horas después de la carga inicial de enzimas.

Este proceso de alimentación por lotes permitió que se preparara un hidrolizado de 38,09% DWB con 55% de rendimiento de glucosa y 58% de rendimiento de xilosa. El hidrolizado contenía 108 g/l de glucosa y sus oligómeros y 99 g/l de xilosa y sus oligómeros, para un total de 207 g/l de azúcares solubles. La biomasa pretratada y molida y las enzimas se añadieron en modo de alimentación por lotes, durante un total de 5 horas. En esta prueba de laboratorio, sólo la última adición de biomasa causó estancamiento en el reactor durante unas 10-16 horas, lo que podría fácilmente haberse evitado si la última carga de sólidos se hubiera hecho en dos incrementos dentro de las horas 10-16. A estas cargas de muchos sólidos, la viscosidad del hidrolizado fue bastante alta y planteó desafíos en el manejo de los fluidos.

Ejemplo 9Efectos de la molienda in-situ y externa en la sacarificación

Los ejemplos 1-8 anteriores demuestran la necesidad de reducción del tamaño de partícula para lograr rendimientos altos de sacarificación y cargas grandes de % DWB. La biomasa utilizada en estos ejemplos había sido molida antes del comienzo de la sacarificación. Sería más económico para un proceso a escala industrial conseguir la reducción de tamaño de partícula por trituración in situ. Se visualiza un proceso comercial que tendría un bucle de recirculación con un molino en línea en el bucle. Para probar la eficacia de diversos tipos de molinos, se realizaron las ejecuciones 115F, 116F, 117F, 118F y 125F utilizando diferentes arreglos de molienda.

La biomasa pretratada utilizada en estas ejecuciones fue una mezcla de 40% de mazorcas y 60% de fibra en peso en seco de sólidos. La fibra se refiere a la capa externa que cubre los granos de maíz también conocido como el casco del maíz. Es una biomasa lignocelulósica, como las mazorcas, que además contiene almidón y puede utilizarse en el proceso de sacarificación. Esta mezcla de 40/60 mazorca/fibra fue pretratada en el Reactor de Jaygo descrito en métodos generales, con 6 g de NH₃ por 100 gramos de peso seco de biomasa y vapor a 145° C durante 20 minutos. Esta mezcla de mazorca/fibra de maíz pretratada fue etiquetada DTM-17. Antes de la sacarificación, la biomasa pretratada fue molida adicionalmente en un molino de martillo y cribada a través de una criba de 1,12 mm.

Este material fue sacarificado en el modo de alimentación por lotes en el reactor de 500 ml. a pH = 5,5 y 50° C. La biomasa fue cargada en tres lotes durante 6 horas. El % de DWB de estas ejecuciones varió desde alrededor de 23% a alrededor de 28%. Las enzimas también fueron agregadas en modo de alimentación por lotes una carga de Spezyme® CP de 12,9 mg /g de celulosa y una carga de Multifect® Xylanase de 15,0 mg /g de hemicelulosa y Spirizyme® B4U (Novozymes North America, Franklinton, NC) de 1 mg/g de almidón.

La ejecución 115F fue una ejecución de referencia, sin reducción de tamaño adicional durante la sacarificación. El contenido del reactor se agitó con el agitador estándar descrito anteriormente a 500 rpm a lo largo de la ejecución. Las cinco ejecuciones 115F, 116F, 117F, 118F y 125F se realizaron durante un total de 72 horas. En la ejecución 116F, se usó un rotor-estator de mano (Ultra-Turrax T25 S-1 con cabeza T-18, IKA Works, Inc., Wilmington, NC 28405) para moler la biomasa in situ a 20.500 rpm. Las moliendas in-situ se hicieron a 25, 26,5, 45, 47 y 49 horas después de la adición de la primera enzima. El rotor-estator se ejecutó durante 10 minutos cada vez, con paradas

intermitentes para evitar cualquier sobrecalentamiento del rotor-estator o hidrolizado. En la ejecución 117F, el contenido del reactor fue transferido a una mezcladora Waring, enfriado a unos 30° C, y cada vez, se ejecutó la mezcladora durante 10 minutos en intervalos de 2 minutos. Entonces el hidrolizado fue devuelto al reactor para continuar la sacarificación. Este proceso fue realizado cinco veces en las horas 22, 26, 46, 50 y 69 después de la adición de la primera enzima. En la ejecución 118F, se repitió el proceso de la ejecución 117F, excepto que se ejecutó la mezcladora durante 30 minutos cada vez. Este proceso se realizó cinco veces en las horas 23, 27, 47, 51 y 70 después de la adición de la primera enzima. En la ejecución 125F, el agitador regular, descrito anteriormente, fue reemplazado por un dispersor de alta cizalladura (R1300 disolvente agitador, IKA Works, Inc., Wilmington, NC 28405) que se ejecutó a 500 rpm con aumento intermitente de velocidad de agitación hasta 900 rpm para la duración del experimento.

