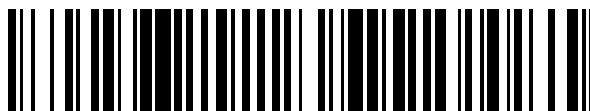


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 730**

51 Int. Cl.:

<b>C12P 7/16</b>	(2006.01)	<b>D21C 11/00</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/18</b>	(2006.01)		
<b>C12P 19/02</b>	(2006.01)		
<b>C12P 19/14</b>	(2006.01)		
<b>D21C 1/00</b>	(2006.01)		
<b>C12P 7/10</b>	(2006.01)		
<b>C13K 1/02</b>	(2006.01)		
<b>D21C 3/02</b>	(2006.01)		
<b>D21C 3/20</b>	(2006.01)		
<b>C08H 8/00</b>	(2010.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2009 E 09775490 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 2358886**

54 Título: **Pretratamiento de biomasa con disolvente orgánico para mejorar la sacarificación enzimática**

30 Prioridad:

**19.12.2008 US 139179 P**

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

**24.04.2013**

73 Titular/es:

**E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY  
(100.0%)  
1007 Market Street  
Wilmington, DE 19898, US**

72 Inventor/es:

**DINER, BRUCE, A. y  
FAN, JANINE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 401 730 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Pretratamiento de biomasa con disolvente orgánico para mejorar la sacarificación enzimática

La solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. nº 61/139179, presentada el 19 de diciembre de 2008.

5 **Campo de la invención**

Se proporciona y se describen métodos para producir biomasa lignocelulósica enriquecida en carbohidratos fácilmente sacarificables. Específicamente, se prepara biomasa pretratada a través de fragmentación y extracción selectiva simultáneas de lignina en una disolución en disolvente orgánico en presencia de concentraciones moderadas de amoníaco y uno o más nucleófilos a temperaturas elevadas en condiciones alcalinas. Los sólidos enriquecidos en carbohidratos que quedan en la biomasa pretratada pueden someterse entonces a sacarificación enzimática para obtener azúcares fermentables, que pueden someterse a un procesamiento adicional para la producción de productos diana.

**Antecedentes de la invención**

Las materias primas y los residuos celulósicos y lignocelulósicos, tal como residuos agrícolas, madera, residuos forestales, lodos de la fabricación de papel y residuos sólidos municipales e industriales, proporcionan una fuente renovable potencialmente grande para la producción de productos químicos, plásticos, combustibles y piensos. Las materias primas y los residuos celulósicos y lignocelulósicos, compuestos por celulosa, hemicelulosa, pectinas y lignina son tratados generalmente mediante una serie de sistemas químicos, mecánicos y enzimáticos para liberar principalmente azúcares de hexosas y pentosas, que pueden ser fermentados a continuación para dar lugar a productos útiles.

Los métodos de pretratamiento se usan a menudo para hacer que los polisacáridos de biomasa lignocelulósica sean más fácilmente accesibles a las enzimas celulolíticas. Uno de los impedimentos principales para la digestión de enzimas celulolíticas es la presencia de lignina, una barrera que limita el acceso de las enzimas a sus sustratos, y una superficie a la cual se unen las enzimas de forma no productiva. Debido a los costes significativos asociados a la sacarificación enzimática, es deseable minimizar la carga de enzimas mediante desactivación de la lignina frente a la adsorción enzimática o mediante su extracción directa.

Otro reto es la falta de accesibilidad de la celulosa a la hidrólisis enzimática bien debido a su protección por hemicelulosa y lignina o bien a su cristalinidad. Los métodos de pretratamiento que buscan superar estos retos incluyen: explosión por vapor, agua caliente, ácido diluido, explosión de fibras con amoníaco, hidrólisis alcalina (que incluye la percolación recirculada de amoníaco), deslignificación oxidativa y organosolv.

Los métodos de organosolv, tal como se han llevado a la práctica previamente para el tratamiento de biomasa lignocelulósica, tanto para la producción de pulpa o para aplicaciones de biocombustibles, aunque generalmente exitosas en la eliminación de lignina, han adolecido de bajos rendimientos de recuperación de azúcares, particularmente de xilosa. Por ejemplo, el uso de mezclas etanol-agua ligeramente ácidas (por ejemplo, EtOH al 42% en peso) a temperatura elevada para eliminar lignina de biomasa lignocelulósica (Kleinert, T. N., Tappi 57: 99-102, 1974) dio como resultado una pérdida sustancial de carbohidratos. La hidrólisis ácida diluida a 95 °C seguida de extracción con disolventes orgánicos y sacarificación enzimática (Lee, Y-H. y col., Biotech. Bioeng., 29: 572-581, 1987) dio como resultado una pérdida sustancial de hemicelulosa durante la hidrólisis, una pérdida adicional de carbohidratos tras la extracción con disolvente orgánico y un bajo rendimiento (~50% de los carbohidratos totales) en la sacarificación enzimática del residuo.

El tratamiento de biomasa con agua gas y metilamina seguido de extracción con disolvente orgánico y a continuación extracción con agua, requería tres etapas y dio como resultado una pérdida sustancial de carbohidratos (Siegfried, P. y Götz, R., Chem. Eng. Technol., 15: 213-217, 1992). El tratamiento con poliaminas o etilamina en mezclas de agua-alcohol alifático más catalizador a temperatura elevada requería de una elevada relación líquido/sólidos y concentraciones bajas de alcohol conducían a un bajo rendimiento de recuperación de azúcares, particularmente de xilano (Patente de EE.UU. 4597830A). El tioglicolato en disolución alcalina acuosa usado para tratar biomasa lignocelulósica a temperatura elevada, seguido de un lavado con agua caliente, requería el uso de hidróxidos de metal alcalino o alcalinotérreo. Este método requiere la eliminación costosa de los iones inorgánicos, un elevado % en peso de tioglicolato, y el uso de grandes volúmenes de agua (Patente de EE.UU. 3.490.993). El tratamiento con mezclas de disolvente orgánico-agua en presencia de sulfuro/bisulfuro a temperaturas elevadas requería una elevada relación disolvente/sólidos y un elevado contenido de azufre, y daba como resultado una pérdida sustancial de carbohidratos (Patente de EE.UU. 4.329.200A).

El uso de disolvente orgánico acuoso que contiene elevadas concentraciones de amoníaco a temperaturas elevadas para tratar biomasa lignocelulósica (Park J.-K. y Phillips, J.A., Chem. Eng. Comm., 65: 187-205, 1988) requería el uso de una elevada relación de líquido a sólidos en el pretratamiento y daba como resultado una pérdida sustancial de hemicelulosa y una baja sacarificación enzimática de la celulosa.

Otras desventajas de los métodos aplicados previamente incluyen, corrientes separadas de hexosas y pentosas (por ejemplo, ácido diluido), una extracción inadecuada de lignina o la falta de separación de lignina extraída a partir del polisacárido, particularmente en las materias primas con un elevado contenido de lignina (por ejemplo, bagazo de caña de azúcar, maderas blandas), eliminación de productos residuales (por ejemplo, las sales formadas en la neutralización del ácido o de la base), y bajos rendimientos de recuperación de carbohidratos debido a la ruptura o a la pérdida en los etapas de lavado. Otros problemas incluyen un elevado coste de energía, capital inmovilizado y recuperación de catalizador de pretratamiento, e incompatibilidad con las enzimas de sacarificación.

Uno de los retos principales del pretratamiento de biomasa es maximizar la extracción o la neutralización química (con respecto a la unión no productiva de enzimas celulolíticas) de la lignina a la vez que se minimiza la pérdida de carbohidratos (celulosa más hemicelulosa) a través de procesos económicos y eficientes. Cuanto mayor sea la selectividad, mayor será el rendimiento global a azúcares monoméricos después del pretratamiento combinado con la sacarificación enzimática.

Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollo de un proceso en una sola etapa que use una relación líquido a sólido sustancialmente menor en el pretratamiento, y una base reciclable sin una pérdida sustancial de hemicelulosa ni una baja sacarificación de celulosa. La presente descripción aborda dicha necesidad. En esta descripción, se usan concentraciones de bajas a moderadas de amoníaco en presencia de uno o más nucleófilos para una fragmentación mediada por una disolución en disolvente orgánico y una extracción selectiva de lignina a temperaturas elevadas en condiciones alcalinas. Este proceso económico mantiene el contenido de hemicelulosa de la biomasa a la vez que elimina selectivamente lignina y produce una biomasa enriquecida en carbohidratos que es altamente susceptible a la sacarificación enzimática. La biomasa pretratada producida mediante los procesos descritos en la presente memoria da como resultado rendimientos muy elevados de azúcares fermentables tras sacarificación (glucosa, así como xilosa) y, a su vez, elevados rendimientos a los productos diana tras fermentación (por ejemplo, productos químicos de elevado valor añadido y combustibles). Sorprendentemente, el uso de bajas a moderadas concentraciones de amoníaco y la presencia de uno o más nucleófilos dio como resultado una mejoría significativa en la fragmentación y la extracción de lignina, y una elevada retención de carbohidratos, particularmente con respecto a la hemicelulosa.

### Resumen de la invención

La presente invención proporciona un método para producir biomasa enriquecida en carbohidratos fácilmente sacarificable y para extraer lignina de forma selectiva a partir de biomasa lignocelulósica reteniendo simultáneamente de forma casi cuantitativa los carbohidratos, particularmente la hemicelulosa. Los métodos incluyen el tratamiento de biomasa lignocelulósica con una disolución de disolvente orgánico que comprende de bajas a moderadas concentraciones de amoníaco y uno o más nucleófilo(s) en condiciones alcalinas a temperaturas elevadas. Después del pretratamiento, la biomasa puede continuar siendo tratada con un consorcio de enzimas de sacarificación para producir azúcares fermentables. Dichos azúcares pueden someterse a un procesamiento adicional para la producción de productos diana.

Por consiguiente, la invención proporciona un método para producir biomasa enriquecida con carbohidratos con una elevada retención de hemicelulosa que comprende:

(a) proporcionar biomasa lignocelulósica que comprende lignina, celulosa y hemicelulosa;

(b) suspender la biomasa de (a) en una disolución de disolvente orgánico que comprende agua, amoníaco en una cantidad de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 20% referido al peso de biomasa seca, y uno o más nucleófilos, mediante lo cual se forma una suspensión de biomasa-disolvente en condiciones alcalinas;

(c) calentar la suspensión de biomasa-disolvente hasta una temperatura de aproximadamente 100-220 °C durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 5 horas, mediante lo cual se fragmenta la lignina y se disuelve en la suspensión; y

(d) filtrar el líquido libre a presión tras calentar la suspensión de (c) mediante lo cual la lignina disuelta es eliminada y se produce una biomasa enriquecida en carbohidratos con un elevado rendimiento de retención de hemicelulosa.

En otra realización la invención proporciona un método de fragmentación y extracción selectiva simultáneas de lignina a partir de biomasa lignocelulósica para producir una biomasa sustancialmente libre de lignina que comprende:

(a) proporcionar:

1) una cantidad de biomasa lignocelulósica que comprende lignina y carbohidratos;

2) una disolución de disolvente multi-componente que comprende entre aproximadamente el 40% y aproximadamente el 70% de etanol en agua;

3) amoníaco en una cantidad de 2% a aproximadamente 20%;

4) y uno o más nucleófilo(s);

(b) poner en contacto dicha biomasa con la disolución del disolvente multi-componente de (a) para formar una mezcla de disolvente-biomasa;

5 (c) colocar la mezcla de disolvente-biomasa en un recipiente a presión sellado con lo que la mezcla de (b) es calentada a una temperatura de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 220 °C de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 5 horas, mediante lo cual lignina es fragmentada y disuelta en el disolvente;

(d) eliminar la lignina disuelta de (c) mediante filtración; y

(e) lavar el residuo con disolvente orgánico, con lo que se produce biomasa sustancialmente libre de lignina.

