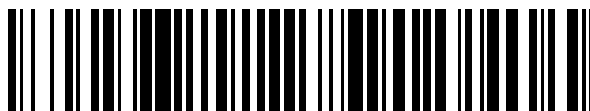


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 111**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/35** (2014.01)

**G01N 21/90** (2006.01)

**G01N 21/84** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2008 E 08844814 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 2215455**

54 Título: **Un método para formular un modelo NIR utilizado en el procesamiento de biomasa**

30 Prioridad:

**02.11.2007 US 984976 P**

**31.01.2008 US 25033 P**

**28.05.2008 US 56631 P**

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

**04.04.2014**

73 Titular/es:

**CERES, INC. (100.0%)  
1535 RANCHO CONEJO BOULEVARD  
THOUSAND OAKS, CA 91320-1440, US**

72 Inventor/es:

**HAMES, BONNIE;  
KRUSE, TANYA;  
THOMAS, STEVEN R. y  
RAGAB, AMR SAAD**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 453 111 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**

Un método para formular un modelo NIR utilizado en el procesamiento de biomasa

**5 Campo de la Invención**

El presente documento se refiere a métodos y materiales implicados en determinar las características de composición de la biomasa de las plantas y la eficiencia de conversión de la biomasa para producir combustibles, químicos y/o calor y energía bajo diversas condiciones de procesamiento. Por ejemplo, el presente documento proporciona materiales y métodos para medir niveles de carbohidrato accesibles y para identificar material de plantas que tiene mayores niveles de carbohidrato accesibles,

**Antecedentes de la Invención**

Las plantas almacenan la energía de la luz solar en la forma de enlaces químicos que componen las plantas. La energía almacenada en los materiales de plantas puede ser convertida a formas de energía tales como calor, electricidad y combustibles líquidos, dependiendo del material de planta empleado y el proceso aplicado para extraer la energía del mismo. Otros procesos pueden producir intermediarios químicos de biomasa de plantas que son útiles en una variedad de procesos industriales, por ejemplo, ácido láctico, ácido succínico, etc.

Los materiales de plantas han sido utilizados durante milenios por los humanos para generar calor mediante combustión directa en el aire. Para propósitos de construcción y procesos de calentamiento, este calor normalmente se utiliza para generar vapor, el cual es una fuente de calor más transportable utilizada para calentar construcciones diarias públicas utilizando intercambiadores de calor de diversos diseños. La producción de vapor también puede utilizarse para la transmisión de turbinas, el cual transforma la energía de calor en energía eléctrica. Estos procesos normalmente implican un proceso de combustión directa, simple del material de la planta solo, o un proceso de coqueado con carbón u otra fuente de energía.

Los combustibles tales como etanol pueden ser producidos a partir de materiales de plantas a través de un número de procesos diferentes. Por ejemplo, la sacarosa en la caña de azúcar puede ser extraída del material de la planta y fermentada directamente a etanol utilizando el microorganismo, tal como levadura de cerveza. Brasil ha convertido una parte significativa de su sector de transporte en etanol derivado de caña de azúcar, siempre que esto pueda ser realizado en una escala muy grande sobre un área geográfica extensa. Como otro ejemplo, el almidón procedente del maíz puede ser procesado utilizando  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa para liberar la glucosa libre que subsecuentemente se fermenta a etanol. Los Estados Unidos utilizan una parte significativa de su cosecha de maíz para producir etanol procedente de almidón. Aunque estos avances son significativos, está limitada la capacidad de incrementar la cantidad de combustible de transporte de líquidos obtenido del material de la planta, y es insuficiente para lograr los objetivos de energía renovable mandados por la Federación debido a que únicamente una pequeña fracción de la energía solar capturada y transformada en energía química en las plantas, es convertida en biocombustibles en estos procesos industriales.

El material de las plantas puede ser utilizado para la producción de biocombustible celulósico mediante procesos bioquímicos que emplean enzimas y/o microorganismos o mediante procesos termoquímicos tales como tecnología de Biomasa a Líquidos (BtL), utilizando catalizadores de alta temperatura y no enzimáticos. Estos también son ejemplos de procesos termoquímicos/bioquímicos híbridos. Los procesos bioquímicos normalmente emplean tratamientos previos físicos y químicos, enzimas y microorganismos para destruir la matriz de lignocelulosa de la biomasa con el objeto de liberar la parte fermentable de la celulosa, hemicelulosa y otros carbohidratos de pared celular, los cuales son fermentados subsecuentemente a etanol a través de un microorganismo. Actualmente, están siendo desarrollados muchos diferentes métodos de procesamiento para la producción de biocombustible, los cuales emplean diferentes estrategias para tratamiento previo, cocteles de enzimas y microorganismos. Muchos de estos procesos están enfocados en la producción de etanol, aunque el etanol y otras moléculas útiles (por ejemplo, ácido láctico, ácido succínico, polialcanoatos, etc.) también pueden ser producidos en este tipo de proceso. La molécula del producto de conversión producida normalmente se define a través de los microorganismos seleccionados para fermentación.

Los procesos termoquímicos emplean temperaturas muy altas en un ambiente de bajo contenido de oxígeno (es decir  $O_2$ ) para degradar completamente los constituyentes orgánicos de la biomasa a syngas, compuesto en gran parte de gas de hidrógeno molecular ( $H_2$ ) y monóxido de carbono (CO). Estas moléculas simples posteriormente son reformadas en moléculas más útiles y valiosas (combustibles o intermediarios químicos) utilizando un proceso de Fischer-Tropsch u otros métodos que emplean normalmente un catalizador químico de cierta clasificación. Estos procesos son efectivos para producir biocombustibles que son similares a los combustibles de hidrocarburo a base de petroquímicos actuales (es decir, gasolina, diesel, combustible de inyector), aunque también se pueden producir otras moléculas de biocombustible en estos tipos de procesos (por ejemplo etanol, butanol, queroseno).

Una forma variante de procesos termoquímicos utiliza pirólisis (es decir, degradación térmica en la ausencia total de oxígeno) para degradar parcialmente los constituyentes orgánicos presentes en las biomásas de las plantas a un

bioaceite líquido químicamente heterogéneo. Esto sirve para incrementar la densidad de energía de la biomasa para facilitar el transporte a instalaciones de procesamiento centralizadas, en donde el bioaceite se procesa en forma adicional hasta obtener una pizarra de producto deseada.

5 La viabilidad económica de los procesos de conversión de biomasa se ve impactada de manera significativa por la composición del material de la planta y su eficiencia de conversión a calor, electricidad, biocombustibles o intermediarios químicos bajo condiciones de procesamiento específicas. Para procesos bioquímicos que producen biocombustibles u otros químicos, la recalcitrancia de la matriz de lignocelulosa de la biomasa es un factor importante en la eficiencia de la conversión. Los métodos analíticos actuales para medir diversos parámetros  
10 relevantes para la conversión de los materiales de plantas a energía son lentos, costosos y requieren de mano de obra altamente experimentada para producir información precisa y confiable. El bajo rendimiento y alto costo de estos métodos limita su uso en la selección y cultivo de variedades de reservas de biomasa de plantas mejoradas en sus características de desempeño de conversión. Por las mismas razones, estos métodos están limitados en su uso por el monitoreo de diversos intermediarios del proceso durante el procesamiento de la biomasa. Estas dificultades en la reserva de alimentación y el desarrollo del proceso han limitado la realización del potencial de biocombustible  
15 celulósicos y obstaculizar el desarrollo de procesos económicamente viables.

El artículo "Rapid biomass analysis: New tools for compositional analysis of corn stover feedstocks and process intermediates from ethanol production"; APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY; 20030401; Hames  
20 Bonnie R; VOL 105-108; páginas 5-16 representa la técnica anterior relevante. La presente divulgación se refiere a un método de análisis de composición de materias primas de forraje de maíz utilizadas en la producción de etanol que combina espectroscopia NIR y análisis Multivarianza en el que en un paso de capacitación la composición química se determina mediante técnicas químicas de fase húmeda y en particular el contenido en azúcar no estructural se determina por análisis de composición. Además en la fase de capacitación se obtienen espectros de reflectancia NIR de la materia prima. Posteriormente, los datos composicionales y los datos espectroscópicos se combinan mediante regresión multivariable. En un ejemplo específico la biomasa es forraje de maíz para el que se obtienen los componentes de la composición glucano, galactano, arabinano y manano ("carbohidratos accesibles"), a partir de los cuales, por cálculo y suponiendo una conversión del 100% de los azúcares del contenido de carbohidrato en etanol, puede determinarse el rendimiento de etanol. El proceso puede aplicarse como un análisis  
25 rápido para determinar, por ejemplo, el empobrecimiento de xilano (carbohidrato recalcitrante) lo que implica que el tratamiento previo es suficiente y que la muestra está lista para el siguiente paso del proceso de hidrólisis enzimática - si la muestra no está suficientemente pretratada la hemicelulosa puede permanecer en la muestra y disminuir la eficiencia enzimática en el paso de hidrólisis.