Los rendimientos de sacarificación y resultados de reducción de tamaño de partícula se muestran en la tabla 7. La distribución de tamaño de partículas (PSD) de la biomasa de alimentación fue reducida por un factor de alrededor de tres en la sacarificación de referencia de la ejecución 115F, sin ninguna molienda adicional. La molienda en la mezcladora Waring mostró mayor reducción adicional en d-50 y d-95, pero sólo leves mejoras en el rendimiento de la sacarificación. Sin embargo, el uso del rotor-estator o el reemplazamiento del agitador regular con un dispersor de alta cizalladura reduce aún más la distribución de tamaño de partícula y aumentó el rendimiento de sacarificación. Mientras que el dispersor de cizalladura puede no ser una opción viable para gran escala, un rotor-estator colocado en un bucle externo de reciclaje es una opción menos costosa prometedora para la reducción de tamaño de partícula.

Tabla 7 Efectos de diversos métodos de molienda en PSD y rendimientos

N° de ejecución	Agitación	Tamaño de partículas, micrómetros		Porcentaje de rendimiento			
		d-50	d-95	Monómero de glucosa	Glucosa total	Monómero de xilosa	Xilosa total
DTM-17 molido a 1,12 mm	---	71,3	494,0	---	---	---	---
115F	Sin molienda adicional	27,8	175,3	54,0	70,0	28,2	84,9
117F	Mezcladora Waring, 50 min	20,9	47,7	55,9	71,8	27,3	85,6
118F	Mezcladora Waring, 2 h y 30 min	17,0	73,8 ^a	54,7	72,1	27,1	85,5
125F	Dispersor de alta cizalla	8,0	30,8	64,2	80,1	33,9	93,6
116F	Rotor-estator 10 min	21,0	42,9	63,7	83,7	33,8	103,2
^a Se cree que este número es un error de muestreo con los datos d-50 proporcionando un número exacto							

Ejemplo 10

Sacarificación con reducción de tamaño de partícula en un molino en un bucle externo

La ejecución 163 se realizó tomando hidrolizado del sacarificador y moliéndolo en un reactor de bucle equipado con un molino rotor-estator en línea de ½ caballo (Charles Ross and Son Co., Hauppauge, NY 11788). Las mazorcas de maíz fueron pretratadas en el Reactor de Jaygo descrito anteriormente con 4 g de NH₃ por 100 gramos de peso seco de biomasa y vapor a 145° C durante 20 minutos, etiquetada como Jaygo-9. La biomasa pretratada fue molida a tamaño de 1,12 mm y usada en esta prueba. Este material fue sacarificado en el reactor de 500 ml, pH = 5,5 y 50° C. La biomasa se cargó en un lote, se mezcló con una espátula, se ajustó el pH y se añadieron las enzimas con una carga de Spezyme® CP de 20,0 mg/g de celulosa y una carga de Multifect® Xylanase de 10,0 mg/g de hemicelulosa. El porcentaje de carga de DWB de biomasa fue 25,76%. La mezcla era muy viscosa y se agitó sólo en el centro, cerca del agitador.

Veinte horas después de permitir que los sólidos se impregnaran de las enzimas, para sacarificar parcialmente, los contenidos del reactor fueron transferidos a un tanque conectado al molino en línea. El molino se ejecutó a 3600 rpm dos veces en intervalos de tres minutos, para un total de seis minutos. El hidrolizado fue devuelto al reactor y ejecutado en condiciones de sacarificación durante 4 horas más. La tabla 8 muestra el análisis de azúcar del

hidrolizado antes y 4 horas después de esta etapa de molienda. La molienda externa mostró un fuerte efecto positivo en la sacarificación, específicamente en la formación de monómero de glucosa y glucosa total, que aumentó un 61 y 44%, respectivamente.