10 La biomasa resultante tiene un contenido de carbohidratos que es altamente conservado, por ejemplo, el contenido de carbohidratos puede ser superior o igual al 85% de la biomasa de carbohidratos en comparación con la biomasa previa al pretratamiento descrito en la presente memoria. Más específicamente, la biomasa resultante está enriquecida en carbohidratos de tal modo que se retenga al menos aproximadamente el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ó 100% del carbohidrato tras el pretratamiento en comparación con la cantidad de carbohidrato presente en la biomasa antes del pretratamiento descrito en la presente memoria. Adicionalmente, el contenido en hemicelulosa resultante se mantiene de tal modo que se retiene aproximadamente el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ó 100% de la hemicelulosa tras el pretratamiento en comparación con la cantidad de hemicelulosa presente en la biomasa antes del pretratamiento descrito en la presente memoria.

15 Las materias primas particularmente adecuadas para uso en los métodos de la invención incluyen, aunque sin limitación, switchgrass, residuos de papel, lodos procedentes de la fabricación de papel, fibra de maíz, mazorcas de maíz, vainas de maíz, forraje de maíz, hierbas, trigo, paja de trigo, heno, cebada, paja de cebada, paja de arroz, bagazo de caña de azúcar, paja de caña de azúcar, álamo amarillo, sorgo, soja, componentes obtenidos del procesado de granos, árboles, ramas, raíces, hojas, astillas de madera, serrín, matas y arbustos, verduras, frutas, flores, estiércol de animales y combinaciones de los mismos.

## 25 Descripción detallada de la invención

Los solicitantes incorporan de manera específica el contenido completo de todas las referencias citadas en esta descripción. A menos que se indique lo contrario, todos los porcentajes, partes, relaciones, etc., están expresados en peso. Las marcas comerciales se muestran en mayúsculas. Además, cuando se proporciona una cantidad, concentración u otro valor o parámetro como un intervalo, intervalo preferido o una lista de valores superiores preferidos o valores inferiores preferidos, esto debe entenderse como que describen específicamente todos los intervalos formados entre cualquier par de límite superior de intervalo o valor superior preferido y cualquier límite inferior de intervalo o valor inferior preferido, independientemente de si los intervalos se describen por separado. Cuando se recita un intervalo de valores numéricos en la presente memoria, a menos que se indique lo contrario, se pretende que el intervalo incluya sus valores extremos, y todos los números enteros y fracciones dentro del intervalo.

30 No se pretende que el alcance de la invención esté limitado por los valores específicos recitados cuando se defina un intervalo.

La presente invención proporciona un proceso para el tratamiento de biomasa con el objetivo de producir fácilmente biomasa enriquecida en carbohidratos fácilmente sacarificable para potenciar la subsiguiente etapa enzimática de sacarificación. Se emplea un proceso que implica una etapa de pretratamiento en la que la lignina es fragmentada y extraída simultáneamente usando un disolvente orgánico en condiciones alcalinas a temperaturas elevadas en presencia de amoníaco. Se pueden emplear nucleófilos adicionales para un mayor beneficio. La biomasa tratada es filtrada y lavada a continuación para eliminar la lignina solubilizada, el ácido acético, las acetamidas, las alquilamidas y el exceso de reactivo, y entonces es digerida con un consorcio de enzimas de sacarización para producir azúcares fermentables. A continuación los azúcares pueden ser procesados para producir uno o más productos diana. La lignina eliminada también puede ser procesada adicionalmente y utilizarse para otros propósitos (tal como combustión para obtener energía) para mejorar la eficiencia.

### Definiciones

En la presente descripción se usan las siguientes definiciones:

50 “Temperatura ambiente” y “ambiental” cuando se usan en referencia a la temperatura se refieren a cualquier temperatura de entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 25 °C.

“Azúcares fermentables” se refiere a un contenido de azúcares que comprende principalmente monosacáridos y disacáridos (que pueden ser usados fuente de carbono por un microorganismo (puede haber presente algunos polisacáridos)) en un proceso de fermentación para producir un producto diana. “Azúcares fácilmente fermentables” significa que no es necesario ningún procesado costoso adicional y/o que se puede poner en contacto un

microorganismo fermentativo con los azúcares resultantes con mínimos impedimentos de inhibidores u otros componentes que puedan afectar negativamente a la fermentación.

5 “Lignocelulósico” se refiere a material que comprende lignina y celulosa. El material lignocelulósico también puede comprender hemicelulosa. En los procesos descritos en la presente memoria, la lignina se disuelve y se elimina sustancialmente de la biomasa lignocelulósica para producir una biomasa enriquecida en carbohidratos.

10 “Hemicelulosa” se refiere a un carbohidrato de cadena ramificada heteropolimérico que está presente en casi todas las paredes de las células vegetales junto con la celulosa. Está compuesta principalmente de azúcares de pentosa, principalmente xilosa, pero también arabinosa, a través de la cual frecuentemente se encuentra esterificada con la lignina. También puede contener ácidos urónicos de seis carbonos y algunos azúcares de hexosa, glucosa, galactosa, mannososa y rhamnosa. La hemicelulosa tiene una estructura aleatoria amorfa de baja consistencia y se hidroliza fácilmente con ácidos o bases diluidos y con enzimas hemicelulasa.

“Alto rendimiento de retención de hemicelulosa”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la retención de  $\geq 85\%$  de la hemicelulosa presente en el material de partida.

15 “Lignina disuelta” tal como se refiere en la presente memoria significa la lignina que se disuelve en una disolución de disolvente orgánico.

“Todo lignina” se refiere a lignina insoluble en ácido.

“Autohidrólisis” se refiere a la hidrólisis de biomasa en presencia de disolvente (agua o disolvente orgánico más agua) más calor sin ninguna adición más, tal como sin adición de ácido o base exógenos o enzima hidrolítica.

“Celulósico” se refiere a una composición que comprende celulosa.

20 “Producto diana” se refiere a un compuesto químico, combustible o elemento básico de construcción química producido mediante fermentación. El producto se usa en un sentido amplio e incluye moléculas tales como las proteínas, que incluyen, por ejemplo, péptidos, enzimas y anticuerpos. También se contemplan dentro de la definición de producto diana el etanol y el butanol.

25 “Peso seco de biomasa” se refiere al peso de la biomasa a la que se ha retirado toda o esencialmente toda la humedad. El peso seco se mide habitualmente según la norma de la American Society for Testing and Materials (ASTM) E1756-01 (“Standard Test Method for Determination of Total Solids in Biomass”) o mediante la norma de la Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Inc. (TAPPI) T-412 om-02 (“Moisture in Pulp, Paper and Paperboard”).

“Extracción selectiva” significa la eliminación de lignina que a la vez retiene sustancialmente los carbohidratos.

30 Una “disolución de disolvente” y “una disolución de disolvente orgánico”, tal como se usan en la presente memoria, son una mezcla de disolvente orgánico en agua que incluye cualquier líquido orgánico que disuelva un soluto sólido, líquido o gas, dando como resultado una disolución. Las disoluciones de disolvente más adecuadas para esta invención son disolventes orgánicos tales como etanol, metanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, 2-butanol, isobutanol, t-butanol, pentanol y hexanol y dioles con el mismo número de carbonos. También pueden incluir disolventes apróticos. Las disoluciones de disolvente pueden incluir componentes adicionales mezclados con la disolución, por ejemplo, la disolución de disolvente puede incluir uno o más nucleófilos.

40 “Biomasa” y “biomasa lignocelulósica” tal como se usan en la presente memoria se refieren a cualquier material lignocelulósico, que incluye material celulósico y hemi-celulósico, por ejemplo, cultivos bioenergéticos, residuos agrícolas, residuos sólidos urbanos, residuos sólidos industriales, residuos de parques y jardines, madera, residuos forestales y combinaciones de los mismos, tal como se describe en más detalle más adelante. La biomasa tiene un contenido de carbohidratos que comprende polisacáridos y oligosacáridos y también puede comprender componentes adicionales, tales como proteínas y/o lípidos.

45 “Altamente conservado”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere al contenido de carbohidratos del material lignocelulósico después de las etapas de procesado descritas en la presente memoria. En una realización de la invención, el contenido de carbohidratos altamente conservado proporciona rendimientos a azúcar tras la sacarificación que sustancialmente similares a los rendimientos teóricos con pérdidas mínimas en el rendimiento de azúcar en los procesos descritos en la presente memoria. En una realización de la invención, altamente conservado en referencia al contenido de carbohidratos se refiere a la conservación de una cantidad igual o superior al 85% de los carbohidratos de la biomasa en comparación con la biomasa antes del pretratamiento descrito en la presente memoria.

50 “Preprocesamiento” tal como se usa en la presente memoria se refiere al procesamiento de biomasa lignocelulósica antes del pretratamiento. El preprocesamiento es cualquier tratamiento de biomasa que prepara la biomasa para el pretratamiento, tal como una molienda mecánica y/o un secado hasta el contenido de humedad apropiado.

- “Suspensión de biomasa-disolvente” se refiere a una mezcla de biomasa y disolvente. La disolución biomasa-disolvente puede comprender componentes adicionales tales como uno o más reactivos de alquilamina, amoníaco, sulfuro, etc.
- 5 “Sacarificación” se refiere a la producción de azúcares fermentables a partir de polisacáridos principalmente mediante la acción de enzimas hidrolíticas. La producción de azúcares fermentables a partir de biomasa pretratada se produce mediante sacarificación enzimática por acción de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas.
- 10 “Pretratar biomasa” o “pretratamiento de biomasa” tal como se usa en la presente memoria se refiere a someter a biomasa nativa o preprocesada a una acción química o física, o cualquier combinación de las mismas, haciendo a la biomasa más susceptible a la sacarificación enzimática o a otros medios de hidrólisis antes de la sacarificación. Por ejemplo, los métodos reivindicados en la presente memoria pueden considerarse procesos de pretratamiento que contribuyen a hacer la biomasa más accesible a enzimas hidrolíticas para la sacarificación.
- “Filtrado de pretratamiento” significa el líquido libre que está en contacto con la biomasa después del pretratamiento y que es separado por filtración.
- 15 “Biomasa pretratada” tal como se usa en la presente memoria se refiere a biomasa nativa o preprocesada que ha sido sometida a acción química o física, o a cualquier combinación de las mismas, que hace la biomasa más susceptible a la sacarificación enzimática u a otros medios de hidrólisis previos a la sacarificación.
- El “secado al aire de la biomasa filtrada” se puede llevar a cabo dejando que la biomasa se seque en equilibrio con el aire ambiental atmosférico.
- 20 “Biomasa fácilmente sacarificable” se refiere a biomasa que está enriquecida en carbohidratos y que es más susceptible a hidrólisis por enzimas celulolíticas o hemicelulolíticas para producir azúcares oligoméricos, es decir, biomasa pretratada como la descrita en la presente memoria.
- “Enriquecido en carbohidratos” tal como se usa en la presente memoria se refiere a la biomasa producida mediante los procesos de tratamiento descritos en la presente memoria. En una realización, la biomasa enriquecida en carbohidratos fácilmente sacarificable producida mediante los procesos descritos en la presente memoria tiene una concentración de carbohidratos superior o igual a 85% de la biomasa seca en peso, y habiendo eliminado el 75% o más del contenido en lignina de la biomasa inicial en base al peso seco.
- 25 “Calentar la suspensión de biomasa” significa someter la biomasa suspendida en un disolvente a una temperatura superior a la ambiental o a temperatura ambiente. Las temperaturas relevantes a los presentes pretratamientos se encuentran entre aproximadamente 100 y aproximadamente 220°C, o desde aproximadamente 140 y aproximadamente 180°C, o cualquier temperatura dentro o aproximadamente en estos intervalos.
- 30 “Filtrar el líquido libre a presión” significa la eliminación del líquido no ligado mediante filtración, con alguna diferencia de presión en las caras opuestas del filtro.
- “Alcalino” o “en condiciones alcalinas” significan un pH superior a 7,0. En la presente invención, “en condiciones alcalinas” también significa un pH de la suspensión de biomasa-disolvente igual o superior a los pKas de los nucleófilos presentes, de tal modo que éstos son desprotonados sustancialmente y más altamente reactivos que en sus estados protonados. Dichos nucleófilos incluirían alquilamina y amoníaco, tioles, polisulfuros e hidrosulfuro (si está presente).
- 35 “Alcano divalente” significa un alcano lineal, ramificado o cíclico con dos valencias abiertas.
- “Contenido de carbohidratos” significa el porcentaje de la materia seca de una muestra de biomasa lignocelulósica que es atribuible a glucano, xilano y arabinano, e incluye los carbohidratos de celulosa y hemicelulosa.
- 40 “Retener sustancialmente el contenido de carbohidratos” significa la retención de la cantidad máxima (por ejemplo,  $\geq 85\%$  del contenido original) de cada uno de glucano, xilano y arabinano en un proceso de pretratamiento aplicado a biomasa lignocelulósica.
- 45 “Muestra secada al aire” significa una muestra pretratada que se ha dejado secar al aire a temperatura y presión ambientales hasta el punto en que su contenido de humedad está en equilibrio con el del aire ambiental, típicamente  $\geq 85\%$  de materia seca.
- “Biomasa sustancialmente libre de lignina” significa una muestra pretratada en la que aproximadamente  $\geq 75\%$  de la lignina ha sido eliminada.
- 50 “Biomasa seca” significa biomasa con un contenido en materia seca de  $\geq 85\%$ . Los métodos para secar la biomasa incluyen la exposición a temperatura ambiente a vacío o con un flujo de aire a presión atmosférica y/o calentando en un horno o en un horno a vacío.
- “Disolvente multicomponente” significa un disolvente que contiene un disolvente orgánico, agua y reactivos capaces de atacar químicamente la lignina.