35 En la siguiente divulgación, siempre que se haga referencia a un aspecto, realización o ejemplo, dichos aspectos, realizaciones y ejemplos no forman parte de la invención salvo que se incluyan en las reivindicaciones.

### Breve Descripción de la Invención

40 La presente invención está basada en parte en el descubrimiento de que los modelos NIR pueden ser desarrollados de modo que caractericen la naturaleza y/o cantidad de componentes de biomasa de plantas de importancia a diversos procesos de conversión de biomasa. Por ejemplo, se ha descubierto de manera sorprendente que se puede anticipar la eficiencia de conversión de sacarificación enzimática con base en espectroscopia NIR de la biomasa seca y molida. Dichos modelos NIR se pueden utilizar para anticipar la eficiencia de sacarificación de muestras de  
45 biomasa no conocidos bajo condiciones de procesamiento idénticas o similares. Dichos modelos también pueden ser utilizados para anticipar el rendimiento final del biocombustible a partir de un material de biomasa particular bajo las mismas condiciones de procesamiento específicas. Por lo tanto, dichos modelos pueden ser utilizados para determinar condiciones óptimas para procesar una reserva de alimentación particular en una biorefinería. Se pueden utilizar modelos NIR en el cultivo de plantas para seleccionar las plantas que tengan los niveles más altos de carbohidratos accesibles y el mayor rendimiento de biocombustible (por ejemplo, etanol) en galones/toneladas de biomasa. Dichas plantas seleccionadas pueden ser utilizadas para producir variedades mejoradas que tengan una mayor cantidad de carbohidratos accesibles y mayor eficiencia de sacarificación como un aspecto de valor agregado. Dichas plantas son útiles para producir biomasa que puede ser convertida a un combustible líquido u otros químicos.

55 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención presenta un método para formular un modelo NIR. El método comprende someter una pluralidad de diversas muestras de reserva de alimentación de biomasa del mismo tipo a espectroscopia de infrarrojo cercano para producir datos espectroscópicos NIR de cada muestra. La composición química de cada muestra de reserva de alimentación se mide independientemente utilizando técnicas químicas de fase húmeda establecidas u otras técnicas, así como la cantidad total de mono y disacáridos solubilizados de cada muestra después del procesamiento bajo conjuntos definidos de condiciones de carga de enzimas/tratamiento previo. El modelo NIR se genera de las correlaciones que emergen entre los datos espectroscópicos, los datos de composición química y los resultados de sacarificación. El modelo NIR resultante tiene la capacidad de predecir la cantidad de carbohidratos accesibles en una muestra de reserva de alimentación de prueba si fueran hacer  
60 procesados bajo la misma condición de carga enzimática/tratamiento previo definida o una similar. En algunas modalidades, el paso de generación comprende la regresión de los datos espectrales contra los datos de

- composición química y los resultados de sacarificación, y derivar una ecuación de calibración utilizando métodos estadísticos multivarianza. El método puede incluir además medir la cantidad total de mono y disacáridos solubilizados de cada una de las muestras de reserva de alimentación después del procesamiento mediante una segunda condición de carga enzimática/tratamiento previo definida, y generar un segundo modelo NIR de cantidades
- 5 de mono y disacáridos solubilizados bajo las segundas condiciones de carga enzimática/tratamiento previo definidas, los datos espectroscópicos y los datos de composición química. La composición química anticipada a través del modelo NIR puede incluir el contenido de ferulato y/o acetato de la biomasa, si el método ha sido calibrado en forma adecuada para dichos constituyentes. El modelo NIR puede ser generado de valores de carbohidrato recalitrantes.
- 10 En otro aspecto, la presente invención presenta un método para determinar la cantidad de material de carbohidrato accesible en una muestra de reserva de alimentación. El método comprende recolectar datos de espectro NIR de una muestra de reserva de alimentación que será probada, aplicando a los datos de espectro un modelo NIR de carbohidrato accesible en reservas de alimentación del mismo tipo que la muestra, y anticipando la cantidad de material de carbohidrato accesible en la muestra con base en los resultados de la aplicación del modelo.
- 15 En otro aspecto, la presente invención presenta un método para determinar la cantidad de material de carbohidrato recalitrante en una muestra de materia prima. El método comprende recolectar datos de espectro NIR de la muestra de materia prima que será probada, aplicando un modelo NIR de carbohidrato recalitrante en materias primas del mismo tipo que la muestra a los datos de espectro, y anticipar la cantidad de material de carbohidrato recalitrante en la muestra con base en los resultados de la aplicación del modelo.
- 20 En otro aspecto, la presente invención presenta un método para anticipar la eficiencia de conversión de sacarificación de la muestra de alimentación. El método comprende recolectar datos de espectro NIR de una muestra de materia prima de prueba, aplicar un modelo NIR de carbohidrato accesible en materias primas del mismo tipo que la muestra a los datos de espectro, y anticipar la eficiencia de conversión de sacarificación de la muestra, con base en los resultados de la aplicación del modelo. La eficiencia de conversión de sacarificación puede ser por ejemplo, eficiencia de conversión de glucosa o eficiencia de conversión de glucosa + xilosa. El método puede incluir además anticipar el rendimiento de los monosacáridos de la muestra de materia prima.
- 25 En otro aspecto, se describe un método para anticipar el rendimiento del producto de una muestra de materia prima. El método comprende recolectar datos de espectro NIR de una muestra de materia prima que será probada, aplicando un modelo NIR de rendimiento del producto en materias primas del mismo tipo que la muestra a los datos de espectro y anticipar el rendimiento del producto de la muestra de materia prima, con base en los resultados de la aplicación del modelo. El rendimiento del producto en el método puede ser rendimiento de biocombustible. La muestra de materia prima puede ser un material herbáceo o de madera, por ejemplo, pasto varilla, sorgo, caña de azúcar, hierba de plata, álamo, sauce, arroz o maíz.
- 30 En otro aspecto, la presente invención presenta un método para determinar la cantidad de contenido de ferulato y acetato en la muestra de materia prima. El método comprende recolectar datos de espectro NIR de una muestra de materia prima que será probada, aplicar a los datos de espectro un modelo NIR de contenido de ferulato y acetato en materias primas del mismo tipo que la muestra y anticipar la cantidad de contenido de ferulato y acetato en la muestra de materia prima, con base en los resultados de la aplicación del modelo.
- 35 En otro aspecto, la presente invención presenta un método para determinar condiciones enzimáticas para el procesamiento de una materia prima de biomasa. El método comprende recolectar datos de espectro NIR de una muestra de materia prima de prueba, aplicar uno o más modelos NIR de carbohidrato accesible en materias primas del mismo tipo que las muestras a los datos de espectro, y anticipar las condiciones de carga enzimática que produce una sacarificación definida de la muestra, con base en los resultados del paso de aplicación. En algunas modalidades, el método también incluye anticipar las condiciones de tratamiento previo que producen una sacarificación definida de la muestra de materias primas, con base en los resultados de la aplicación del modelo.
- 45 En otro aspecto, se describe un método para determinar condiciones de procesamiento para una materia prima de biomasa. El método comprende recolectar datos de espectro NIR de una muestra de alimentación que será probada, aplicar uno o más modelos NIR de condiciones de procesamiento en materias primas del mismo tipo que la muestra a los datos de espectro y anticipar las condiciones de procesamiento que producen una sacarificación definida de las muestras de materia prima, con base en los resultados del paso de aplicación. Las condiciones de procesamiento pueden comprender un tratamiento previo. Las condiciones de procesamiento pueden incluir el uso de una o más enzimas utilizadas para sacarificar la muestra de materia prima tratada previamente. La muestra de materia prima puede ser un material herbáceo o de madera. La muestra de materia prima puede comprender una especie seleccionada del grupo que consiste en pasto varilla, sorgo, caña de azúcar, hierba de plata, álamo, sauce, arroz y maíz.
- 50 En otro aspecto, la presente invención presenta un método para seleccionar una planta. El método comprende proporcionar una población de plantas de una especie de biomasa, recolectar datos de espectro NIR de una muestra de materia prima de las plantas en la población, aplicar un modelo NIR de carbohidrato accesible en materias primas del mismo tipo que la muestra a los datos de espectro, anticipar la eficiencia de sacarificación de cada muestra de
- 55
- 60
- 65

materia prima, con base en los resultados del paso de aplicación, e identificar una o más plantas en la población de modo que tenga una eficiencia de sacarificación anticipada superior en forma relativa a la eficiencia de sacarificación anticipada por medio para la población. En algunos aspectos, un método para seleccionar una planta comprende proporcionar una población de plantas de una especie de biomasa, recolectar datos de espectro NIR de una muestra de materia prima de cada una de las plantas en la población, aplicar un modelo NIR de uno o más del porcentaje en peso S, porcentaje en peso G y porcentaje en peso H en las materias primas del mismo tipo que la muestra a los datos de espectro, anticipar los porcentajes en pesos de uno o más de S, G, y H de cada muestra de materia prima, con base en los resultados del paso de aplicación, e identificar una o más plantas en la población que tienen un porcentaje en peso alterado de uno o más de S, G, o H en forma relativa al porcentaje en peso anticipado promedio de S, G, o H para las poblaciones. La muestra de materia prima puede ser un material herbáceo o de madera, por ejemplo, pasto varilla, sorgo, caña de azúcar, hierba de plata, álamo, sauce, arroz y maíz.