Tabla-8. Efecto de la molienda externa con rotor-estator en la sacarificación

	Tiempo desde la carga de enzimas, horas	Concentración de azúcares, g/l			
		Monómero de glucosa	Glucosa total	Monómero de xilosa	Xilosa total
Antes de la molienda	20	29,73	45,02	29,32	69,88
Después de la molienda y 4 hr de sacarificación	25	47,91	64,96	34,51	73,03

5 Ejemplo 11

Efecto de la estrategia en la adición de enzimas sobre la sacarificación

La sacarificación en el modo de alimentación por lotes permite una oportunidad para optimizar la adición de diversos enzimas a fin de encontrar la mejor estrategia para la adición de las enzimas y obtener los más altos rendimientos de sacarificación. Las ejecuciones de 164 a 167 se llevaron a cabo como un conjunto de pruebas para analizar este proceso de optimización. Estas ejecuciones se llevaron a cabo en el reactor de 500 ml con mazorcas de maíz pretratadas. Las mazorcas de maíz fracturadas se pretrataron en el Reactor de Jaygo descrito anteriormente, con 4 g de NH₃ por cada 100 gramos de peso seco de biomasa y vapor a 145° C durante 20 minutos y fueron designadas como Jaygo-9. Las mazorcas pretratadas fueron molidas adicionalmente a un tamaño menor de 1,12 mm antes de su uso en el sacarificador. Las sacarificaciones se realizaron a 50° C y pH = 5,5, con una carga de Spezyme® CP de 20 mg de proteína/g de celulosa y una carga de Multifect® Xylanase de 10 mg de proteína/g de hemicelulosa. Las enzimas se añadieron utilizando diferentes regímenes enumerados en la tabla 9. En las horas 54 o 142 de sacarificación, se tomaron muestras y se analizaron los azúcares. Los resultados dados en las tablas 9 y 10 muestran que la sacarificación de la celulosa fue favorecida cuando ambas celulasas (Spezyme® CP) y hemicelulasas (Multifect® Xylanase) fueron añadidas al principio, lo que sugiere una interacción sinérgica. Sin embargo, la formación de monómero de xilosa mejoró cuando la hemicelulasa se agregó primero seguida de la celulosa. Este ejemplo sólo muestra el potencial de optimización y no representan necesariamente una estrategia de incorporación de enzima óptima.

Tabla 9 Efecto de la carga de enzima en los rendimientos de sacarificación en 54 horas

Nº de ejecución	Carga de enzimas	Rendimiento a 54 hr g/l			
		Monómero de glucosa	Glucosa total	Monómero de xilosa	Xilosa total
164	Todas las enzimas a t=0	51,5	65,7	37,8	73,0
165	Spezyme® CP a t=0, Multifect® Xylanase a t=22 hr	41,8	54,0	34,5	70,6
166	Multifect® Xylanase a t=0, Spezyme® CP a t=22 hr	39,2	41,8	38,9	61,4
167	½ Enzimas a t=0, ½ Enzimas a t=22 hr	36,5	49,0	34,5	68,4

Tabla 10 Efecto de la carga de enzima en los rendimientos de sacarificación en 142 horas

Nº de ejecución	Carga de enzimas	Rendimiento a 142 hr g/l			
		Monómero de glucosa	Glucosa total	Monómero de xilosa	Xilosa total
164	Todas las enzimas a t=0	67,9	79,1	45,5	78,6
165	Spezyme® CP a t=0, Multifect® Xylanase a t=22 hr	61,7	73,5	43,2	77,5
166	Multifect® Xylanase a t=0, Spezyme® CP a t=22 hr	64,9	72,7	47,4	78,2
167	½ Enzimas a t=0, ½ Enzimas a t=22 hr	64,1	72,3	48,5	78,6

Ejemplo 12Molienda externa durante la sacarificación a gran escala

La sacarificación con bucle externo de trituración fue escalada hasta un reactor de 15 litros, usando una bomba de lóbulo y una válvula de cizalladura como medios para reducir el tamaño de las partículas de biomasa y la ejecución se designó como SOT-06-B.

Mazorcas de maíz fracturadas fueron pretratadas en el reactor de pistón de barril, descrito anteriormente, con 6 g de NH_3 por cada 100 gramos de peso seco de biomasa y vapor a 145°C durante 10 minutos. Se realizaron un total de 17 de dichos pretratamientos. Se combinaron las mazorcas de cuatro pretratamientos para la sacarificación para proporcionar talón inicial para la sacarificación de alimentación por lote. Se combinaron las mazorcas pretratadas de las restantes 13 ejecuciones para su uso en la sacarificación de alimentación por lote.