“Recipiente a presión” es un recipiente sellado que puede estar equipado o no con un mecanismo de agitación de una suspensión biomasa/disolvente, en la que se desarrolla una presión positiva tras calentar la biomasa lignocelulósica.

5 “Nucleófilo” es un reactivo químicamente capaz de formar un enlace covalente con su pareja de reacción contribuyendo con los dos electrones del enlace.

“Hidrolisato” se refiere al líquido en contacto con la biomasa de lignocelulosa que contiene los productos de reacciones hidrolíticas que actúan sobre la biomasa (tanto enzimáticas como no), en este caso azúcares monoméricos y oligoméricos.

10 “Organosolv” significa una mezcla de disolvente orgánico y agua que habitualmente está en contacto con biomasa y en la que la lignina o sus fragmentos son solubles.

“Consortio de enzimas” o “consorcio de enzimas de sacarificación” es una colección de enzimas, normalmente secretadas por un microorganismo, que en el presente caso contendrá típicamente una o más celulasas, xilanasas, glicosidasas, ligninasas y esteratasas.

15 “Azúcares monoméricos” o “azúcares simples” consisten en una unidad individual de pentosa o hexosa, por ejemplo, glucosa, xilosa y arabinosa.

“Deslignificación” es el acto de eliminar lignina de biomasa lignocelulósica. En el contexto de esta solicitud, deslignificación significa fragmentación y extracción de lignina de biomasa lignocelulósica con una elevada retención de carbohidratos, particularmente con respecto a la hemicelulosa, usando un disolvente orgánico en condiciones alcalinas a temperaturas elevadas en presencia de amoníaco y opcionalmente de varios nucleófilos.

20 “Fragmentación” es un proceso en el que la biomasa lignocelulósica es tratada con un disolvente orgánico en condiciones alcalinas que descomponen la lignina en subunidades más pequeñas.

“Extracción selectiva” es un proceso mediante el cual la lignina fragmentada se disuelve mediante el tratamiento con un disolvente orgánico en condiciones alcalinas que dejan atrás el polisacárido.

25 “Fragmentación y extracción selectiva simultáneas” tal como se usa en la presente memoria se refiere a una reacción de fragmentación llevada a cabo en un disolvente orgánico de tal modo que los fragmentos de lignina pasen a la disolución según vayan siendo liberados de la biomasa.

Se proporcionan métodos para pretratar biomasa lignocelulósica para producir biomasa enriquecida en carbohidratos fácilmente sacarificable, con un elevado rendimiento de retención de hemicelulosa. Dichos métodos proporcionan procesos económicos para hacer que determinados componentes de la biomasa lignocelulósica sean más accesibles o más susceptibles a la sacarificación enzimática. El pretratamiento puede ser químico o físico, o cualquier combinación de ambos. En esta descripción el pretratamiento se lleva a cabo en presencia de NH<sub>3</sub> y opcionalmente una base adicional. La presencia de un disolvente orgánico y las condiciones alcalinas ayudan a la fragmentación y eliminación de lignina y a la recuperación de carbohidratos.

35 Adicionalmente, los métodos descritos en la presente descripción minimizan la pérdida de carbohidratos durante el proceso de pretratamiento y maximizan el rendimiento de azúcares solubilizados (monoméricos + oligoméricos) en la sacarificación.

Tal como se ha indicado antes, los métodos descritos en la presente memoria incluyen el pretratamiento de material lignocelulósica, con una disolución de disolvente que comprende de bajas a moderadas concentraciones de amoníaco y uno o más nucleófilos como los descritos más adelante, para producir una biomasa enriquecida en carbohidratos sacarificables con un elevado rendimiento de retención de hemicelulosa.

#### Disolventes

Los métodos descritos en la presente memoria incluyen el uso de una disolución de disolvente orgánico para pretratar biomasa y específicamente para la fragmentación y extracción de lignina. Los disolventes útiles en los presentes métodos se denominan frecuentemente en la técnica Organosolv (por ejemplo, E. Muurinen (2000) Organosolv Pulping: A review and distillation study related to peroxyacid pulping, Tesis, Universidad de Oulu, página 314; S. Aziz, K. Sarkanen, Tappi J., 72/73: 169-175, 1989; A. K. Varsheny y D. Patel, J. Sci. Ind. Res., 47: 315-319, 1988; A. A. Shatalov y H. Pereira, BioResources 1: 45-61, 2006; T. N. Kleinert, Tappi J., 57: 99-102, 1979; se ha descrito la aplicación de la tecnología organosolv a biocombustibles, derivada de Kleinert, que lo ha llevado a escala de planta piloto usando EtOH/H<sub>2</sub>O (WO 2007/051269), y X. Pan, N. Gilkes, J. Kadla, K. Pye, S. Saka, D. Gregg, K. Ehara, D. Xie, D. Lam y J. Saddler, Biotechnol. Bioeng., 94: 851-861, 2006. Aunque todavía a escala de laboratorio, el uso de acetona/H<sub>2</sub>O se describe en la Patente de EE.UU. 4.470.851. Se pueden encontrar detalles adicionales sobre las tecnologías de pretratamiento relativos al uso de disolventes y otros pretratamientos en Wyman y col., (Bioresource Tech., 96: 1959, 2005); Wyman y col., (Bioresource Tech., 96: 2026, 2005); Hsu, (“Pretreatment of biomass” en Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, Taylor y Francis, editores, páginas 179-

45  
50

212, 1996); y Mosier y col., (Bioresource Tech., 96: 673, 2005). Los disolventes se usan en la presente memoria para pretratar biomasa a fin de eliminar lignina. Las deslignificación se lleva a cabo habitualmente a temperaturas de 165 – 225 °C, con relaciones de líquido a biomasa de 4:1 a 20:1, con composiciones de líquido del 50% de disolvente orgánico (v/v), y tiempos de reacción entre 0,5 y 12 horas. Como disolventes se han evaluado una serie de mono- y poli-hidroxi-alcoholes. En estas reacciones se han usado etanol, butanol y fenol (Park, J. K., y Phillips, J. A., Chem. Eng. Comm., 65: 187-205, 1988).

El pretratamiento organosolv o con disolución de disolvente orgánico de los presentes métodos puede comprender una mezcla de agua y un disolvente orgánico a los parámetros de condiciones seleccionadas que incluyen temperatura, tiempo, presión, relación disolvente-agua y la relación sólidos-líquidos. El disolvente puede comprender, aunque sin limitación, alcoholes y disolventes apróticos (disolventes que no tienen un átomo de hidrógeno unido a un oxígeno como en un grupo hidroxilo o a un nitrógeno como en un grupo amino, por ejemplo las cetonas). Los alcoholes pueden incluir metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol y hexanol y sus isómeros y dioles con el mismo número de átomos de carbono, tales como 1,2-etanodiol, 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, 1,3-hexanodiol.

La concentración de disolvente en la disolución (es decir, agua) en la presente invención oscila entre aproximadamente 2 y aproximadamente 90% (v/v), o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 85% o entre aproximadamente 20% y aproximadamente 80% o entre aproximadamente 30% y aproximadamente 80% o más, preferiblemente entre aproximadamente 40% y aproximadamente 70% (v/v). Específicamente, para el propósito de una realización de los métodos de la presente memoria, se examinaron mezclas de EtOH en H<sub>2</sub>O de aproximadamente 0% - 80% (v/v) de concentración de etanol y se observó que las disoluciones que contenían 40-70% (v/v) de EtOH eran las más efectivas.

#### Amoníaco

El amoníaco es un reactivo de bajo coste y por tanto proporciona un medio económico para el pretratamiento de biomasa. El amoníaco también puede recircularse al reactor de pretratamiento durante el pretratamiento o después del pretratamiento, permitiendo de este modo un beneficio económico adicional. El amoníaco se reparte entre la fase líquida y la fase vapor y el amoníaco gaseoso puede difundirse más fácilmente a través de la biomasa que una base líquida, dando como resultado un pretratamiento más eficaz a menores concentraciones. Por ejemplo, después del pretratamiento, al disminuir la temperatura hasta la adecuada para la sacarificación, el amoníaco gaseoso puede desprenderse, opcionalmente en presencia de vacío, y ser recirculado. En un proceso continuo se puede recircular continuamente el amoníaco.

En una realización, el pretratamiento con amoníaco, a concentraciones de bajas a moderadas, incrementa las recuperaciones de carbohidratos de la biomasa. Puesto que el NH<sub>3</sub> forma una imina con los extremos reductores de las cadenas de polisacárido, es probable que esta reacción inhiba las reacciones deβ-eliminación responsables de la pérdida de azúcares en un "pelado" a pH alcalino. El NH<sub>3</sub> también puede producir la amonólisis de lignina que probablemente aumenta al aumentar la concentración de EtOH por una disminución de pKa de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub> (aumentando la relación NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Esta reacción también puede disminuir la formación de metiluros de quinona. El resultado de concentraciones bajas o moderadas de la adición de NH<sub>3</sub> es, por lo tanto, un aumento adicional de la retención de glucano y xilano en las condiciones superiores de pretratamiento con EtOH en H<sub>2</sub>O.