En otro aspecto, la presente invención presenta un método para cultivar una variedad de plantas. El método comprende cruzar dos o más plantas de biomasa de origen, y seleccionar la progenie de cruce que tenga una mayor eficiencia de conversión de sacarificación anticipada en forma relativa a la eficiencia de conversión de sacarificación de al menos uno de los orígenes. El paso de selección puede incluir recolectar datos de espectro NIR de una muestra de materia prima de una o más progenies del cruce, aplicar a los datos de espectro un modelo NIR de carbohidrato accesible en las materias primas del mismo tipo que la muestra, y anticipar la eficiencia de conversión de la sacarificación de la muestra, con base en los resultados del paso de aplicación. Posteriormente la progenie se selecciona de modo que tenga un incremento anticipado en la eficiencia de conversión de sacarificación relativa a la eficiencia de conversión de sacarificación anticipada de al menos una de las plantas de origen. También se presenta un método para cultivar una variedad de plantas, en donde la progenie de un cruce se selecciona de modo que tenga una mayor cantidad anticipada de carbohidrato accesible relativa a la cantidad de carbohidrato accesible de al menos una de las plantas de origen. En algunos aspectos, el método de cultivo de una variedad de plantas comprende cruzar dos o más plantas de biomasa de origen y seleccionar la progenie del cruce que tenga un porcentaje anticipado alterado de uno o más de S, G, o H relativo al porcentaje en peso de S, G, o H de al menos una de las plantas de origen. La muestra de materia prima puede ser un material herbáceo o de madera, por ejemplo, pasto varilla, sorgo, caña de azúcar, *hierba de plata*, álamo, sauce, arroz y maíz.

En otro aspecto, la presente invención presenta un método para cultivar una variedad de plantas que incluye identificar uno o más miembros de una población de plantas de una especie de biomasa que tenga una mayor eficiencia de conversión de sacarificación anticipada relativa a la eficiencia de conversión de sacarificación promedio de la población. El uno o más miembros identificados posteriormente son propagados mediante técnicas sexuales o asexuales. También se presenta un método de cultivo de una variedad de plantas, en donde uno o más miembros de dicha población son identificados de modo que tengan una mayor cantidad anticipada de carbohidrato accesible relativa a la cantidad promedio del carbohidrato accesible de la población. Dichas plantas identificadas son propagadas mediante técnicas sexuales y asexuales.

La presente invención también presenta un método para manejar una cadena de suministro de materia prima. El método incluye recolectar datos de espectro NIR de una muestra de materia prima que será probada, aplicar a los datos de espectro un modelo NIR de carbohidrato accesible en materias primas del mismo tipo que la muestra, anticipar la eficiencia de conversión de sacarificación de la muestra de materia prima con base en los resultados del paso de aplicación, e ingresar la eficiencia de conversión de sacarificación anticipada en un sistema de índice de cosecha accesible a través de un procesador de materia prima. El método puede incluir además clarificar la materia prima de acuerdo con las especificaciones de calidad de la materia prima establecidas por el procesador de materia prima, y ofrecer un precio especificado al productor de la materia prima con base en la clasificación de la materia prima.

La presente invención también presenta un medio legible en computadora que comprende instrucciones de programa de computadora, las cuales cuando son ejecutadas por un procesador, llevan a cabo un método. El método comprende recibir datos de espectro NIR de la muestra de materia prima que será probada, aplicar a los datos de espectro un modelo NIR de carbohidrato accesible en materias primas del mismo tipo que la muestra, y transportar la cantidad de material de carbohidrato accesible en la muestra de materia prima, con base en los resultados de aplicar el modelo, a un sistema de índice de cosecha.

En otro aspecto, la presente invención presenta un método implementado en computadora, que comprende recolectar datos de espectro NIR de la muestra de materia prima que será probada, aplicar a los datos de espectro un modelo NIR de carbohidrato accesible en materias primas del mismo tipo que la muestra de materia prima, anticipar la eficiencia de conversión de sacarificación de la muestra de materia prima con base en la aplicación del modelo NIR, y producir la eficiencia de conversión de sacarificación anticipada para ser utilizada por un sistema de índice de cosecha. El sistema está configurado para determinar la calidad de la biomasa para las materias primas de las cuales se obtiene la muestra de materia prima. En otro aspecto, un método implementado en computadora comprende recibir, en un sistema de índice de cosecha, una eficiencia de conversión de sacarificación anticipada de una materia prima, la materia prima asociada con un productor que proporciona la materia prima, determinar una distribución de cadena de suministro con base en la eficiencia de conversión de sacarificación anticipada y producir una indicación de la distribución de cadena de suministro a un procesador de materia prima.

En otro aspecto, la presente invención presenta un sistema que comprende una interfase para recibir datos de espectro NIR de una muestra de materia prima, y un modelo NIR de carbohidrato accesible en materias primas del mismo tipo que la muestra de materia prima que produce, para ser utilizado por un sistema de índice de cosecha, una eficiencia de conversión de sacarificación anticipada de la muestra de materia prima con base en la aplicación del modelo NIR. El sistema de índice de cosecha está configurado para determinar la calidad de biomasa para la materia prima del mismo tipo que la muestra de materia prima.

La presente invención también presenta un método para formular un modelo NIR. El método comprende someter una pluralidad de muestras de materia prima de biomasa del mismo tipo a espectroscopia de infrarrojo cercano para producir datos espectroscópicos NIR de cada muestra. El rendimiento de producto termoquímico de cada muestra de materia prima se mide mediante técnicas termoquímicas, y se genera el modelo NIR de los datos espectroscópicos y los rendimientos del producto termoquímico. El modelo NIR resultante tiene la capacidad de anticipar el rendimiento del producto termoquímico de una muestra de materia prima de prueba. El producto termoquímico puede ser un biocombustible líquido.

En otro aspecto la presente invención presenta un método para determinar la cantidad de carbono fijo en una muestra de materia prima. Dicho método incluye recolectar datos de espectro NIR de una muestra de materia prima que será probada, aplicar a los datos de espectro un modelo NIR de carbono fijo en materias primas del mismo tipo que la muestra, y anticipar la cantidad de carbono fijo en la muestra de materia prima, con base en los resultados de la aplicación del modelo. En otro aspecto, la presente invención presenta un método para anticipar porcentajes en peso C:H:O en una muestra de materia prima. El método comprende recolectar datos de espectro NIR de una muestra de materia prima que será probada, aplicar un modelo NIR de porcentajes en peso C:H:O en materias primas del mismo tipo que la muestra a los datos de espectro, y anticipar los porcentajes en peso C:H:O en la muestra de materia prima, con base en los resultados del paso de aplicación. En otro aspecto, la presente invención presenta un método para anticipar el Valor de Calentamiento Superior (HHV) de una muestra de alimentación. El método comprende recolectar datos de espectro NIR de una muestra de una materia prima que será probada, aplicar a los datos de espectro un modelo NIR del HHV de las materias primas del mismo tipo que la muestra, y anticipar el HHV de la muestra de materia prima, con base en los resultados de la aplicación del modelo.