Para iniciar la sacarificación de alimentación por lote, el reactor de sacarificación de alimentación por lote descrito en los métodos generales fue primero cargado con hidrolizado de talón para llenar el volumen del reactor hasta la parte inferior de la primera turbina. Este hidrolizado de talón fue preparado sacarificando mazorcas pretratadas en matraces agitados de 2,8 l. Estos matraces agitados se cargaron con 465 g de sólidos pretratados, 1000 ml de agua desionizada y enzimas a 28,4 mg Spezyme® CP/g de celulosa y 4,2 mg de proteína activa/g de celulosa de consorcio de enzima de hemicelulasa (Diversa, now Verenium Corp., Cambridge, MA) compuesto por beta-glucosidasa, xilanas, beta-xilosidasa y arabinofuranosidasa. Antes de la adición de las enzimas, el pH fue ajustado a 5 con H_3PO_4 al 8,5%. Los matraces agitados se mantuvieron a 50°C y 150 rpm en un agitador rotatorio durante 48 horas, momento en el que se cargó el hidrolizado en el reactor de alimentación por lotes.

Una vez que se cargó el hidrolizado de talón, se añadió una alícuota de la mezcla de amoníaco - biomasa pretratada (~ 700 g) al reactor. El pH fue ajustado a un punto final de 5,5 con la adición de H_3PO_4 al 8,5%. Una vez que el pH se reajustó al punto final, se añadieron 28,4 mg Spezyme® CP/g de celulosa y 4,2 mg de proteína activa/g de celulosa de consorcio de enzima de hemicelulasa (Diversa), que comprende beta-glucosidasa, xilanas, beta-xilosidasa y arabinofuranosidasa. Alícuotas adicionales de la misma mezcla de amoníaco - biomasa pretratada, celulosa Spezyme® CP y consorcio de enzima de hemicelulasa, se añadieron a $t = 4, 8, 12, 22, 26, 30$ y 34 horas. El pH se ajustó al punto final de 5,5 con la adición de H_3PO_4 al 8,5% después de cada adición de biomasa. La bomba alrededor de bucle fue generalmente comenzada aproximadamente 1 hora después de la adición de las enzimas y se tuvo funcionando durante aproximadamente 1 hora hasta la adición de sólidos de las 22 horas. Después de las adiciones a 26 horas y 30 horas, la bomba se inició unos 50 minutos después de la adición de las enzimas y se hizo funcionar durante 30 minutos. Después de la adición de 34 horas, la bomba se inició ~ 3 horas después de la adición de las enzimas y se hizo funcionar durante 30 minutos. La bomba se hizo funcionar también durante 30 minutos a $t = 29, 33, 47$ y 49 horas. El tiempo total de sacarificación fue de 120 horas. En este momento, el hidrolizado contenía ~ 60 g/l de monómero de glucosa, 25 g/l de monómero de xilosa y 10 g/l de ácido acético. El % de DWB en el hidrolizado fue 24,7% y los rendimientos de monómero de glucosa, glucosa total, monómero de xilosa y xilosa total fueron 60,9%, 84,7%, 28,2%, y 76,6%, respectivamente.

En general, el ejemplo 12 demostró la sacarificación en un reactor de tanque equipado con un molino en línea en un bucle circulante con gran éxito.

Ejemplo 13Producción de etanol usando hidrolizado de sacarificación de biomasa pretratada con inhibidores en el líquido eliminado