En otra realización, se puede usar amoníaco (NH<sub>3</sub>) solo o en adición a NaOH como componente adicional de la disolución de disolvente. La concentración de amoníaco usada en el presente método es como mínimo una concentración suficiente para mantener alcalino el pH de la mezcla de biomasa-amoníaco acuoso y, como máximo, inferior o igual a aproximadamente 16% p/p, o aproximadamente 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18% ó 20% respecto al peso seco de biomasa. Esta baja concentración de amoníaco es suficiente para el tratamiento de acuerdo con respecto a los presentes métodos. Se ha publicado el uso de una combinación de altas concentraciones de amoníaco y pretratamiento organosolv para la deslignificación de álamo (Park, J.-K., y Phillips, J. A., Chem. Eng. Commun., 65, 187-205, 1988). Estos experimentos requerían la aplicación de una elevada relación de líquidos a sólidos en el pretratamiento y dieron como resultado una pérdida sustancial de hemicelulosa y una baja sacarificación enzimática de la celulosa.

Tal como se muestra aquí en el Ejemplo 3, el amoníaco es más efectivo en los métodos reivindicados cuando está suplementado con concentraciones bajas de NaOH. El uso de amoníaco como fuente alcalina, particularmente a las concentraciones bajas o moderadas descritas en esta solicitud, no genera el problema de residuos inherente al uso solamente de NaOH, ya que el amoníaco no reaccionado puede recircularse fácilmente.

Además, los métodos descritos en la presente descripción minimizan la pérdida de carbohidratos durante el proceso de pretratamiento y maximizan el rendimiento de azúcares solubilizados (monoméricos + oligoméricos) en la sacarificación.

Tal como se ha indicado antes, los métodos descritos en la presente memoria incluyen pretratar al material lignocelulósico con una disolución de disolvente que comprende los componentes descritos más adelante para producir una biomasa enriquecida en carbohidratos fácilmente sacarificable con un elevado rendimiento de retención de hemicelulosa.



Componentes adicionales de la disolución de disolvente

En una realización, se puede emplear NaOH como componente adicional de la disolución de disolvente. Se puede usar NaOH específicamente en una disolución de disolvente de EtOH en H<sub>2</sub>O y el uso de NaOH puede incluir la adición de un catalizador, tal como antraquinona, a la disolución de disolvente para facilitar la fragmentación de lignina.

- 5 El NaOH podría usarse a varias concentraciones, tal como en una cantidad que es al menos de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 20% (p/p de biomasa). Las concentraciones más adecuadas incluyen, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10% (p/p de biomasa). Las concentraciones más adecuadas se encuentran entre aproximadamente 2 y 8 % (p/p de biomasa). La adición de aproximadamente un 8% (p/p de biomasa) de NaOH a un disolvente que contiene un 20-80% de etanol en agua (v/v) y ~0,5% de antraquinona (AQ) (p/v) como catalizador de la fragmentación de lignina dio como resultado un aumento de la retención de xilano en el pretratamiento respecto a la autohidrólisis (llevada a cabo solo en EtOH/H<sub>2</sub>O).

- 10 Las realizaciones de los presentes métodos incluyen disoluciones de disolvente que comprenden 20-80% v/v de etanol en H<sub>2</sub>O con un 2% a 20% de NH<sub>3</sub> (p/p de biomasa) y un 0,5 a 8% de NaOH (p/p de biomasa). La recuperación óptima se observó para el bagazo de caña de azúcar con un 40-70% de EtOH en H<sub>2</sub>O (v/v) y un 6% de NH<sub>3</sub> (p/p de biomasa) y un 2% de NaOH (p/p de biomasa). Se observó un aumento de la extracción de lignina al aumentar el EtOH en H<sub>2</sub>O y probablemente refleja el aumento de solubilidad de los fragmentos de lignina y el aumento de NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> al aumentar el EtOH en H<sub>2</sub>O debido a la disminución de la polaridad del disolvente. El mayor rendimiento enzimático a azúcares y de extracción de lignina con NH<sub>3</sub> más NaOH en contraposición a NH<sub>3</sub> solo es probablemente consecuencia del mayor pH del primero, que da como resultado una mayor concentración de NH<sub>3</sub> no protonado, y produce una mayor amonólisis de lignina y de enlaces de éster de hemicelulosa, un aumento de la hidrólisis debido a una mayor concentración de OH<sup>-</sup>, en presencia de NaOH en el pretratamiento, y una menor caída del pH debido a la hidrólisis de los grupos acetilos de la hemicelulosa.

- 15 Según el presente método, la disolución de disolvente orgánico que comprende amoníaco puede comprender opcionalmente al menos una base (inorgánica) adicional, tal como hidróxido sódico (como se ha discutido antes), carbonato sódico, hidróxido potásico, carbonato potásico, hidróxido cálcico y carbonato cálcico. Se puede añadir al menos una base adicional en una cantidad que está combinada con amoníaco para formar una cantidad de base total que es inferior a aproximadamente el 20% p/p relativo al peso seco de biomasa. Preferiblemente, la base adicional más amoníaco está en una cantidad que es inferior a aproximadamente el 20%, o aproximadamente 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18% ó 20% respecto al peso seco de biomasa.

- 20 La base inorgánica podría usarse a varias concentraciones de al menos entre 0,5% y aproximadamente 16% (% p/p de biomasa seca). Más adecuadas son las concentraciones entre 1% y 10%. Lo más adecuado son las concentraciones entre 2% y 8%.

Biomasa lignocelulósica

- 25 La biomasa lignocelulósica pretratada en la presente memoria incluye, aunque sin limitación, cultivos bioenergéticos, residuos agrícolas, residuos sólidos urbanos, residuos sólidos industriales, lodos de fabricación de papel, residuos de jardinería, madera y residuos forestales. Los ejemplos de biomasa incluyen, aunque sin limitación, mazorcas de maíz, residuos de cultivo tales como vainas de maíz, forraje de maíz, hierbas, trigo, paja de trigo, cebada, paja de cebada, heno, paja de arroz, switchgrass, residuos de papel, bagazo de caña de azúcar, paja de caña de azúcar, álamo amarillo, sorgo, soja, componentes obtenidos del procesado de granos, árboles, ramas, raíces, hojas, astillas de madera, serrín, matas y arbustos, verduras, frutas, flores y estiércol de animales.

- 30 En una realización, la biomasa lignocelulósica incluye residuos agrícolas tales como forraje de maíz, paja de trigo, paja de cebada, paja de avena, paja de arroz, paja de canola y forraje de soja; hierbas tales como switchgrass, miscanto, espartillo, alpiste de caña; residuos de proceso de fibras tales como fibra de maíz, pulpa de remolacha, finos y rechazos de molinos de pulpa y bagazo de caña de azúcar; paja de caña de azúcar y sorgo; residuos forestales tales como álamo amarillo, madera de álamo temblón, otras maderas duras, maderas blandas y serrines; y productos de papel de residuos post-consumidor; así como otros cultivos o material lignocelulósico suficientemente abundante.

En otra realización, la biomasa que es útil para la invención incluye biomasa que tiene un contenido de carbohidratos relativamente elevado, es relativamente densa y/o es fácil de recolectar, transportar, almacenar y/o manejar.

- 35 En otra realización de la invención, la biomasa que es útil incluye mazorcas de maíz, forraje de maíz, bagazo de caña de azúcar, paja de caña de azúcar, álamo amarillo y switchgrass.

La biomasa lignocelulósica puede derivar de una única fuente, o puede comprender una mezcla derivada de más de una fuente; por ejemplo, la biomasa podría comprender una mezcla de mazorcas de maíz y forraje de maíz, o una mezcla de tallos o espigas y hojas.

- 40 En el presente método, el peso seco de biomasa está a una concentración inicial de al menos aproximadamente 9% hasta aproximadamente 80% del peso de la suspensión de biomasa-disolvente durante el pretratamiento. De forma

más adecuada, el peso seco de biomasa está a una concentración de entre aproximadamente 15% y aproximadamente 70%, de 15% a aproximadamente 60%, o de aproximadamente 15% a aproximadamente 50% del peso de la suspensión de biomasa-disolvente. El porcentaje de biomasa en la suspensión de biomasa-disolvente se mantiene elevado para reducir el volumen total de material de pretratamiento, disminuyendo la cantidad de disolvente y de reactivos requerida para hacer el proceso más económico.

La biomasa se puede usar directamente tal cual se obtiene de la fuente, o puede someterse a algún preprocesamiento, por ejemplo, se puede aplicar energía a la biomasa para reducir el tamaño, aumentar el área superficial expuesta y/o aumentar la accesibilidad de la lignina y la celulosa, hemicelulosa y/o los oligosacáridos presentes en la biomasa al pretratamiento organosolv y a las enzimas de sacarificación usadas, respectivamente, en la segunda y tercera etapas del método. Los medios energéticos útiles para reducir el tamaño, aumentar el área superficial expuesta, y/o aumentar la accesibilidad de la lignina, y la celulosa, hemicelulosa y/o los oligosacáridos presentes en la biomasa del pretratamiento organosolv y a las enzimas de sacarificación, incluyen, aunque sin limitación, molienda, aplastamiento, pulverización, ruptura, troceado, refinado con discos, ultrasonidos y microondas. Esta aplicación de energía puede producirse antes o durante el pretratamiento, antes o durante la sacarificación, o cualquier combinación de los mismos.

El secado antes del pretratamiento puede producirse también por medios convencionales, tal como la exposición a temperatura ambiente a vacío o a un flujo de aire a presión atmosférica y/o calentar en un horno a presión atmosférica o en un horno a vacío.

#### Condiciones de pretratamiento

El pretratamiento de biomasa con una disolución de disolvente orgánico que comprende amoníaco y uno o más nucleófilos, en condiciones alcalinas, se lleva a cabo en cualquier recipiente adecuado. Habitualmente el recipiente es uno que pueda soportar presión, que tenga un mecanismo de calefacción, y que tenga un mecanismo para mezclar los componentes. Los recipientes disponibles comercialmente incluyen, por ejemplo, el reactor Zipperclave® (Autoclave Engineers, Erie, PA), el reactor Jaygo (Jaygo Manufacturing, Inc., Mahwah, NJ), y un reactor de pistola de vapor (descrito en General Methods Autoclave Engineers, Erie, PA). Se pueden usar reactores de escala muy superior con capacidades similares. Alternativamente, la biomasa y la disolución organosolv pueden combinarse en un recipiente, y a continuación ser transferidos a otro reactor. También la biomasa puede ser tratada en un recipiente, y a continuación ser procesada adicionalmente en otro reactor tal como un reactor de pistola de vapor (descrito en General Methods; Autoclave Engineers, Erie, PA).

La reacción de pretratamiento puede llevarse a cabo en cualquier recipiente adecuado, tal como un reactor por cargas o un reactor continuo. El especialista en la técnica reconocerá que a temperaturas superiores (por encima de 100°C) se requiere un recipiente a presión. El recipiente adecuado puede estar equipado con un sistema de agitación de la mezcla de biomasa-organosolv, tal como turbinas (en Perry, R.H. y Chilton, C.H. (editores), Chemical Engineers's Handbook, 5ª edición (1973) Capítulo 4, McGraw-Hill, NY). La reacción de pretratamiento puede llevarse a cabo por cargas o en un proceso en continuo.

Antes de poner en contacto la biomasa con el disolvente, se debe aplicar vacío al recipiente que contiene la biomasa. Evacuando el aire de los poros de la biomasa se puede lograr una mejor penetración del disolvente en la biomasa. El periodo de tiempo para aplicar vacío y la cantidad de presión negativa que se aplica a la biomasa dependerá del tipo de biomasa y se puede determinar empíricamente de tal modo que se logre un pretratamiento óptimo de la biomasa (determinado a través de la producción de azúcares fermentables después de la sacarificación).