La presente invención también presenta un método implementado en computadora para anticipar el valor económico de una biomasa. Dicho método incluye recolectar datos de espectro NIR de una muestra de materia prima que será probada. Un modelo NIR de HHV de las materias primas del mismo tipo que la muestra, se aplica a los datos de espectro, y el HHV de la muestra de materia prima es anticipado con base en la aplicación del modelo. Un modelo NIR del carbono fijo de las materias primas del mismo tipo que la muestra también se aplica a los datos de espectro, y el carbono fijo de la muestra de materia prima es anticipado con base en la aplicación del modelo de carbono fijo. Se aplica a los datos de espectro un modelo NIR de carbohidrato accesible en materias primas del mismo tipo que la muestra, y la eficiencia de conversión de sacarificación de la muestra de materia prima con base en la aplicación del modelo de carbohidrato accesible. Las condiciones de procesamiento bioquímico y termoquímico definidas que dan como resultado un valor económico definido de la muestra de materia prima posteriormente son anticipadas con base en los resultados de cada uno de los modelos NIR. Dichos métodos se pueden utilizar para colocar un valor de material de biomasa en términos de rendimiento de producto final, anticipar el rendimiento de biocombustible óptimo de un material. Dichos métodos también pueden ser utilizados para seleccionar variedades de una población y/o cruza directas en un programa de cultivo para lograr un valor económico óptimo.

En otro aspecto, la presente invención presenta un método implementado por computadora que comprende recibir, en un sistema de índice de cosecha, un HHV anticipado, una cantidad de carbono fijo anticipada y una eficiencia de sacarificación anticipada de una materia prima, la materia prima asociada con un productor que proporciona la materia prima, determinar una distribución de cadena de suministro con base en el HHV anticipado, la cantidad de carbono fijo anticipada y la eficiencia de sacarificación anticipada, y producir una indicación de la distribución de cadena de suministro de un procesador de materia prima.

En otro aspecto, la presente invención presenta un método para anticipar la cantidad de energía que se puede obtener de una muestra de materia prima, que comprende recolectar datos de espectro NIR de una muestra de materia prima que será probada, aplicar a los datos de espectro un modelo NIR del HHV y la cantidad de carbono fijo en las materias primas del mismo tipo que la muestra, y anticipar la cantidad de energía obtenible de la muestra de materia prima, con base en los resultados del paso de aplicación. En otro aspecto, se describe un método para determinar las condiciones de procesamiento para una materia prima de biomasa, en donde el método comprende recolectar los datos de espectro NIR de una muestra de materia prima que será probada, aplicar uno o más modelos NIR de la cantidad de carbono fijo y el HHV de las materias primas del mismo tipo que la muestra a los datos de espectro, y anticipar las condiciones de procesamiento que produce una combustión definida de la muestra de materia prima, con base en los resultados del paso de aplicación. Las condiciones de procesamiento pueden comprender un tratamiento previo.

En otro aspecto, la presente invención presenta un método para formular un modelo NIR. El método comprende someter una pluralidad de muestras de materias primas de biomasa del mismo tipo a espectroscopia de infrarrojo cercano para producir datos espectroscópicos NIR de cada muestra, o medir la composición química de cada

muestra de materia prima a través de una o más técnicas de química analítica, y generar el modelo NIR de los datos espectroscópicos y los datos de composición química. El modelo NIR tiene la capacidad de anticipar uno o más del porcentaje en peso S, porcentaje en peso G y porcentaje en peso en una muestra de materia prima de prueba. Un método para determinar uno o más porcentajes en peso S, G, y H en una muestra de materia prima comprende recolectar datos de espectro NIR de una muestra de materias primas que será probada, aplicando un modelo NIR de uno o más del porcentaje en peso S, porcentaje en peso G y porcentaje en peso en materias primas del mismo tipo que la muestra a los datos de espectro y, con base en los resultados del paso de aplicación, anticipar uno o más del porcentaje en peso S, porcentaje en peso G y porcentaje en peso H en la muestra de materia prima.

5  
10  
15 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el comprendido comúnmente por los expertos en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden utilizarse para la práctica de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Los detalles de una o más modalidades de la presente invención son establecidos en los dibujos adjuntos y la descripción que se encuentra a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la presente invención podrán ser apreciados a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones adjuntas.

20  
**Descripción de las Figuras**

La figura 1, es un trazo de calificación del Análisis de Componentes Principales (PCA) de muestras de estudio de pasto varilla y el subconjunto de 55 muestras seleccionadas para la calibración del método. Los rombos son las muestras de estudio y las estrellas son las muestras de calibración.

La figura 2, es una ecuación de NIR/PLS de proteína que utiliza tres componentes principales (PCs). Se muestran coeficientes para cada PC en cada longitud de onda. Los coeficientes de ponderación para la concentración de proteína también serán proporcionados. También se muestran opciones de tratamiento matemático que indican el primer tratamiento derivado seguido de un alisamiento de variado normal estándar con un segmento de  $4\text{ cm}^{-1}$  y un bloque de  $4\text{ cm}^{-1}$  con un ajuste polinomial de primer orden. La ecuación fue desarrollada utilizando el software de análisis multivarianza WinISI versión 4.0 de Infracsoft International, State College, Pennsylvania, E.U.A.

La figura 3, es una comparación de la composición de las muestras de calibración determinadas a través de métodos químicos húmedos y los valores de validación de cruce del modelo SWG\_2.

La figura 4, es una comparación de la composición de las muestras de validación independientes determinadas a través de métodos químicos húmedos y el modelo SWG\_2.

La figura 5, es una comparación de la eficiencia de conversión de glucosa determinada mediante métodos químicos húmedos *versus* la eficiencia de conversión de glucosa anticipada por un modelo de conversión NIR, para muestras sometidas a tratamiento previo *con* ácido y sacarificación enzimática.

La figura 6, es un trazo de la distribución de cantidades de glucano en una población de pasto varilla.

La figura 7, es un trazo de la distribución de cantidades de xilano en una población de pasto varilla.

La figura 8, es un trazo de la distribución de cantidades de lignina en una población de pasto varilla.

La figura 9, es un ejemplo de un método y sistema para manejar el suministro de materia prima a una biorefinería.

La figura 10, es un ejemplo de un método y sistema para determinar la distribución de cadena de suministro de la materia prima.

La figura 11, es un análisis de conversión de dos muestras de pasto varilla después de tratamiento previo con ácido/sacarificación enzimática.

La figura 12, es un histograma de las eficiencias de conversión de 90 diferentes muestras de pasto varilla evaluadas utilizando tratamiento previo con ácido y/o sacarificación enzimática.

La figura 13, es un trazo de la cantidad de glucosa liberada de diferentes muestras de pasto varilla después de un tratamiento previo con ácido/sacarificación enzimática.

La figura 14, es un trazo de la cantidad de glucosa liberada de diferentes muestras de pasto varilla después un tratamiento previo alcalino/sacarificación enzimática.

Los símbolos de referencia similares en los diversos dibujos indican elementos similares.

### Descripción Detallada

#### 60 1. Revisión General

Se puede utilizar la biomasa de plantas para la producción de energía mediante 1) conversión a biocombustibles a través de a) procesos bioquímicos (empleando enzimas y/o microorganismos) o b) procesos termoquímicos tales como tecnología de Biomasa a Líquidos (BtL) (utilizando alta temperatura y catalizadores no enzimáticos); o 2) generación de calor y/o electricidad mediante procesos termoquímicos (combustión).

La eficiencia mediante la cual la biomasa puede ser convertida en energía a través de estos procesos es dependiente del número de características de composición de la biomasa. Las características de composición relevantes defieren con base en el diseño del proceso de conversión.

5 Generalmente, la eficiencia de conversión de los procesos bioquímicos es la más influenciada por la concentración de carbohidratos en la biomasa y la fragilidad con la cual dicho carbohidrato puede ser hidrolizado a azúcares fermentables. La lignina en un proceso bioquímico, normalmente se convierte a energía después de pasar a través del proceso de fermentación, cuando es quemada para generar calor y electricidad. En forma similar, la eficiencia y rendimiento de procesos termoquímicos para la producción de biocombustibles, son los más influenciados por las cantidades generales de carbono a hidrógeno a oxígeno (C:H:O porcentajes en peso) y contenido de ceniza de la biomasa. La eficiencia de los procesos de combustión termoquímicos es la más influenciada por el valor de calentamiento más alto (HHV) y contenido de ceniza de la biomasa. El HHV de la biomasa es una función del contenido de carbono, hidrógeno y oxígeno de la biomasa.

15 Algunos de estos parámetros de composición son multiparamétricos por naturaleza y/o son influenciados por otros componentes en la matriz de biomasa. Como resultado, la evaluación de estos parámetros con frecuencia da como resultado, estimados no precisos de la eficiencia de conversión de la biomasa en un proceso particular. Los métodos para utilizar datos de las medidas de eficiencia de conversión directa, pueden ser muy útiles para comprender la actividad relativa de diversos materiales de biomasa para la producción de energía.