Se añadió vapor a la camisa del barril para precalentar el barril del reactor de pistón de barril grande (descrito en los métodos generales) a $\sim 130^\circ\text{C}$. El tanque de evaporación fue precalentado a $\sim 60^\circ\text{C}$ con calentadores de banda. Las mazorcas fracturadas se prepararon como sigue. Mazorcas de maíz entero fueron procesadas con una trituradora de mandíbula (motor de 2,2 kW) con un espaciado de mandíbula de aproximadamente 0,95 cm, seguido por un reductor de aglomerados (motor de 1,5 kW, Franklin Miller Inc., Livingston, NJ), seguido de un cribado con una pantalla Sweco equipada con una criba de 1,9 cm de U.S. Standard para fracturar las mazorcas en pedazos más pequeños. Estas mazorcas procesadas (base de peso seco de 175 g) se cargaron en el reactor de pistón de barril grande a mano poniendo las mazorcas en el final del reactor con el pistón quitado. El pistón fue reemplazado para cerrar el extremo. Se aplicó vacío al cuerpo del reactor y al tanque de evaporación para bajar la presión a < 10 kPa y se inyectó una solución diluida de hidróxido amónico en el reactor para dar una concentración de amoníaco de 6 g/100 g de peso seco de la biomasa y un peso seco de concentración de biomasa de 45 g/100 g de mezcla total de biomasa-amoníaco acuoso. Una vez que se cargó el amoníaco, se inyectó vapor en el reactor para llevar la temperatura a 145°C . La mezcla se mantuvo a esta temperatura durante 10 minutos monitorizando la temperatura y agregando vapor según fuera necesario y luego se vertió en el tanque de evaporación precalentado activando el pistón. Se sacó el vacío en el tanque de evaporación hasta que el receptor de evaporación alcanzó $\sim 59^\circ\text{C}$. Tras obtenerse el residuo del tanque de evaporación, se separó el líquido libre de los sólidos pretratados y no se volvió a añadir para la sacarificación. Se realizaron un total de 17 de los pretratamientos dichos. Mazorcas pretratadas de 4 pretratamientos se combinaron para la sacarificación a fin de proporcionar hidrolizado inicial para la sacarificación de

alimentación por lotes. Las mazorcas pretratadas de las restantes 13 ejecuciones fueron agrupadas para su uso en la sacarificación de alimentación por lotes.

Para iniciar la sacarificación de alimentación por lotes, el reactor de sacarificación de alimentación por lotes descrito en los métodos generales fue primero cargado con hidrolizado para llenar el volumen del reactor hasta la parte inferior de la primera turbina. Este hidrolizado fue preparado por la sacarificación de mazorcas pretratadas en matraces agitados de 2,8 l. Estos matraces agitados se cargaron con 465 g de sólidos pretratados, 1000 ml de agua desionizada y enzimas a 28,4 mg Spezyme® CP/g de celulosa y 4,2 mg de proteína activa/g de celulosa de consorcio de enzima de hemicelulasa (Diversa, San Diego, CA) compuesto por beta-glucosidasa, xilanas, beta-xilosidasa y arabinofuranosidasa. Antes de la adición de las enzimas, el pH fue ajustado a 5 con H₃PO₄ al 8,5%. Los matraces agitados se mantuvieron a 50° C y 150 rpm en un agitador rotatorio durante 48 horas, momento en el que se cargó el hidrolizado en el reactor de alimentación por lotes.