El calentamiento de la biomasa con disolvente se lleva a cabo a una temperatura de entre aproximadamente 100 °C a aproximadamente 220 °C, aproximadamente 150 °C a 200 °C, o aproximadamente 165 °C a 195 °C. La disolución calentada puede enfriarse rápidamente hasta temperatura ambiente. En otra realización adicional, la calefacción de la biomasa se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 180 °C. La calefacción de la suspensión de biomasa-disolvente se puede producir durante aproximadamente 5 minutos hasta aproximadamente 5 horas, o durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 3 horas, o más preferiblemente de aproximadamente 1 a 2 horas.

El pretratamiento de biomasa con la disolución de disolvente orgánico y amoníaco se produce en condiciones alcalinas a un pH que es igual o superior al pKa de los nucleófilos presentes. En estas condiciones de alto pH, al menos el 50% de los nucleófilos están en sus estados desprotonados. La desprotonación normalmente aumenta la reactividad de los nucleófilos. Los nucleófilos presentes, además del amoníaco, pueden incluir alquilaminas, polisulfuros (hidropolisulfuros) y sulfuros (hidrosulfuros) y tioles.

Para los métodos de pretratamiento descritos en la presente memoria, la temperatura, pH, tiempo de pretratamiento y la concentración de reactivos tales como el disolvente orgánico y el amoníaco y el nucleófilo adicional, la concentración de biomasa, el tipo de biomasa y el tamaño de partícula de la biomasa, están relacionados; por tanto dichas variables pueden ajustarse según sea necesario para cada tipo de biomasa a fin de optimizar los procesos de pretratamiento descritos en la presente memoria.

Después del pretratamiento a elevada temperatura, la biomasa se filtra a presión. La filtración puede venir precedida o no de un enfriamiento. Después de la filtración, la biomasa puede lavarse una o más veces con disolvente orgánico hidratado a temperatura ambiente o elevada. A continuación se puede lavar con agua o se puede secar para eliminar el disolvente orgánico y entonces ser sacarificada. Los métodos para secar la biomasa se han descrito antes.

Para determinar la eficacia del pretratamiento, es decir, la producción de biomasa enriquecida en carbohidratos fácilmente sacarificables, con una elevada retención de hemicelulosa, y la posterior sacarificación, separadamente o en conjunto, se puede determinar el rendimiento teórico de azúcares derivables de la biomasa inicial y compararlo con los rendimientos medidos. La eficacia del pretratamiento puede establecerse además relacionando cómo afectan las cargas de enzimas a los rendimientos a producto en la eficacia global de sistema.

#### Procesamiento adicional

##### Sacarificación

Después del pretratamiento, la biomasa enriquecida en carbohidratos fácilmente sacarificables comprende una mezcla de disolvente orgánico, amoníaco, nucleófilo, lignina fragmentada y extraída y polisacáridos. Antes de un procesamiento adicional, el amoníaco, el nucleófilo y los fragmentos de lignina pueden eliminarse de la biomasa pretratada mediante filtración y lavando la muestra con EtOH en H<sub>2</sub>O (de 0% a 100% de EtOH v/v). La biomasa puede lavarse con agua para eliminar EtOH o secarse dando como resultado una biomasa enriquecida en carbohidratos, fácilmente sacarificables, y se puede determinar la concentración de glucano, xilano y el contenido en lignina insoluble ácida de dicha biomasa usando medios analíticos bien conocidos en la técnica. Un beneficio real de esta invención es que la biomasa pretratada puede ser lavada con agua o puede secarse para la sacarificación. La biomasa enriquecida en carbohidratos fácilmente sacarificables, con un elevado rendimiento de retención de hemicelulosa, puede entonces continuar hidrolizándose en presencia de un consorcio de enzimas de sacarificación para liberar oligosacáridos y/o monosacáridos en un hidrolisato.

Se pueden añadir tensioactivos tales como Tween 20 o Tween 80 o polioxietilenos tales como PEG 2000, 4000 u 8000 para mejorar el proceso de sacarificación (Patente de EE.UU. 7.354.743 B2). La adición de tensioactivo (por ejemplo, Tween 20) a la sacarificación enzimática a menudo potencia la velocidad y el rendimiento de la liberación de azúcares monoméricos. Es probable que el tensioactivo recubra cualquier lignina residual, disminuyendo la unión no productiva de la enzima de la lignina. Una estrategia alternativa es potenciar la extracción de lignina en el pretratamiento o modificar la lignina químicamente de tal modo que no se pierda menos enzima por adsorción sobre lignina.

Las enzimas y los métodos de sacarificación para el tratamiento de biomasa son revisados en Lynd, L. R. y col. (Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66: 506-577, 2002). El consorcio de enzimas de sacarificación puede comprender una o más glicosidasas; las glicosidasas pueden seleccionarse del grupo que consiste en glicosidasas que hidrolizan celulosa, glicosidasas que hidrolizan hemicelulosa y glicosidasas que hidrolizan almidón. Otras enzimas del consorcio de enzimas de sacarificación pueden incluir peptidasas, lipasas, ligninasas y esteratasas.

El consorcio de enzimas de sacarificación comprende una o más enzimas seleccionadas principalmente, aunque no exclusivamente, del grupo de "glicosidasas" que hidrolizan los enlaces éter de di-, oligo- y poli-sacáridos, y se encuentran en la clasificación enzimática EC 3.2.1.x (Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego, CA, con el Suplemento 1 (1993), Suplemento 2 (1994), Suplemento 3 (1995), Suplemento 4 (1997) y Suplemento 5 [en Eur. J. Biochem., 223: 1-5, 1994; Eur. J. Biochem., 232: 1-6, 1995; Eur. J. Biochem., 237: 1-5, 1996; Eur. J. Biochem., 250: 1-6, 1997; y Eur. J. Biochem., 264: 610-650, 1999, respectivamente]) del grupo general "hidrolasas" (EC 3.). Las glicosidasas útiles en el presente método se pueden clasificar por el componente de biomasa que hidrolizan. Las glicosidasas útiles para el presente método incluyen glicosidasas que hidrolizan celulosa (por ejemplo, celulasas, endoglucanasas, exoglucanasas, celobiohidrolasas,  $\beta$ -glucosidasas), glicosidasas que hidrolizan hemicelulosa (por ejemplo, xilanasas, endoxilanasas, exoxilanasas,  $\beta$ -xilosidasas, arabinoxilanasas, mannasas, galactasas, pectinasas, glucuronidasas), y glicosidasas que hidrolizan almidón (por ejemplo, amilasas,  $\alpha$ -amilasas,  $\beta$ -amilasas, glucoamilasas,  $\alpha$ -glucosidasas, isoamilasas). Adicionalmente, puede ser útil añadir otras actividades al 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 esteratasas de feruloilo (EC 3.1.1.73) para ayudar a liberar polisacáridos de otros componentes de la biomasa. Es bien conocido en la técnica que los microorganismos que producen enzimas que hidrolizan polisacáridos a menudo exhiben una actividad, tal como degradación de celulosa, que se ve catalizada por varias enzimas o un grupo de enzimas que tienen diferentes especificidades de sustrato. Por tanto, una "celulasa" de un microorganismo puede comprender un grupo de enzimas, todas las cuales pueden contribuir a la actividad de degradación de celulosa. Las preparaciones de enzimas comerciales o no comerciales, tales como de celulasa, pueden comprender numerosas enzimas dependiendo del esquema de purificación utilizado para obtener la enzima. Por tanto, el consorcio de enzimas de sacarificación del presente método puede comprender una actividad enzimática, tal como de "celulasa", pero sin embargo se reconoce que dicha actividad puede ser catalizada por más de una enzima.

Las enzimas de sacarificación se pueden obtener comercialmente, en forma aislada, tal como Spezyme® CP celulasa (Genencor International, Rochester, NY) y Multifect® xilanasas (Genencor). Adicionalmente, las enzimas de

sacarificación se pueden expresar en organismos hospedantes en la planta de biocombustibles, que incluye usar microorganismos recombinantes.

5 El especialista en la técnica sabría cómo determinar la cantidad efectiva de enzimas a usar en el consorcio y cómo ajustar las condiciones para una actividad enzimática óptima. El especialista en la técnica también sabría cómo optimizar las clases de actividades enzimáticas requeridas en el consorcio para obtener una sacarificación óptima a un producto de pretratamiento dado en las condiciones seleccionadas.

10 Preferiblemente, la reacción de sacarificación se lleva a cabo a la temperatura y pH óptimos para las enzimas de sacarificación, o cerca de ellos. La temperatura óptima usada con el consorcio de enzimas de sacarificación en el presente método oscila entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 100 °C. En otra realización, la temperatura óptima oscila entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 80 °C y más habitualmente 45-50 °C. El pH óptimo puede oscilar entre aproximadamente 2 y aproximadamente 11. En otra realización, el pH óptimo usado con el consorcio de enzimas de sacarificación en el presente método oscila entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5,5.

15 La sacarificación se puede llevar a cabo durante un periodo de aproximadamente varios minutos a aproximadamente 120 horas, y preferiblemente entre aproximadamente varios minutos y aproximadamente 48 horas. El tiempo de reacción dependerá de la concentración de enzimas y de la actividad específica, así como del sustrato usado, su concentración (es decir, la carga de sólidos) y las condiciones ambientales, tal como la temperatura y el pH. El especialista en la técnica puede determinar fácilmente las condiciones óptimas de temperatura, pH y tiempo a usar con un sustrato particular y un consorcio de enzima(s) de sacarificación.

20 La sacarificación se puede llevar a cabo por cargas o como un proceso continuo. La sacarificación también se puede llevar a cabo en una etapa, o en una serie de etapas. Por ejemplo, las diferentes enzimas requeridas para la sacarificación pueden exhibir diferentes óptimos de pH o temperatura. Se puede llevar a cabo un tratamiento primario con enzima(s) a una temperatura y pH, seguido de tratamientos secundarios o terciarios (o más) con diferente(s) enzima(s) a diferentes temperaturas y/o pH. Adicionalmente, el tratamiento con diferentes enzimas en etapas secuenciales pueden ser al mismo pH y/o temperatura, o a diferentes pHs y temperaturas, tal como usar celulasas estables y más activas a pHs y temperaturas superiores seguidas de hemicelulasas que son activas a pHs y temperaturas menores.

25 El grado de solubilización de azúcares a partir de biomasa después de la sacarificación se puede monitorizar midiendo la liberación de monosacáridos y oligosacáridos. Los métodos para medir monosacáridos y oligosacáridos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la concentración de azúcares reductores se puede determinar usando el ensayo de ácido 1,3-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, G. L., Anal. Chem., 31: 426-428, 1959). Alternativamente, los azúcares se pueden medir mediante HPLC usando una columna apropiada, tal como se describe más adelante.

Fermentación a los productos diana:

35 La biomasa enriquecida en carbohidratos fácilmente sacarificables, con un elevado rendimiento de retención de hemicelulosa, producida mediante los presentes métodos puede ser hidrolizada por enzimas tal como se ha descrito antes para producir azúcares fermentables que a continuación pueden ser fermentados en un producto diana. "Fermentación" se refiere a cualquier proceso de fermentación o a cualquier proceso que comprende una etapa de fermentación. Los productos diana incluyen, aunque sin limitación, alcoholes (por ejemplo, arabinitol, butanol, etanol, glicerol, metanol, 1,3-propanodiol, sorbitol y xilitol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido acetónico, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucárico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutárico, ácido 3-hidroxiopropiónico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido málico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido propiónico, ácido succínico y ácido xilónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina, serina y treonina); gases (por ejemplo, metano, hidrógeno (H<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y monóxido de carbono (CO)).