20 El concepto de eficiencia de conversión describe el rendimiento de energía (en términos de biocombustible, calor y/o electricidad) derivados de un material de partida de biomasa sometido a un proceso particular en comparación con un rendimiento teórico de toda la energía almacenada en el material de partida de biomasa. En particular, para el procesamiento bioquímico de la biomasa a biocombustibles, es posible que dos materiales de planta que tienen parámetros de composición similar en peso (por ejemplo, celulosa, hemicelulosa, pectinas, lignina, etc.) puedan tener diferentes eficiencias de conversión. Estas diferencias probablemente se deben a las variaciones en la estructura de compuesto tridimensional de los cuatro polímeros mayores que elaboran i el volumen de las paredes celulares de la planta. Para procesos termoquímicos, estas mismas dos materias primas de composición similar puede esperarse que proporcionen eficiencias de procesos similares, debido a que los procesos termoquímicos son menos sensibles a la arquitectura de pared celular y estas dos muestras tienen los mismos porcentajes en peso C:H:O. Siguiendo el mismo razonamiento, las muestras con cantidades no similares de celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina, pero que tienen porcentajes en peso C:H:O similares en general, también se puede esperar que tengan eficiencias de proceso termoquímicas similares.

35 La presente invención presenta materiales y métodos relacionados con la anticipación rápida de los parámetros útiles para la producción de biocombustible y para el desarrollo de variedades y poblaciones de plantas mejoradas. Estos materiales y métodos incluyen modelos espectroscópicos de infrarrojo cercano (NIR) que caracterizan rápidamente el material de las plantas e identifican las que tienen mayores niveles de carbohidrato accesible por enzimas (para procesos de conversión bioquímica), así como materiales y métodos para procesar material de plantas que tienen mayores niveles de carbohidrato accesible. Estos materiales y métodos también incluyen modelos NIR que anticipan el rendimiento de biocombustible en procesos termoquímicos de Biomasa-a-Líquidos (BtL), así como carbono fijo y/o Valor de Calentamiento Superior (HHV) para la producción de calor y electricidad. La capacidad de caracterizar en forma rápida y no costosa estos parámetros facilita en gran parte el desarrollo de variedades de plantas mejoradas, poblaciones y cosechas con características mejoradas de producción de bioenergía. La capacidad de caracterizar en forma rápida y no costosa dichos parámetros, también se puede utilizar para definir operaciones en una biorefinería para optimizar el retorno económico de una materia prima de biomasa y proceso de biomasa.

## 2. Definiciones

50 El término "carbohidrato accesible" se refiere a mono y oligosacáridos liberados en la fase acuosa después del procesamiento de una materia prima de biomasa. La cantidad de carbohidrato accesible en una materia prima está relacionada con las condiciones de tratamiento previo y sacarificación enzimática elegidas para el proceso de sacarificación y para la composición y estructura de la materia prima de biomasa inicial.

55 El término "ceniza" se refiere al material inorgánico que contribuye al peso en seco de la materia prima. El contenido de ceniza en las materias primas de biomasa puede ser determinado utilizando métodos estándar, publicados tales como el Estándar ASTM E1755.

60 El término "procesamiento bioquímico" se refiere a un proceso principalmente biológico, en donde los materiales de la planta se convierten a productos líquidos utilizando enzimas y/o organismos de fermentación. El proceso bioquímico puede requerir tratamientos termoquímicos previos.

65 El término "biocombustible" incluyen pero no se limitan a biodiesel, metanol, etanol, butanol, alcanos lineales (C5-C20), alcanos de cadena ramificada (C5-C26), alcanos mezclados, alcoholes lineales (C1-C20), alcoholes de cadena ramificada (C1-C26), ácidos carboxílicos lineales (C2-C20), y ácidos carboxílicos de cadena ramificada (C2-



C26). Además, pueden ser de interés los éteres, esterres y amidas de los ácidos y alcoholes antes mencionados, así como otros conjugados de estos químicos. Muchos de estos químicos pueden ser convertidos en forma subsecuente mediante reacciones químicas a otros químicos de volumen alto, valor alto.

5 El término "biomasa" se refiere a materia orgánica. La biomasa incluye materia de plantas derivadas de cosechas de energía herbáceas y de madera, cosechas de alimentos y alimentación agrícola, desechos y residuos de cosecha agrícola, desechos y residuos de madera, plantas acuáticas y otros materiales derivados de plantas. La biomasa también puede incluir algas, desechos de pastos e incluyen algunos desechos municipales. La biomasa es un recurso renovable químicamente complejo y heterogéneo. Los componentes de la biomasa incluyen glucano, xilano, azúcares fermentables, arabinano, sacarosa, lignina, proteína, ceniza, extractos, ferulato, y acetato.

15 El término "biopotencia" se refiere al proceso de utilizar biomasa de plantas para generar electricidad y calor. Existen tres diferentes tipos de sistema de biopotencia: encendido directo, encendido en conjunto y gasificación. El encendido directo implica quemar la biomasa de la planta directamente para producir vapor para calor. Este vapor también puede ser capturado y dirigido para girar una turbina que produce electricidad. Este sistema es muy similar a la producción de potencia convencional que utiliza carbón o aceite para generar electricidad. El encendido en conjunto es similar al encendido directo excepto por el hecho de que la biomasa de la planta es quemada en combinación con un combustible fósil, con más frecuencia carbón, en un hervidor de alta eficiencia. Los sistemas de gasificación son diferentes a los otros dos métodos, en cuanto a que se utilizan temperaturas altas en un ambiente desprovisto de oxígeno para convertir la biomasa en un gas (una mezcla de hidrógeno, monóxido de carbono, y metano). Este gas puede ser utilizado para combustionar una turbina de gas de ciclo combinado eficiente en energía, el cual es mucho más similar a un motor de inyector, únicamente que éste encienda un generador eléctrico en lugar de propulsar un inyector. La electricidad producida también puede ser almacenada en baterías.

25 El término "material de carbohidrato" se refiere a los polisacáridos encontrados en biomasa, tal como glucanos, arabinanos, xilanos, y pectinas.

30 El término "celulosa" se refiere a un polisacárido de glucano, es decir, un polímero de glucosa con ligaduras (3-1,4-glucosídica. Las ligaduras-(3 en celulosa, forman cadenas lineales que son altamente estables y resistentes a ataque químico debido al alto grado de enlace de hidrógeno que puede ocurrir entre las cadenas de celulosa. La hidrólisis de la celulosa da como resultado la producción de celobiosa,  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , y la glucosa de monosacárido,  $C_6H_{12}O_6$ - La celulosa es el constituyente de carbohidrato principal de madera y otras biomásas.

35 El término "co-productos" se refiere a químicos de interés que pueden ser obtenidos de cosechas de biomasa de plantas o como subproductos de producción de biocombustible. Los co-productos pueden ser producidos mediante procesos que emplean la parte de carbohidrato de la biomasa de la planta o a partir de otros componentes. Los co-productos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a 1,3-propanediol, ácido 3-hidroxi propiónico, glicerol, etilenglicol, propilenglicol, acetona, ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido succínico, 1,4-butanediol, tetrahidrofurano, butírolactona, ácido fumárico, ácido málico, ácido 2,5-furandicarboxílico, 2,5-dimetilfurano, ácido aspártico, ácido glucárico, ácido glutámico, ácido itacónico, ácido levulínico, 3-hidroxi butirolactona, sorbitol, xilitol, y arabinitol. Ver la Publicación de T. Werpy y G. Peterson "Químicos de Alto Valor Agregado procedentes de Biomasa" U.S. Dept. of Energy (2004), disponible en el sitio web [www.osti.gov/bridge](http://www.osti.gov/bridge). Además, los éteres, esterres y amidas de los ácidos y alcoholes antes mencionados, así como otros conjugados de estos químicos, pueden ser de interés. Muchos de estos químicos pueden ser convertidos subsecuente mediante reacciones químicas a otros químicos de alto valor, y alto volumen. Otros co-productos de interés pueden incluir lignina, fenilpropanoides, ingredientes nutricionales, alimento para animales enriquecidos en forma nutricional, alimento para animales enriquecidos con proteínas, colágeno y gelatina.

50 El término "extractos" se refiere a un número de diferentes compuestos en la biomasa que pueden ser extractados de la biomasa por medio de solventes polares y no polares que no degradan la estructura de la biomasa. Dichos solventes incluyen agua, etanol, hexano, éter, benceno y metanol. La cantidad y naturaleza química de los extractos encontrados en una muestra de biomasa puede variar según la especie, tiempo de cosecha y tipo de muestra.