Una vez que se cargó el hidrolizado inicial, se añadió la primera alícuota de la mezcla biomasa pretratada-amoniaco (~ 700 g) al reactor. El pH se mantuvo a un punto final de 5,5 con la adición de H₃PO₄ al 8.5%. Una vez que el pH se reajustó al punto final, se añadieron 28,4 mg de Spezyme® CP/g de celulosa y 4,2 mg de proteína activa/g de celulosa de consorcio de enzima de hemicelulasa (Diversa) compuesto de β-glucosidasa, xilanas, β-xilosidasa y arabinofuranosidasa. Alícuotas adicionales de la misma mezcla de amoníaco - biomasa pretratada, celulosa Spezyme® CP y consorcio de enzima de hemicelulasa, se añadieron a t = 4, 8, 12, 22, 26, 30 y 34 horas. La bomba alrededor de bucle fue generalmente comenzada aproximadamente 1 hora después de la adición de las enzimas y se tuvo funcionando durante aproximadamente 1 hora hasta la adición de sólidos de las 22 horas. Después de las adiciones a 26 horas y 30 horas, la bomba se inició unos 50 minutos después de la adición de las enzimas y se hizo funcionar durante 30 minutos. Después de la adición de 34 horas, la bomba se inició ~ 3 horas después de la adición de las enzimas y se hizo funcionar durante 30 minutos. La bomba se hizo funcionar también durante 30 minutos a t = 29, 33, 47 y 49 horas. El tiempo total de sacarificación fue de 120 horas. En este momento, el hidrolizado contenía ~ 60 g/l de monómero de glucosa, 25 g/l de monómero de xilosa y 10 g/l de ácido acético. Este hidrolizado se utilizó para la fermentación de las cepas de *Zymomonas mobilis* ZW800 o ZW658 (ATCC # PTA-7858). ZW658 es una cepa de *Zymomonas mobilis* que ha sido obtenida por ingeniería para la fermentación de xilosa a etanol y se describe en la solicitud en propiedad y en tramitación con el presente documento del documento de patente de Estados Unidos N° 60/847813. ZW658 fue construida por integración de dos operones, P_{gap}XylAB y P_{gap}taltkt, que contienen cuatro genes que utilizan xilosa que codifican la isomerasa de xilosa, xiluloquinasa, transaldolasa y transquetolasa, en el genoma de ZW1 (ATCC # 31821) a través de eventos de transposición secuencial y seguido de adaptación en medio selectivo que contiene xilosa. ZW800 es la cepa ZW658 con el gen que codifica la glucosa-fructosa oxidoreductasa inactivado, que también se describe en la solicitud en propiedad y en tramitación con el presente documento del documento de patente de Estados Unidos N° 60/847813.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en fermentadores de 1 litro esterilizados (BIOSTAT® B-DCU system, Sartorius BBI System Inc., Bethlehem, Pennsylvania, Estados Unidos) con un volumen de trabajo inicial de 500 ml. Se añadió el inóculo al fermentador a un nivel de 10% (v/v) tal que la OD₆₀₀ era ~1 en el caldo después de la adición. El hidrolizado estaba presente al 80% o 40% (v/v), con el resto siendo agua. Se agregaron xilosa y glucosa adicionales para dar concentraciones finales en el caldo de 92 g/l y 82 g/l, respectivamente. El caldo también se complementó con sorbitol 10 mM y MgSO₄ 7 H₂O a 1 g/l. La fermentación se llevó a cabo durante 72 horas a 33° C, pH 5,8 con 150 rpm de agitación. Las concentraciones finales de etanol para la cepa de ZW800 fueron 8 g/l en el hidrolizado de 40% y 6,5 g/l en el hidrolizado de 80%.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir hidrolizados de alto contenido de azúcar a partir de biomasa que comprende:
 - a) proporcionar una parte de los componentes de la reacción en un reactor de agitación vertical que tiene un mecanismo de reducción de partículas, dichos componentes de la reacción comprenden:
 - 5 i) una parte de una papilla de biomasa pretratada; y
 - ii) una parte de un primer consorcio de enzimas de sacarificación que comprende al menos una enzima capaz de hidrolizar celulosa;
 - b) hacer reaccionar dicha papilla y enzimas en condiciones adecuadas;
 - 10 c) aplicar el mecanismo de la reducción del tamaño de partícula en donde dicho mecanismo se selecciona del grupo que consiste en mezclar, moler, cizallar, partir, dispersar y dispersar por cizalladura;
 - d) añadir una porción adicional de la biomasa pretratada que produce una papilla de biomasa más alta en sólidos;
 - e) opcionalmente añadir una porción adicional de un consorcio de enzimas de sacarificación;
 - f) hacer reaccionar dicha papilla de biomasa más alta en sólidos en condiciones adecuadas; y
 - 15 g) opcionalmente repetir uno o más pasos (c), (d), (e), y (f) una o más veces,en donde se produce un hidrolizado que contiene azúcar, en donde la resistencia a la tracción de la papilla se mantiene a menos de 30 Pa y en donde el peso seco de biomasa en todas las porciones de biomasa pretratadas combinadas es mayor del 30% del peso del producto hidrolizado final.
- 20 2. El proceso de la reivindicación 1, en donde la parte mezclable de una mezcla de una papilla de biomasa pretratada del paso (a) (i) se proporciona combinando un talón de componente de baja viscosidad y una porción de la biomasa pretratada en el reactor de tanque de agitación vertical y se ajusta la temperatura y el pH antes de la adición de las enzimas.
3. El proceso de la reivindicación 1, en el que las porciones de biomasa se agregan de forma continua.
4. El proceso de la reivindicación 1, en donde la aplicación del mecanismo de reducción de tamaño de partícula se realiza una o más veces antes, durante, o después del paso (b), o cualquier combinación de las mismas.
- 25 5. El proceso de la reivindicación 1, en donde dicho mecanismo de reducción de tamaño de partícula comprende una reducción mecánica.
6. El proceso de la reivindicación 1, en donde el pH y la temperatura se controlan tras la adición de una porción adicional de biomasa pretratada.
- 30 7. El proceso de la reivindicación 2 o 6, en donde el pH se ajusta a un valor entre 4 y 10.
8. El proceso de la reivindicación 2 o 6, en donde la temperatura se ajusta a un valor entre 20° C y 80° C.
9. El proceso de la reivindicación 1, en donde una enzima capaz de hidrolizar la celulosa se selecciona del grupo que consiste en celulasas, endoglucanasas, exoglucanasas, celobiohidrolasas, y β -glucosidasas.
10. El proceso de la reivindicación 1, en donde el primer consorcio de enzimas de sacarificación de (a) (ii), el consorcio adicional de enzimas de sacarificación de (e) y consorcios adicionales de enzimas de sacarificación de otras repeticiones opcionales puede estar comprendido por los mismos o diferentes enzimas.
- 35 11. El proceso de la reivindicación 10, en donde cada consorcio de enzimas de sacarificación comprende celulasas, hemicelulasas o sus mezclas.
12. El proceso de la reivindicación 1, en donde dicha biomasa se deriva de materias primas múltiples.
- 40 13. El proceso de la reivindicación 1, en donde el hidrolizado de contenido alto de azúcar comprende monosacáridos y oligosacáridos