45 Los procesos de fermentación también incluyen procesos usados en la industria de productos de consumo alcohólicos (por ejemplo, cerveza y vino), la industria láctea (por ejemplo, productos lácteos fermentados), la industria del cuero y la industria del tabaco.

50 Además de lo anterior, los azúcares producidos a partir de la sacarificación de la biomasa pretratada tal como se ha descrito en la presente memoria pueden usarse para producir en general productos orgánicos, productos químicos, combustibles, productos químicos de base y especiales tales como xilosa, acetona, acetato, glicina, lisina, ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido láctico), 1,3-propanodiol, butanodiol, glicerol, etilenglicol, furfural, polihidroxiacanoatos, ácido *cis,cis*-mucónico y piensos animales (Lynd, L. R., Wyman, C. E., y Gerngross, T. U., Biocom. Eng. Biotechnol. Prog., 15: 777-793, 1999; y Philippidis, G. P., Cellulose bioconversion technology, en Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, D.C., 179-212, 1996; y Ryu, D. D. Y., y Mandels, M., Cellulases: biosynthesis and applications, Enz. Microb. Technol., 2: 91-102, 1980).

55 También se puede producir la co-producción potencial de productos, tal como múltiples productos orgánicos a partir de carbohidratos fermentables. Los residuos ricos en lignina que quedan después del pretratamiento y la

fermentación se pueden convertir en productos químicos derivados de lignina, moléculas base de construcción química o usarse para producción energética.

5 Los métodos convencionales de fermentación y/o sacarificación son conocidos en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, sacarificación, fermentación, hidrólisis y fermentación separadas (SHF), sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), sacarificación y co-fermentación simultáneas (SSCF), hidrólisis y fermentación híbridas (HHF) y conversión microbiana directa (DMC).

10 La SHF usa etapas de proceso separadas para primero hidrolizar enzimáticamente la celulosa a azúcares tales como glucosa y xilosa y a continuación fermentar los azúcares a etanol. En SSF, la hidrólisis enzimática de celulosa y la fermentación de glucosa a etanol se combinan en una etapa (Philippidis, G. P., ver más arriba). La SSCF incluye la co-fermentación de azúcares múltiples (Sheehan, J. y Himmel, M., Bioethanol, Biotechnol. Prog., 15: 817-827, 1999). La HHF incluye dos etapas separadas llevadas a cabo en el mismo reactor pero a diferentes temperaturas, es decir, una sacarificación enzimática a temperatura elevada seguida de SSF a una menor temperatura de lo que la cepa de fermentación puede tolerar. La DMC combina los tres procesos (producción de celulosa, hidrólisis de celulosa y fermentación) en una etapa (Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., y Pretorius, I. S., Microbiol. Mol. Biol. Rev., 66: 506-577, 2002).

Estos procesos pueden usarse para producir productos diana a partir de biomasa enriquecida en carbohidratos, con un elevado rendimiento de retención de hemicelulosa, producida mediante los métodos de pretratamiento descritos en la presente memoria.

#### Ventajas de los presentes métodos

20 Los métodos descritos en esta invención para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica usando fragmentación y extracción selectiva de lignina a temperaturas elevadas en condiciones alcalinas en combinación con bajas a moderadas concentraciones de amoníaco dan como resultado una mejora significativa en la fragmentación de lignina y en el rendimiento de retención de carbohidratos, particularmente hemicelulosa, proporcionando de este modo un proceso económico para obtener biomasa enriquecida en carbohidratos para sacarificar enzimáticamente. 25 Dicha biomasa produce entonces rendimientos muy elevados de azúcares fermentables (glucosa, así como xilosa) para su bioconversión a productos químicos de valor añadido y a combustibles.

Entre los puntos débiles críticos de los actuales procesos organosolv descritos en la bibliografía se encuentran: bajos rendimientos de recuperación de carbohidratos, particularmente de xilosa, después del pretratamiento, el requerimiento de corrientes separadas de hexosas y pentosas, la producción de productos degradación de azúcares, el uso de grandes cantidades de disolvente y elevados costes inmovilizados. Por ejemplo, determinados procesos existentes incluyen el uso de condiciones ácidas organosolv que producen hidrolisatos de hemicelulosa y celulosa. La mayor fragilidad de la hemicelulosa en condiciones ácidas da como resultado la formación de productos de degradación de xilosa monomérica (por ejemplo, furfural), reduciendo enormemente la recuperación de xilosa (Pan y col., ver más arriba). En una versión de este proceso (Arato, C. Pye, E. K., y Gjennestad, G., Appl. Biochem. Biotech. 121-124: 871-882, 2005), la hemicelulosa es hidrolizada en condiciones ácidas y la celulosa, después de neutralización, es hidrolizada enzimáticamente. La necesidad de neutralizar el ácido antes de la sacarificación, la pérdida parcial de xilosa, y el procesamiento de corrientes separadas de pentosa y hexosa aumentan los costes del proceso. Además, el uso de condiciones ácidas requiere el uso de aleaciones en los reactores y conducciones lo que aumenta sustancialmente los costes inmovilizados de equipamiento.

40 Esta descripción describe el desarrollo de un proceso altamente selectivo en el que la lignina es fragmentada y extraída selectivamente usando reactivos económicos y la hemicelulosa y la celulosa permanecen juntas en la biomasa para ser sacarificadas enzimáticamente posteriormente. Este proceso permite particularmente mantener concentraciones elevadas de la hemicelulosa en la biomasa. La cantidad de lignina extraída en la disolución de disolvente orgánico es  $\geq 75\%$  y los rendimientos de recuperación de xilano y glucano en la biomasa residual están próximos a ser cuantitativos, superando de este modo los puntos débiles de los procedimientos descritos en la bibliografía de pretratamiento de biomasa organosolv, tal como se ha descrito antes. Los elevados rendimientos de recuperación de polisacáridos, según los métodos descritos en esta solicitud, se deben al uso de condiciones alcalinas que disminuyen la hidrólisis de hemicelulosa y la degradación de azúcares, el uso de bajas a moderadas concentraciones de amoníaco, que evita que el polisacárido se pele en condiciones alcalinas, y el elevado contenido de etanol de la disolución de disolvente orgánico, lo que reduce la hidrólisis de hemicelulosa y hace insolubles los oligómeros de xilosa. Adicionalmente, las condiciones alcalinas usadas no requieren el uso de aleaciones exóticas para el equipamiento, disminuyendo de este modo el coste inmovilizado. La realización de este proceso con poco o nada de sales inorgánicas entre los reactivos o productos (por ejemplo, NaOH, NaCO<sub>3</sub>, CaSO<sub>4</sub>) da como resultado poco o ningún coste asociado a la eliminación de material inorgánico residual al final. El reactivo no reaccionado (por ejemplo, EtOH, NH<sub>3</sub>) es reciclable, lo que proporciona beneficios económicos adicionales. Muchos de los procesos descritos en la bibliografía usan grandes relaciones de disolvente a biomasa. En el caso presente, el uso de condiciones alcalinas y la fragmentación sustancial de la lignina por lo nucleófilos añadidos significa que las corrientes de disolvente pueden acumular elevadas concentraciones de lignina, reduciendo la necesidad de grandes volúmenes de disolvente y, al mismo tiempo, reduciendo la pérdida de cantidades traza de carbohidratos solubilizados. Finalmente, el carbohidrato residual se sacarifica bien usando enzimas, probablemente debido al

elevado nivel de extracción de fragmentos de lignina en el pretratamiento, la escisión efectiva de enlaces éster entre hemicelulosa y lignina, y alguna disminución del grado de polimerización del polisacárido. El uso del disolvente orgánico mejora la humectabilidad de la biomasa y la capacidad de las enzimas para penetrar en los poros del sustrato.

## 5 Ejemplos

Pretratamiento de biomasa para obtener biomasa enriquecida en carbohidratos fácilmente sacarificables

El objetivo del trabajo experimental descrito a continuación fue desarrollar un proceso de pretratamiento económico de lignocelulosa que maximice la extracción de lignina y la retención de azúcares en el pretratamiento y producir una biomasa enriquecida en carbohidratos fácilmente sacarificables con un elevado rendimiento de retención de hemicelulosa que puede ser procesada para obtener rendimientos máximos a azúcares monoméricos después de una sacarificación enzimática. La estrategia adoptada fue fragmentar y extraer de forma selectiva la lignina en un disolvente adecuado a la vez que se mantienen los azúcares en el residuo sólido. Los siguientes experimentos demuestran el desarrollo de una disolución de disolvente orgánico que combina la presencia de nucleófilos como el  $\text{NH}_3$  para la extracción selectiva de lignina. La presencia combinada de un disolvente orgánico y de una concentración baja o moderada de  $\text{NH}_3$  y opcionalmente de una base adicional fragmentó y disolvió de forma selectiva los componentes de lignina de la biomasa, proporcionando la generación de una biomasa pretratada que contiene niveles elevados de carbohidratos, particularmente hemicelulosa.

Se molió bagazo de caña en un molino de cuchillas Wiley a través de una pantalla de 1 mm antes del pretratamiento.

En los Ejemplos se usan las siguientes abreviaturas: "HPLC" es cromatografía de líquidos de alta resolución, "C" es grados centígrados o Celsius; "%" es porcentaje; "p" es peso; "p/p" es peso por peso; "mL" es mililitro; "DE" es diámetro exterior; "DI" es diámetro interno; "h" es hora(s); "rpm" es revoluciones por minuto; "EtOH" es etanol; "mg/g" es miligramo por gramo; "g/100 mL" es gramo por 100 mililitros; "N" es normal; "g" es gramo; "NaOH" es hidróxido sódico; "p/v" es peso por volumen; "v/v" es volumen por volumen; " $\text{NH}_3$ " es amoníaco; "mm" es milímetro; "mL/min" es mililitro por minuto; "min" es minutos; "mM" es milimolar.

### Materiales

De Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) se obtuvo ácido sulfúrico, hidróxido amónico, ácido acético, acetamida, extracto de levadura, ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES), fosfato potásico, glucosa, xilosa, triptona, cloruro sódico, ácido cítrico, monometil y dimetilamina. Spezyme CP y Multifect CX12L eran de Genencor (Genencor International, Palo Alto, CA) y Novozyme 188 era de Novozyme (Bagsvaerd, Dinamarca).

### Ejemplo 1

#### Concentración efectiva de etanol

El propósito de este Ejemplo fue examinar el efecto de la concentración de disolvente (por ejemplo, etanol) en agua sobre el rendimiento de recuperación de carbohidratos y sobre la solubilización/extracción de lignina en ausencia de control de pH. Se suspendió el bagazo (0,2 g, 95,78% de materia seca) en 1,56 mL de una disolución de EtOH/agua que contenía varias concentraciones (de 0 a 80%) de EtOH. Las suspensiones se cargaron en tubos de acero inoxidable tipo 316 (1/4 de pulgada de DI, 3/8 de pulgada de DE, 4 pulgadas de largo, es decir DI 0,635 cm, DE 0,953 cm, 10,16 cm de largo) cerrados con ajustes Swagelock (Penn Fluid System Technologies, Huntingdon Valley, PA). Éstos fueron colocados en un baño de arena fluidizado (Techne Model SBS-4, Techne Inc., Burlington, NJ) y calentados a 180 °C durante 2h y enfriados rápidamente sumergiéndolos en un baño de agua a temperatura ambiente. Se extrajeron las muestras de los tubos y se filtraron mediante centrifugación a 14.000 rpm usando filtros Spin-X (Costar, Corning Inc., Corning NY) a temperatura ambiente en una centrífuga de sobremesa (Spectrifuge 16M, Labnet International Inc., Edison, NJ) para eliminar la lignina disuelta. El retentado de cada muestra se lavó (4x) con 0,5 mL de EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  usando la misma concentración de EtOH usada en el tratamiento a 180 °C (0-80% de EtOH en  $\text{H}_2\text{O}$ ). A continuación las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente (hasta un ~92% de materia seca) y se determinaron los contenidos de glucano, xilano y lignina insoluble en ácido de los residuos usando el procedimiento del National Renewable Energy Laboratory (NREL) (Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass – Versión 2006, Amie Sluiter y col., disponible en la página web del NREL).