55 El término "contenido de ferulato y acetato" se refiere a la concentración de moléculas de ácido ferúlico y ácido acético adheridas al esqueleto de xilano de la hemicelulosa tal como se mide a través del procedimiento descrito en la Publicación de Sluiter, y asociados, NREL/TP-510-42618, Abril 2008, National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado, y el procedimiento descrito en Saulnier, L. y asociados, Carbohidrato Research (1995) Vol. 272:241-253.

60 El término "carbón fijo" se refiere a la cantidad de carbón no volátil en una muestra de biomasa después de procesamiento termoquímico bajo condiciones estandarizadas, tal como se describe en el método ASTM D3175. El carbón fijo también es conocido como "coque".

65 Los términos "Glucan", "Xilan" y "Arabinan" se refieren a las formas anhidro de la glucosa, xilosa y arabinosa que se encuentran en polímeros de carbohidrato de celulosa y hemicelulosa carbohidrato. Por lo tanto, por ejemplo, el término "glucano" se refiere a un polisacárido de monómeros de D-glucosa enlazado mediante enlaces glucosídicos.

Los siguientes son glucanos: celulosa (3-1,4-glucan), dextrano (α-1,6-glucan) y almidón (α-1,4- y α-1,6-glucan).

El término "hemicelulosa" es un término general utilizado para referirse a polisacáridos de pared celular que no son celulosas o pectinas. Las hemicelulosas contienen unidades monoméricas de repetición de una azúcar de cinco carbonos (usualmente D-xilosa o L-arabinosa) y/o una azúcar de seis carbonos (D-galactosa, D-glucosa, y D-manosa). Ver la Patente Norteamericana No. 7.112.429. Las hemicelulosas normalmente son más cortas en longitud que la celulosa y son altamente ramificadas. El xilano con frecuencia es el esqueleto estructural de las hemicelulosas de maderas duras y pastos, y la hidrólisis de estos tipos de biomasa libera productos con alto contenido de azúcar de cinco carbonos, xílosa. Las hemicelulosas de Madera suaves son más comúnmente gluco-galacto, imánanos, los cuales tienen un esqueleto de manan y producen mañosa, como el producto principal de la hidrólisis. Las hemicelulosas con frecuencia contienen grupos laterales tales como grupos acetilo, ácidos urónicos y ferulatos.

El término "valor de calentamiento más alto" (HHV) se refiere a la cantidad de calor liberado a través de una cantidad específica de un combustible a una temperatura inicial de 25°C, después de la combustión, y el regreso de los productos de combustión a una temperatura de 25°C. El HHV también es conocido como el valor calorífico bruto o energía bruta.

El término "lignina" se refiere a una sustancia polimérica polifenólica de células de plantas, con una estructura altamente aromática, reticulada, compleja. La lignina es sintetizada en plantas principalmente de tres monómeros monolignol, los cuales pueden ser metoxilados en diversos grados: alcohol sinapílico (C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>) que está incorporado en la lignina como unidades de siringilo (S); alcohol coniferílico (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>) que es incorporado en lignina como unidades de guaiacilo (G); y alcohol p-coumarílico (C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>) que está incorporada a la lignina como unidades de p-hidroxifenilo (H). Estos monómeros pueden ser sintetizados en lignina mediante polimerización de condensación extensa. La lignina presente en diferentes variedades de plantas puede tener diferentes porcentajes en peso de siringilo: guaiacilo:p-hidroxifenilo (S:G:H porcentajes en peso). Por ejemplo, ciertas variedades de pasto pueden tener lignina compuesta casi en su totalidad de guaiacilo (G). La lignina es un constituyente estructural mayor de las células de la planta en especies de madera.

El término "cierre de masa (%)" se refiere a la suma del porcentaje en peso de todos los constituyentes medidos. Los ejemplos de constituyentes medidos son: extractos, ceniza, proteína, lignina total, ácido acético, ácidos urónicos, arabinano, xilano, manano, galactano, glucano y almidón. Los valores constituyentes normalmente son reportados sobre bases de peso en seco. El cierre de masa es un indicador de la precisión de un análisis composicional de biomasa completo.

El término "Modelo NIR" se refiere a una serie de ecuaciones matemáticas validadas que anticipan una o más propiedades de una muestra con base en los datos de espectro NIR de la muestra. La una o más propiedades pueden ser: eficiencia de conversión, carbohidratos accesibles, carbohidratos recalcitrantes, lignina, porcentajes en peso de S, G, o H, eficiencia de sacarificación o rendimiento de azúcar (Glu, Xyl, Ara, Man, Gal), eficiencia de extracción/conversión de producto o rendimiento, eficiencia o rendimiento de conversión de combustible, eficiencia o rendimiento de extracción de co-producto, eficiencia o rendimiento de conversión de etanol, valor de calentamiento más alto (HHV), carbono fijo, ceniza, porcentajes en peso C:H:O, condiciones enzimáticas (tipo, proporción, carga) para la sacarificación, condiciones de tratamiento previo, condiciones de fermentación, valor económico, contenido de ferulato y acetato, emisiones NOX, co-productos de proteína, indicadores con capacidad de sostenimiento, y/o correlaciones de cualesquiera de los parámetros anteriores con las secuencias de transgenes específicas, marcadores genéticos, o locis genéticos. En muchos casos, se desarrollan diferente modelo NIR para cada combinación de pasos de procesamiento, tal como condiciones de tratamiento previo y enzima(s).

El término "aplicación de Modelo NIR", se refiere a una aplicación en computadora para hacer uso de uno o más modelos NIR. Una aplicación de modelo NIR acepta como ingreso una representación de características NIR de la muestra, y lo procesa aplicando el modelo NIR para producir una representación de las propiedades anticipadas de la muestra. Una aplicación de un modelo NIR también puede comprender módulos de entrada y/o salida adicionales. Por ejemplo, un módulo de entrada puede permitir a un usuario especificar una especie de materia prima, cultivo o perfil marcador genético y/o enzimas disponibles para procesamiento bioquímico, dirigiendo de este modo la aplicación del modelo NIR para seleccionar el modelo NIR más preciso. Un módulo de salida también puede permitir procesamiento adicional de las propiedades anticipadas de la muestra hasta un formato deseado. Por ejemplo, un módulo de salida puede transformar una representación del carbohidrato recalcitrante y carbohidrato total en galones de etanol por acre de materia prima o en un valor monetario por tonelada de materia prima.

En el caso de la eficiencia de sacarificación, se desarrolla un modelo NIR diferente para cada combinación de condiciones de tratamiento previo y enzima(s). Normalmente se obtienen los datos de espectro NIR de la muestra en una pluralidad de diferentes longitudes de onda, y las ecuaciones matemáticas son aplicadas a los datos de espectro para calcular el valor anticipado. Se pueden derivar ecuaciones de calibración mediante regresión entre datos espectroscópicos para muestras de materias primas del mismo tipo, por ejemplo, mediante regresión lineal múltiple, mediante mínimos cuadrados parciales o mediante análisis de red neural

El término "emisiones NOX" se refiere a óxidos de mono-nitrógeno (NO<sub>x</sub>), tales como NO y NO<sub>2</sub>, liberados en la atmósfera. Aunque los gases de oxígeno y nitrógeno normalmente no reaccionan a temperaturas ambiente, los gases de oxígeno y nitrógeno pueden reaccionar a mayores temperaturas para crear diversos óxidos de nitrógeno, incluyendo óxidos de nitrógeno. Los óxidos de mono-nitrógeno también pueden ser producidos mediante  
 5 combustión de materiales incluyendo nitrógeno elemental. Los óxidos de (NO<sub>x</sub>) liberados en la atmósfera pueden reaccionar con compuestos orgánicos volátiles para producir smog. Por consiguiente, las emisiones NOX pueden ser reguladas a través de diversas agencias gubernamentales. Los óxidos de azufre (SO<sub>x</sub>), específicamente dióxido de azufre, con frecuencia se generan en los mismos procesos. Las emisiones SO<sub>x</sub> son conocidas por contribuir a la  
 10 lluvia ácida.

El término "pectina" se refiere a un polisacárido que tiene un esqueleto de residuos de ácido D-galacturónico enlazados por α-(1-4) con regiones de L-ramnosa enlazados por 1,2. Las cadenas laterales que contienen arabinosa, xilosa y galactosa están presentes dependiendo del material fuente. Los poligalacturonanos, ramnogalacturonanos y algunos arabinanos, galactanos y arabinogalactanos, son pectinas. Las pectinas  
 15 normalmente se encuentran en la lámina media y pared primaria de las células de la planta.

El término "anticipación" es un término utilizado en el campo de estadísticas para designar la determinación realizada utilizando un modelo, tal como se distingue a partir de una calibración directa.