Figura 1

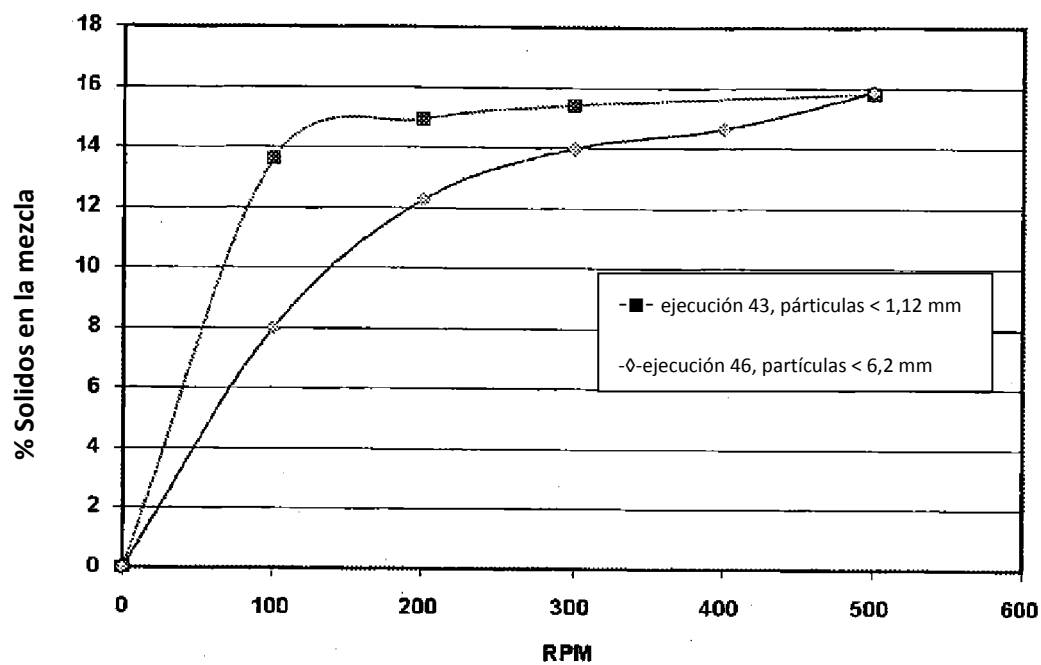


Figura 2

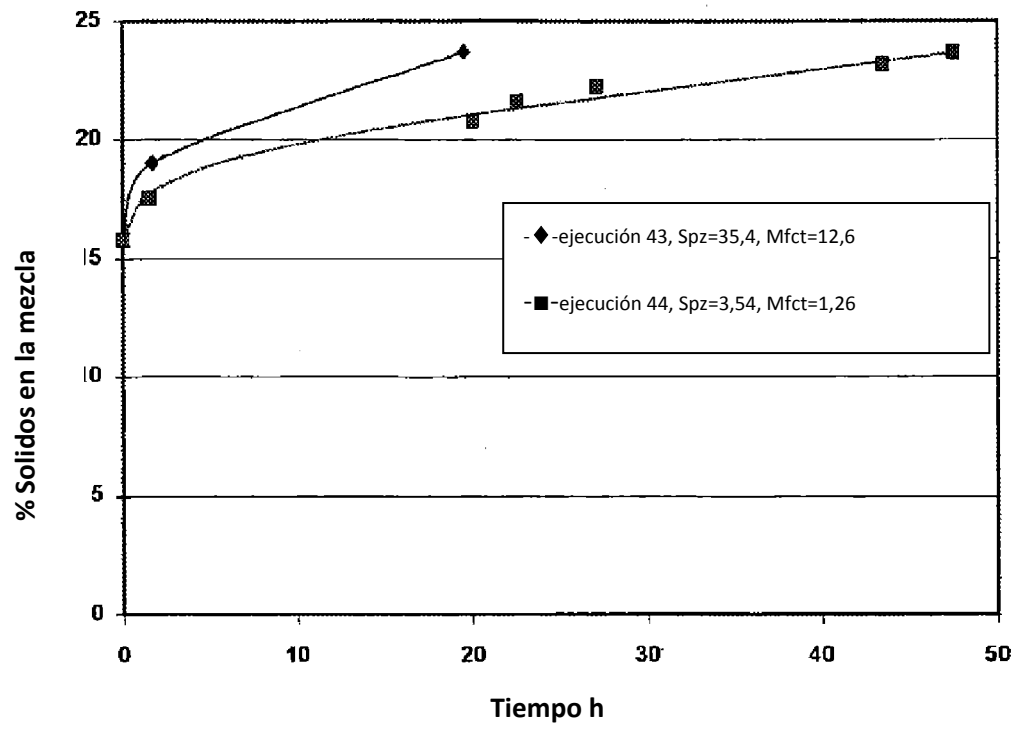