#### Posterior sacarificación enzimática

La muestra secada al aire preparada antes fue suspendida en tampón de citrato 50 mM, pH 4,6 con una carga de sólidos de ~14%. Las enzimas de sacarificación, por ejemplo Spezyme CP, Multifect CX12L y Novozyme 188 se añadieron a concentraciones de 6:3:6 mg/g de celulosa, respectivamente. También se añadió 1% (p/v) de Tween 20 y 0,01% (p/v) de  $\text{NaN}_3$ , el último para prevenir el crecimiento microbiano. Se colocaron muestras (~0,4 mL) en viales de tapón roscado que contenían dos esferas de vidrio de 5 mm y se incubaron a 46 °C en un agitador rotatorio operado a 250 rpm. Se extrajeron alícuotas para análisis a las 4h y a intervalos de 24h desde el inicio y se diluyó en una relación de 1 a 42,25 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,01 N. Las muestras se filtraron entonces a través de filtros Spin-X y los

5 filtrados se analizaron mediante HPLC (Agilent series 1100/1200, Agilent Technologies, Wilmington, DE). Se usó una columna BioRad HPX-87H Aminex (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA 94547) para fraccionar los azúcares liberados usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N como fase móvil con un caudal de 0,6 mL/min. La columna se mantuvo a 60 °C. Se usó un detector de índice de refracción diferencial para detectar los azúcares eluidos y se mantuvo a 55 °C. Los tiempos de retención correspondientes a glucosa, xilosa y arabinosa fueron 9,05, 9,72 y 10,63 min, respectivamente). La Tabla 1A esboza los porcentajes de recuperación de glucano y xilano y el cambio porcentual en el contenido de lignina insoluble en ácido (IA) después de los pretratamientos con concentraciones de EtOH de 0% - 80%. La concentración de Bagazo fue (0,2 g/1,56 mM). Se usaron concentraciones variables de EtOH a 180 °C durante 2h.

10

TABLA 1A

Recuperación de glucano y xilano tras el tratamiento según el Ejemplo 1			
Pretratamiento (% de EtOH en agua)	% de recuperación de glucano en el residuo	% de recuperación de xilano en el residuo	% de cambio del contenido en lignina IA
0	83,0%	29,0%	+27,6%
20	88,7%	30,8%	+15,2%
40	86,0%	57,6%	-10%
60	91,9%	87,4%	-25,6%
80	88,6%	91,1%	-28,8%

Los resultados mostrados en la Tabla 1A indican que la extracción de lignina aumentó al aumentar el contenido de EtOH presumiblemente debido a que la solubilidad de lignina aumentó al aumentar la concentración de EtOH. Sin embargo, la cantidad de lignina extraída siguió siendo modesta incluso a elevadas concentraciones de etanol.

15

La hidrólisis de hemicelulosa y la solubilidad de oligómeros de xilosa disminuyen al aumentar el EtOH, aumentando el rendimiento de recuperación de oligómeros de xilano y xilosa en el residuo. La cantidad de acetato liberada por el pretratamiento también disminuyó al aumentar el contenido de EtOH, consistente con el descenso de la auto hidrólisis de la biomasa al aumentar la concentración de EtOH.

20

La Tabla 1B muestra los rendimientos de glucosa y xilosa tras 96h de sacarificación enzimática después del pretratamiento a diferentes concentraciones de EtOH. La sacarificación de celulosa aumentó cuando la concentración de EtOH en el pretratamiento aumentó desde 0 a 20%, pero entonces declinó para mayores concentraciones de EtOH en el pretratamiento. Se observó una disminución probable en la hidrólisis parcial de lignina y celulosa (aumento del grado de polimerización, de celulosa que disminuyó el rendimiento a glucosa en la posterior sacarificación – Tabla 1B) a concentraciones de más del 20% de EtOH.

TABLA 1B

Rendimientos de glucosa y xilosa monoméricas después de sacarificación enzimática durante 96h, pretratado como se ha descrito en el Ejemplo 1				
% de EtOH en agua (v/v)	Solo sacarificación de monómero de glucosa (% de rendimiento teórico)	Solo sacarificación de monómero de xilosa (% de rendimiento teórico)	Rendimiento total de monómero de glucosa (% de rendimiento teórico)	Rendimiento total de monómero de xilosa (% de rendimiento teórico)
0	38,43	34,98	31,86	10,16
20	44,48	45,52	39,46	14,01
40	29,62	38,55	25,45	22,23
60	16,81	24,64	15,45	21,52
80	6,8	7,22	6,02	7,01

25

Las recuperaciones totales de azúcares monoméricos (Tabla 1B), particularmente de xilosa, fueron bastante bajas a las concentraciones de EtOH más bajas. Con una concentración baja de EtOH en el pretratamiento, las condiciones ácidas, producidas a elevadas temperaturas mediante hidrólisis de los grupos acetilo de la hemicelulosa, hidrolizan la hemicelulosa. La xilosa solubilizada y algo de glucosa se pierden en la filtración y en los lavados que siguen al pretratamiento. A mayores concentraciones de EtOH existe menos hidrólisis parcial de la celulosa, hemicelulosa y lignina, lo que reduce el rendimiento de sacarificación. El comportamiento entre las concentraciones bajas y elevadas de etanol en conjunto produce bajos rendimientos globales de glucosa y xilosa monoméricas.

30

## Ejemplo 2

Efecto del pretratamiento con disolución de disolvente orgánico alcalina sobre la extracción de lignina

- El propósito de este Ejemplo era examinar el efecto de elevar el pH en el pretratamiento con disolución de disolvente orgánico a diferentes relaciones de EtOH en H<sub>2</sub>O sobre la retención de carbohidratos y la extracción de lignina y sobre el azúcar monomérica durante la posterior sacarificación enzimática. Dado que la autohidrólisis disminuye el pH, hidroliza xilano y promueve la pérdida de xilosa, el pH del pretratamiento se elevó mediante la adición de NaOH. El efecto de un mayor pH sobre la recuperación de xilosa se demuestra a continuación. Se suspendió bagazo de caña de azúcar (0,25 g, 95,78% de materia seca) en 1,75 mL de un disolvente que contiene EtOH (20-80% en agua) y 8% de NaOH (p/p de biomasa) más 1 mg de antraquinona (AQ, un catalizador para la fragmentación de lignina). El pH inicial de esta disolución era ~13,7. Las suspensiones fueron cargadas en tubos de acero inoxidable de tipo 316, cerradas y tratadas a 168 °C durante 140 min y enfriadas en agua a temperatura ambiente. Se extrajeron las muestras de los recipientes a presión, se filtraron, se lavaron, se secaron al aire y se analizaron como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los contenidos de glucano, xilano, arabinano y el cambio del contenido de lignina después del pretratamiento se muestran en la Tabla 2A.
- La posterior sacarificación enzimática se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1, con la excepción de que la relación de Spezyme:Multifect:Novozymes fue de 12:6:1,2 mg/g de sólido seco en presencia de un 1% de Tween 20 (p/v). La Tabla 2B muestra los rendimientos a azúcares monoméricos tras 96h de sacarificación enzimática de biomasa pretratada previamente a diferentes concentraciones de EtOH.

TABLA 2A

Rendimientos de glucano, xilano y arabinano después de pretratamiento según el Ejemplo 2				
% de EtOH en agua de pretratamiento	% de recuperación de glucano en el residuo	% de recuperación de xilano en el residuo	% de recuperación de arabinano en el residuo	% de cambio de contenido de lignina IA
20	77,5%	74,6%	51,3%	-48
45	84,0%	85,1%	68,0%	-64
60	83,6%	85,5%	76,0%	-63
70	81,3%	84,2%	75,8%	-65
80	80,0%	84,2%	86,6%	-50

20

TABLA 2B

Rendimientos de glucosa y xilosa monoméricas después de sacarificación enzimática durante 96h, pretratado como se ha descrito en el Ejemplo 2				
% de EtOH en agua	Solo sacarificación de monómero de glucosa (% de rendimiento teórico)	Solo sacarificación de monómero de xilosa (% de rendimiento teórico)	Rendimiento total de monómero de glucosa (% de rendimiento teórico)	Rendimiento total de monómero de xilosa (% de rendimiento teórico)
20	57,72	68,56	44,7	51,2
45	58,19	73,08	48,9	62,2
60	49,51	64,56	41,4	55,2
70	24,48	39,06	19,9	32,9
80	0,63	1,33	0,5	1,1

25

30

Como se puede observar en las Tablas 2A y 2B, las condiciones alcalinas de este experimento aumentaron sustancialmente la retención de xilano en el pretratamiento en comparación con los experimentos de autohidrólisis del Ejemplo 1. Este efecto fue más pronunciado a bajas concentraciones de EtOH. El NaOH evitó que la disolución de acidificara (pH final ~10,7) y por lo tanto protegió a la hemicelulosa frente a la hidrólisis catalizada por vía ácida. Adicionalmente, se extrajo significativamente más lignina, presumiblemente a través del fraccionamiento de la lignina catalizado por vía básica. Los rendimientos globales de azúcares monoméricos después de la sacarificación fueron sustancialmente mayores que los observados en el Ejemplo 1. El mayor rendimiento de recuperación de azúcares y la mayor extracción de lignina en el pretratamiento, aumentó los rendimientos de la posterior sacarificación enzimática. Los rendimientos de sacarificación a xilosa y glucosa alcanzaron un máximo a ~ 45% de EtOH como consecuencia de dos procesos opuestos, es decir, el aumento de la extracción de lignina a mayor EtOH que tiende a aumentar los rendimientos a azúcares, y el descenso de la hidrólisis parcial de hemicelulosa y de lignina al ir incrementando la concentración de EtOH. Es probable que la formación de metiluros de quinona, que podrían



repolimerizar o reaccionar con azúcares, y el “pelado” y las reacciones de escisión alcalina de polisacáridos contribuyen a la vez a limitar los rendimientos globales a azúcares.

Ejemplo 3

Aumento adicional del rendimiento de sacarificación después del pretratamiento en presencia de amoníaco

5 El propósito del Ejemplo fue estudiar el efecto de la presencia de amoníaco en la disolución de disolvente orgánico sobre el rendimiento a carbohidratos y el contenido de lignina después del pretratamiento y el rendimiento a azúcar monomérica después de la sacarificación. Aunque la recuperación de xilano mejoró sustancialmente al aumentar el pH, seguía produciéndose una pérdida sustancial de azúcares en el proceso de pretratamiento alcalino descrito en el Ejemplo 2. Dicha pérdida es debida probablemente al “pelado”, es decir, a la descomposición de azúcares del extremo reductor de las cadenas de polisacáridos. También es posible que la lignina, aunque hidrolizada más fácilmente en condiciones alcalinas en comparación con la autohidrólisis, forme metiluros de quinona que son capaces de repolimerización y de reacción con azúcares reductores. Por consiguiente, se examinó el efecto de la adición de NH<sub>3</sub> a la disolución de disolvente orgánico con la intención de bloquear ambos fenómenos.