El término "producto" de refiere a un producto final del proceso de biomasa de la planta, el cual es utilizado por consumidores o industrias. Los productos derivados de biomasa de la planta incluyen energía, combustible líquido para transporte, biocombustible, combustible automotriz, combustible de inyector, etanol, co-productos, biopotencia,  
 20 calor y electricidad.

El término "proteína" se refiere a un polímero de aminoácidos enlazados mediante enlaces de amida. Una proteína puede contener hasta diversos cientos de aminoácidos. En sus estados biológicamente activos, las proteínas funcionan como catalizadores en el metabolismo y hasta cierto punto como elementos estructurales de células y tejidos. La proteína puede proporcionar valor nutricional en el alimento para animales. El contenido de proteína en la biomasa puede ser estimada multiplicando el porcentaje en masa del nitrógeno de la muestra a través de un factor  
 25 de conversión.

El término "material de carbohidrato recalcitrante" se refiere a mono y oligosacáridos que no son liberados en la fase acuosa después de procesamiento de una materia prima de biomasa. Está relacionada con el tratamiento previo y condiciones de sacarificación enzimáticas elegidas para el proceso de sacarificación.  
 35

El término "sacarificación" se refiere a la hidrólisis del material de carbohidrato para los mono y disacáridos que constituyen el polímero. Por ejemplo, sacarificación de xilano da como resultado la producción de xilosa, el constituyente de monosacárido de xilano. La sacarificación ocurre durante el procesamiento bioquímico de la biomasa en biorrefinerías, conduciendo finalmente a la producción de biocombustible tales como etanol.  
 40

La "eficiencia de sacarificación" de una muestra de alimentación, se refiere a la cantidad total de mono y disacáridos solubilizados mediante procesos de sacarificación de tratamiento previo y/o enzimáticos, divididos entre la cantidad máxima teórica de los mono y disacáridos en la muestra de biomasa que pueden haber sido liberados con base en el análisis de composición, convertidos a un porcentaje mediante una multiplicación por 100.  
 45

El término "indicadores de capacidad de sostenimiento" se refiere a componentes de subproductos de procesamiento de biomasa, tal como la composición de cenizas esperadas y nutrientes de tierra, los cuales pueden ser reciclados.

El término "procesamiento termoquímico" se refiere a un proceso no biológico a través del cual los materiales de la planta se convierten a productos líquidos, potencia y/o calor utilizando altas temperaturas y presiones.  
 50

### 3. Modelos NIR para Evaluación de Biomasa de Plantas

#### 55 3.1 Modelos NIR para Procesamiento Bioquímico de Materias primas

Se ha descubierto que los modelos NIR pueden ser desarrollados para materias primas lignocelulósicas complejas que correlacionan patrones en datos espectroscópicos con las características de desempeño de conversión de composición y biocombustible de una materia prima. En estos modelos, las correlaciones matemáticas validadas son  
 60 establecidas entre espectros NIR y constituyentes químicos determinados independientemente utilizando métodos de regresión estadística de multivariable, preferentemente Análisis de Componente Principal (PCA) y Proyección para Estructuras Latentes (PLS; ver, por ejemplo, Martens H. y Naes T., Calibración de Multivariable, Wiley & Sons, Nueva York (1989); Hoskuldsson A., J. Quimiométricas. 2:211-228 (1988); Geladi P. y Kowalski B. R., Acta de Química Analítica. 185:1-17 (1986) y Wold S. y asociados, Sistema de Laboratorio Inteligente de Quimiométricas, 2:37-52 (1987)). Los modelos construidos en forma adecuada de esta clasificación, reflejan en forma robusta y  
 65 precisa la composición química real y/o las características de conversión de biocombustible de la muestra de materia

prima. Por ejemplo, se desarrolló un modelo NIR, designado como SWG 2 en donde se obtuvieron ecuaciones PLS que convierten los datos espectroscópicos de las muestras de materias primas pasto varilla directamente en información de composición.

- 5 Un modelo NIR normalmente es desarrollado por un solo tipo de biomasa, por ejemplo, tipos herbáceos, de madera dura o madera suave. Normalmente se desarrolla un modelo NIR utilizando una especie simple de biomasa, por ejemplo, (forraje) rastrojo de maíz, pedazos de madera álamo, etc. Con el objeto de obtener diversos perfiles de composición y por lo tanto una representación de la variabilidad de la composición para el tipo de biomasa bajo consideración, se recolectaron muestras de muchas diferentes fuentes. Por ejemplo, las muestras de biomasa  
10 pueden ser recolectadas de plantas en diferentes etapas en desarrollo, por ejemplo, vegetativo temprano, vegetativo medio y plantas completamente senectas. Las muestras pueden ser recolectadas representando diferentes fracciones anatómicas, por ejemplo, hojas, tallos y nodos. Las muestras pueden ser recolectadas de variedades genéticamente diferentes, lugares geográficos diferentes y diferentes años de cosecha. La biomasa con frecuencia es un material heterogéneo, y la preparación de las muestras de biomasa de acuerdo con las técnicas tales como el método ASTM E 1757-01 pueden facilitar la recolección de datos de espectro NIR representativos de la muestra.  
15

Se formula un modelo NIR sometiendo una pluralidad de muestras de materias primas de planta del mismo tipo a espectroscopia de infrarrojo cercano para producir datos espectroscópicos NIR de cada muestra. Se utilizan técnicas de estadísticas multivariable para identificar un subconjunto de la pluralidad de muestras de las cuales se obtuvieron  
20 los datos NIR que abarcan el espacio de varianza descritos por todas las muestras. Este subconjunto es designado como el conjunto de calibración. Se mide la composición de cada muestra de materia prima en el conjunto de calibración mediante técnicas de química analítica independientes, normalmente técnicas químicas húmedas estándar. Los componentes que normalmente son útiles para medir el procesamiento bioquímico incluyen sin limitación glucano, xilano, arabinano, lignina, proteína y ceniza. Para el procesamiento bioquímico mediante  
25 tratamiento previo acoplado con sacarificación enzimática, se puede medir la eficiencia de sacarificación de cada muestra de calibración de materia prima, cuando se procesa a través de un conjunto definido de condiciones de carga de tratamiento previo y enzimas. Posteriormente se genera un modelo NIR a partir de los datos espectroscópicos, los datos de composición química húmeda y los datos de eficiencia en sacarificación, mediante la regresión de los datos de espectro contra los datos de la composición química húmeda y los datos de eficiencia de  
30 sacarificación, por ejemplo, mediante análisis multivariable de los datos y validando las ecuaciones de calibración derivadas del mismo. Aunque no son necesarios tratamientos matemáticos para el desarrollo de un modelo NIR, con frecuencia son empleados para minimizar las variables no constituyentes. Los tratamientos matemáticos comunes incluyen corrección de dispersión y ajustes de línea de base que minimizan los efectos de dispersión debido a las variaciones de la longitud de trayectoria y a los tamaños de partícula no uniformes en las muestras.  
35

Una vez que se construye el modelo NIR calibrado, es validado independientemente utilizando el conjunto de muestras de validación. El espectro NIR de las muestras de validación, se utiliza primero para producir valores de composición y conversión para dichas muestras. Posteriormente, se lleva a cabo el análisis químico de las muestras de validación utilizando técnicas analíticas estándar, y los valores NIR son comparados con los del análisis químico  
40 húmedo. Si los dos conjuntos de datos de las muestras de validación coinciden dentro de los límites de la desviación estándar de los métodos primarios utilizados para obtener los datos de calibración, entonces se considera como validado el modelo. Para procesamiento termoquímico, el valor de calentamiento más alto (HHV) y la cantidad de carbón fijo en cada muestra de la muestra de materia prima, se miden mediante técnicas termoquímicas. Posteriormente se genera un modelo NIR a partir de los datos espectroscópicos, datos de la composición química y  
45 datos termoquímicos, regresando los datos de espectro contra los datos de la composición química y los datos termoquímicos, por ejemplo, mediante análisis multivariable de los datos y validando las ecuaciones de calibración derivadas del mismo. El modelo es validado en forma adicional tal como se describe anteriormente.