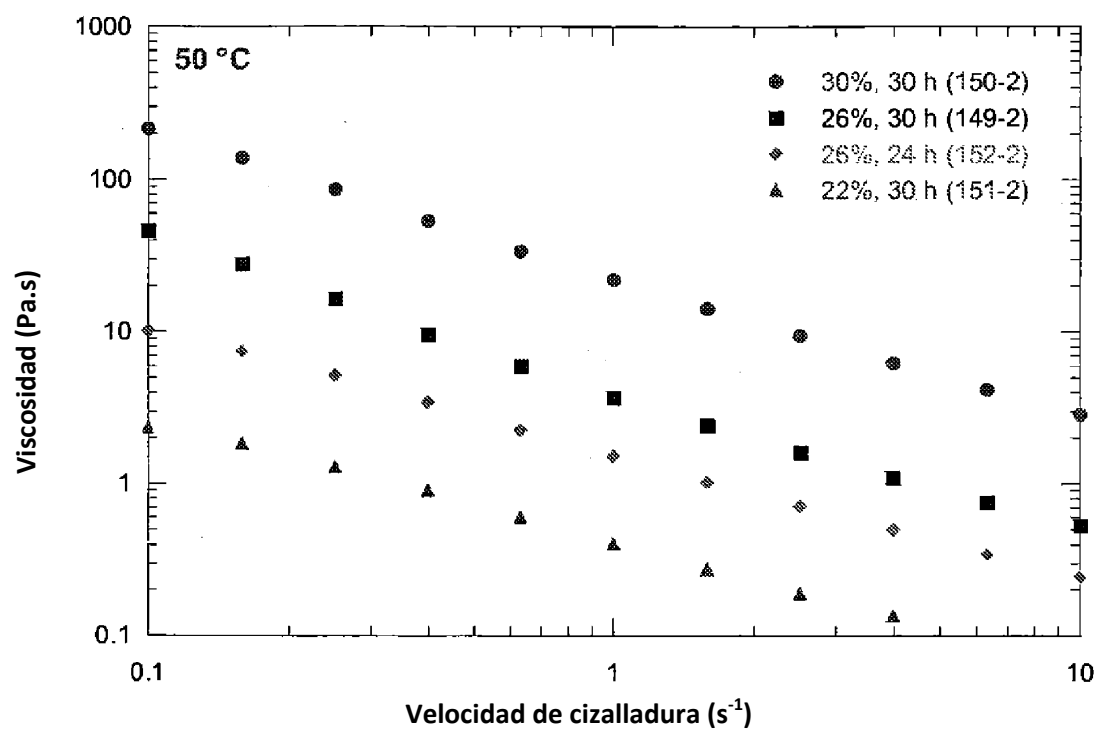
Figura 3

Figura 4