10 Se suspendió bagazo de caña de azúcar (0,375 g, 95,78% de materia seca) se suspendió en 1,125 mL de disolvente que contenía varios porcentajes de EtOH (0%-70% en agua). Adicionalmente, el disolvente contenía un 6% de NH<sub>3</sub> y un 2% de NaOH (p/p de biomasa). El pH inicial de dicha disolución era de 13,2 y aumentó hasta pH 14,0 al aumentar la concentración de EtOH. Estas condiciones se compararon con una muestra de bagazo similar suspendida en EtOH al 70% en H<sub>2</sub>O (v/v) que contenía un 8% de NH<sub>3</sub> (p/p de biomasa) solo, en donde el pH inicial era de 12,2. Las suspensiones fueron cargadas en recipientes a presión de acero inoxidable de tipo 316 (3/16 de pulgada de DI, 1/4 de pulgada de DE, 4 pulgadas de largo, es decir DI 0,476 cm, DE 0,635 cm, 10,16 cm de largo), cerrados y tratados como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1, con la excepción de que la carga de sólidos era mayor y la muestras se calentaron a 168 °C durante 140 min.

15 Se llevó a cabo la subsiguiente sacarificación enzimática tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, con la excepción de que la relación de Spezyme:Multifect:Novozymes 188 fue de 6,68:3,34:1,67 mg/g de sólido seco en presencia de un 1% de Tween 20 (p/v). La carga de sólidos fue del 14 % p/p.

25 La Tabla 3A resume los resultados de pretratamiento con las diferentes concentraciones de EtOH. La Tabla 3B resume la sacarificación después de pretratamiento con diferentes concentraciones de EtOH en presencia de un 6% de NH<sub>3</sub> más un 2% de NaOH (p/p de biomasa) tras 96 h.

TABLA 3A

Recuperación de glucano, xilano y arabinano después del pretratamiento descrito en el Ejemplo 3					
% de EtOH en agua en el pretratamiento	% de recuperación de glucano en el residuo	% de recuperación de xilano en el residuo	% de recuperación de arabinano en el residuo	% de cambio del contenido de lignina IA	pH inicial
0	90,1%	92,5%	69,7%	-17%	13,22
20%	91,4%	97,1%	74,6%	-25%	13,46
40%	95,6%	102%	79,7%	-37%	13,72
70%	97,8%	107%	92,4%	-47%	14,0
70% (sólo 8% de NH <sub>3</sub> )	87,9%	94,5%	73,3%	-22%	12,12

TABLA 3B

Rendimientos de glucosa y xilosa monoméricas después de sacarificación enzimática durante 96 h, pretratamiento como se ha descrito en el Ejemplo 3					
% de EtOH en agua	Solo sacarificación de monómero de glucosa (% de rendimiento teórico)	Solo sacarificación de monómero de xilosa (% de rendimiento teórico)	Monómero de glucosa total (% de rendimiento teórico)	Monómero de xilosa total (% de rendimiento teórico)	Monómero de arabinosa total (% de rendimiento teórico)
0	69,7	57,8	62,8	53,5	58,9
20	77,1	63,9	70,5	62	66,4
40	76,8	67,6	73,4	69	69
70	73,6	65,4	71,9	69,8	76
70 (sólo 8% de NH <sub>3</sub> )	68,8	58,1	60,5	54,9	57,6

Es evidente a partir de los resultados descritos en las Tablas 3A y 3B que las recuperaciones de carbohidratos en el residuo aumentan sustancialmente con el pretratamiento alcalino con amoníaco en comparación con NaOH solo (Ejemplo 2). Además, la baja concentración de la adición de NH<sub>3</sub> produce un incremento sustancial en los rendimientos monoméricos tanto de glucosa como de xilosa tras sacarificación enzimática de muestras pretratadas a las condiciones de pretratamiento con la mayor concentración de EtOH en H<sub>2</sub>O. Estos resultados son consistentes con el papel del NH<sub>3</sub> para bloquear las reacciones de "pelado" o para disminuir la concentración de metiluros de quinona, o ambos. La presencia de una baja concentración de NaOH en presencia de NH<sub>3</sub> aumenta significativamente la eficacia del pretratamiento, probablemente debido a que cuanto más alto es el pH en presencia de NaOH, una mayor proporción del NH<sub>3</sub> se encuentra en forma desprotonada.

5

## 10 Ejemplo 4

Efecto de la adición de metilamina y azufre elemental a la disolución de disolvente orgánico del pretratamiento que contiene amoníaco

El pretratamiento con amoníaco fue examinado en presencia de los nucleófilos añadidos, metilamina y azufre elemental, los cuales en las condiciones alcalinas del pretratamiento se desproporcionan para formar polisulfuros y sulfuro. El pretratamiento se llevó a cabo como en el Ejemplo 3, con la excepción de que el bagazo contenía un 1% de azufre elemental (p/p de biomasa) y se suspendió en EtOH al 70% en H<sub>2</sub>O (v/v) más 14% de MA (metilamina), 7% de NH<sub>3</sub> + 7% de MA, 10% de NH<sub>3</sub> + 4% de MA ó 15% de NH<sub>3</sub> (todos en p/p de biomasa). Las muestras se calentaron a 187 °C durante 1 h en los recipientes a presión y a continuación se enfriaron rápidamente hasta temperatura ambiente en un baño de agua. El residuo se filtró, se lavó y se secó como se ha descrito previamente. La sacarificación enzimática se llevó a cabo como en el Ejemplo 5, pero en presencia y ausencia de 0,5% de PEG 2000 (p/p de biomasa).

15

20

TABLA 4

Rendimiento de azúcares monoméricos después del tratamiento descrito en el Ejemplo 11						
Muestra de 70% de EtOH en H <sub>2</sub> O (v/v) + 1% de S (p/p de biomasa) + aditivos (p/p de biomasa)	% de recuperación de glucano en sólidos	% de recuperación de xilano en sólidos	Glucosa monomérica (% del rendimiento teórico) sin PEG	Xilosa monomérica (% del rendimiento teórico) sin PEG	Glucosa monomérica (% del rendimiento teórico) con PEG	Xilosa monomérica (% del rendimiento teórico) con PEG
14% MA	96,8	102,3	83,3	74,6	85,8	75,8
7% NH <sub>3</sub> + 7% MA	90,80	96,98	79,5	68,2	82,9	71,1
10% NH <sub>3</sub> + 4% MA	91,61	97,35	76,2	66,4	80,8	68,7
14% NH <sub>3</sub>	95,24	100,41	66,71	59,5	74,3	63,9

- 5 Tal como se indica en la Tabla 9, la sustitución de amoníaco por metilamina no ejerce ningún impacto sobre la recuperación de glucano y xilano tras el pretratamiento. Los rendimientos de sacarificación para glucosa y xilosa, sin embargo, aumentan progresivamente cuanto más se reemplaza el amoníaco con metilamina (Tabla 4). Las diferencias entre los experimentos de sacarificación con y sin PEG 2000 son en su mayor parte porcentajes pequeños. Se necesita un análisis económico global del proceso para determinar si los mayores rendimientos de producción de azúcares con la sustitución de amoníaco por metilamina en el pretratamiento, o la adición de PEG 2000 en la sacarificación, compensan el coste añadido de la MA o del PEG.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un método para producir biomasa enriquecida en carbohidratos con una elevada retención de hemicelulosa que comprende:
- (a) proporcionar biomasa lignocelulósica que comprende lignina, celulosa y hemicelulosa;
- 5 (b) suspender la biomasa de (a) en una disolución de disolvente orgánico que comprende agua, amoníaco en una cantidad de aproximadamente 2% a aproximadamente 20% respecto al peso de biomasa seca y uno o más nucleófilos, mediante lo cual se forma una suspensión de biomasa-disolvente en condiciones alcalinas;
- (c) calentar la suspensión de biomasa-disolvente hasta una temperatura de aproximadamente 100-220 °C durante aproximadamente 5 minutos hasta aproximadamente 5 horas, mediante lo cual la lignina es fragmentada y disuelta en la suspensión; y
- 10 (d) filtrar el líquido libre a presión tras calentar la suspensión de (c), mediante lo cual la lignina disuelta es eliminada y se produce una biomasa enriquecida en carbohidratos con un elevado rendimiento de retención de hemicelulosa.
- 2.- El método de la Reivindicación 1, en el que dicho uno o más nucleófilos se selecciona del grupo que consiste en NaOH, una o más alquilaminas, sulfuro, hidrosulfuro, polisulfuro, hidropolisulfuro, reactivos de tiol y combinaciones de los mismos.
- 3.- El método de la Reivindicación 1, en el que la una o más alquilaminas se selecciona del grupo que consiste en R-NH<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>-NH, R<sub>3</sub>N, (H<sub>2</sub>N-R-NH<sub>2</sub>), (H<sub>2</sub>N-R(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), (OH-R-NH<sub>2</sub>), ((HO)<sub>2</sub>-R-NH<sub>2</sub>), (OH-R-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), (HS-R-NH<sub>2</sub>), ((HS)<sub>2</sub>-R-NH<sub>2</sub>), (HS-R-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) y (H<sub>2</sub>N-R(OH)(SH)) y combinaciones de las mismas, en donde R es de manera independiente un alcano, alqueno o alquino, de 1-6 carbonos, lineal, cíclico o ramificado, monovalente, divalente o trivalente.
- 20 4.- El método de la Reivindicación 3, en el que R es de manera independiente metilo, etilo, propilo o butilo.
- 5.- El método de la Reivindicación 3, en el que la alquilamina es metilamina.
- 6.- El método de la Reivindicación 1, en el que la relación de disolución de disolvente a biomasa de la etapa (b) tiene una relación másica de aproximadamente 10 a 1 hasta 0,5 a 1.
- 25 7.- Un método de fragmentación y extracción selectiva simultáneas de lignina procedente de biomasa lignocelulósica para producir una biomasa sustancialmente libre de lignina que comprende:
- (a) proporcionar:
- 1) una cantidad de biomasa lignocelulósica que comprende lignina y carbohidratos;
- 2) una disolución de disolvente multi-componente que comprende entre aproximadamente 40% y aproximadamente 70% de etanol en agua;
- 30 3) amoníaco en una cantidad de 2% a aproximadamente 205;
- 4) y uno o más nucleófilos(s);
- (b) poner en contacto dicha biomasa con la disolución de disolvente multi-componente de (a) para formar una mezcla de biomasa-disolvente;
- 35 (c) colocar la mezcla de disolvente-biomasa en un recipiente sellado a presión en el que se calienta la mezcla de (b) a una temperatura de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 220 °C durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 5 horas, con lo que la lignina se fragmenta y se disuelve en el disolvente;
- (d) eliminar la lignina disuelta de (c) mediante filtración; y
- 40 (e) lavar el residuo con disolvente orgánico, con lo que se produce una biomasa sustancialmente libre de lignina.
- 8.- El método de la Reivindicación 7, en el que la biomasa sustancialmente libre de lignina tiene aproximadamente entre el 60% y aproximadamente el 100% del peso original de la biomasa.
- 9.- El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 ó 7, en el que la disolución de disolvente orgánico comprende además un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en hidróxidos o carbonatos alcalinos o alcalinotérreos, amoníaco, tioles, sulfuros, hidrosulfuros, polisulfuros, hidropolisulfuros y combinaciones de los mismos.
- 45

**10.**-El método de las reivindicaciones 1 ó 7, en el que la disolución de disolvente, y cualquier amoníaco o componentes sin reaccionar, son recirculables.

**11.**-El método de las reivindicaciones 1 ó 7, en el que dicha disolución de disolvente comprende un disolvente seleccionado del grupo que consiste en alcoholes, dioles y disolventes apróticos.

5 **12.**-El método de la reivindicación 11, en el que la disolución de disolvente orgánico comprende un disolvente seleccionado del grupo que consiste en metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol y hexanol, isómeros de los mismos, y dioles de los mismos.