Los instrumentos NIR adecuados para recolectar datos de espectro NIR de las muestras de materia prima son conocidos. La espectroscopia FT-NIR (transformación de Fourier de infrarrojo cercano) es una de las diversas técnicas espectroscópicas relacionadas que pueden proporcionar datos de espectro en una forma sensible, no invasiva y de alto rendimiento. Los espectrómetros FT-NIR utilizan interferómetros que dividen la luz fuente en un rayo que es reflejado fuera de un espejo fijo y un rayo que es reflejado fuera de un espejo de oscilación. Los dos rayos con frecuencia son combinados nuevamente para crear un interferograma, y se aplica una Transformación de  
50 Fourier para producir un espectro. Ver, por ejemplo, las Patentes Norteamericanas Nos. 5.499.095 y 6.137.108. Los ejemplos de instrumentos NIR incluyen espectrómetro Bruker Optics MPA™ FT-NIR (Bruker Optics, Ettlingen, Alemania), y los espectrómetros NIR-Systems Spectrometers (Dinamarca). Están disponibles espectrómetros móviles-campo en Analytical Spectral Devices (Boulder, Colorado, E.U.A.), Ocean Optics (Dunedin, FL), Polychromix (Wilmington, MA) y otros. También se pueden utilizar instrumentos de tiempo real y tiempo casi real (ver por ejemplo, la Patente Norteamericana No. 6.483.583 y la Patente Europea EP 1 894 461 A1). La información de espectro de  
60 recolecta de longitudes de onda visibles y NIR, normalmente dentro del rango de 400 a 2.500 nm.

La composición química del tipo de biomasa seleccionada puede ser determinada mediante métodos establecidos, por ejemplo métodos ASTM E1758-01, E1721-01 y E1755-01, y los métodos del US Department Of Energy/Energy  
65 Efficiency y Renewable Energy (DOE/EERE) *Determinación de Contenido de Proteína en Biomasa y Determinación de Extractos en Biomasa*. Hames, y asociados, NREL/TP-510-42625, Enero 2008, y Sluiter, y asociados, NREL/TP-

51 0-4261 9, Enero 2008, ambos disponibles en National Renewable Energy Laboratory. Los métodos termoquímicos para determinar los Mayores Valores de Calentamiento y el carbón fijo puedan determinarse a través de métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo métodos ASTM D5865-07a, D3175-07, D3176-89 (2002) y D3172-07a, disponibles en ASTM International, West Conshohocken, Pennsylvania, E.U.A.

5 Los datos de espectro NIR normalmente se obtienen de la muestra en una pluralidad de diferentes longitudes de onda, y las ecuaciones matemáticas son aplicadas a los datos de espectro para calcular el valor anticipado. Se pueden derivar ecuaciones de calibración mediante regresión entre los datos espectroscópicos para las muestras de materias primas del mismo tipo, por ejemplo, mediante regresión lineal múltiple, mediante mínimos cuadrados parciales, o mediante análisis de red neural.

15 Se definen las condiciones de procesamiento enzimático a través del tipo de enzimas utilizadas y la cantidad de cada enzima(s) utilizada durante el proceso de sacarificación en una biorefinería. Por ejemplo, una condición de procesamiento enzimática puede comprender el uso de una preparación de enzimas simple tal como Spezyme® CP (Genencor, E.U.A.) o Celluclast 1.5L (Novozymes, Franklinton, North Carolina). Spezyme® CP y Celluclast 1.5L son mezclas de enzimas comercialmente disponibles que contienen celulasas que son preparadas mediante fermentación de cultivo sumergido de los hongos filamentosos *Trichoderma reesei*. Estas preparaciones de celulasa tienen deficiencia en la actividad de B-glucosidasa, de modo que con frecuencia son suplementados con una preparación de B-glucosidasa tal como Novozyme 188, obtenida mediante fermentación de cultivo sumergido de *Aspergillus niger*. Novozyme 188 está disponible en Sigma (St. Louis, MO, E.U.A.) con el número de catálogo C6105. También se pueden desarrollar modelos NIR para los siguientes ejemplos de otras enzimas: B-1 ,4-endoglucanasas (EG I, EG II, EG III, y EG V); B-1 ,4-celobiohidrolasas (CBH I & CBH II); xilanasas (XYN I & XYN II); B-glucosidasa; a-L-arabinofuranosidasa; esterasa de xilan de acetilo; B-mananasa; y a-glucuronidasa. En algunas modalidades, se desarrolla un modelo NIR para una condición de procesamiento enzimática que incluye el uso de dos tipos de enzimas. Por ejemplo, se puede desarrollar un modelo NIR para una condición de procesamiento enzimática que incluye el uso de Spezyme® CP en combinación con una xilanasas. Ver por ejemplo, la Patente Norteamericana No. 5.874.274; Patente Norteamericana No. 6.333.181 y Publicación de Patente Norteamericana No. 2007/0092935. Los cócteles de enzimas que contienen una pluralidad de enzimas, algunas veces se utilizan en procesamiento de biomasa, tal como cócteles que difieren entre sí en el tipo y cantidad de cada enzima. Se podrá apreciar que se puede desarrollar un modelo NIR para cada uno de dichos cócteles y cada tipo de biomasa. Por lo tanto, se desarrolla por ejemplo un modelo NIR para una condición de procesamiento enzimática que incluye el uso de tres enzimas, una endo-P-(1,4)-glucanasa (EC 3.2.1.4), una exo-(3-(1,4)-glucanasa (EC 3.2.1.91) y una p-D-glucosidasa (EC 3.2.1.21). Ver, la Patente Norteamericana No. 7.059.993.

35 Algunas veces el procesamiento de biomasa incluye un tratamiento previo antes del procesamiento enzimático. Un tratamiento previo típico es un tratamiento previo termoquímico de dilución en ácido el cual hidroliza parcial o completamente la hemicelulosa y también puede hidrolizar partes de la lignina. Ver por ejemplo, la Patente Norteamericana No. 6.090.595. Se pueden desarrollar modelos NIR para dichos procedimientos. Por lo tanto, en algunas modalidades, se genera un modelo NIR que anticipa la eficiencia de sacarificación de una materia prima cuando se utiliza un tratamiento previo antes del procesamiento enzimático.

45 La conversión de sacarificación se determina y se calcula la eficiencia de conversión mediante técnicas conocidas. La eficiencia de sacarificación puede ser calculada para monosacáridos individuales, por ejemplo eficiencia de conversión de glucosa, para combinaciones de monosacáridos por ejemplo glucosa + xilosa, eficiencia de conversión de glucosa, o para todos los monosacáridos. La elección del mono y disacárido(s) para el cual se calcula la eficiencia de sacarificación en un modelo NIR en particular, está basada en factores tales como tipo de biomasa que será procesada, y la capacidad del proceso de conversión para utilizar todo o parte de los azúcares que están disponibles para fermentación.

50 Una vez que se ha generado un modelo NIR, el modelo puede ser aplicado a una muestra de prueba de biomasa para anticipar rápidamente los diversos parámetros y características útiles para la producción de biocombustible. Por ejemplo, la cantidad de material de carbohidrato accesible en la muestra de prueba puede ser anticipada recolectando datos de espectro NIR de una muestra de materia prima que será probada, aplicando un modelo NIR de carbohidrato accesible en materias primas del mismo tipo que la muestra a los datos de espectro y anticipando la cantidad de material de carbohidrato accesible en la muestra de prueba, con base la producción del modelo. Como otro ejemplo, un modelo NIR tal como se describe en la presente invención permite que la eficiencia de sacarificación de una muestra de materia prima sea anticipada recolectando datos de espectro NIR de una muestra de materia prima que será probada, aplicando a los datos de espectro un modelo NIR de carbohidrato accesibles en materias primas del mismo tipo que la muestra, y anticipando la eficiencia de sacarificación de la muestra con base en la salida del modelo. Se podrá apreciar que la cantidad de material de carbohidrato accesible y el rendimiento de sacarificación son valores matemáticamente interconvertible. Por lo tanto, un modelo NIR que tiene la capacidad de anticipar un valor, es modificado fácilmente para anticipar el otro valor. En forma similar, se puede generar un modelo NIR que anticipa la cantidad de material de carbohidrato recalcitrante en la muestra de materia prima, es decir, la diferencia entre el material de carbohidrato total y el material de carbohidrato accesible.

65

Se podrá anticipar que la cantidad de material de carbohidrato accesible en una materia prima puede ser diferente si la materia prima es procesada por una segunda condición de carga del tratamiento previo/enzimática definida. Por lo tanto, dos, tres, o más modelos NIR normalmente son generados a partir de una materia prima, cada modelo es relacionado con una condición de carga enzimática/tratamiento previo definida diferente.

5 En algunas modalidades, se desarrolla un modelo NIR que anticipa la eficiencia con la cual la biomasa es sacarificada bajo una combinación de carga de tratamiento previo y/o enzima definida. Se puede utilizar una serie de dichos modelos para determinar las condiciones óptimas para procesamiento de biorefinería de una materia prima que tiene un perfil de composición particular. En algunas modalidades, se genera un modelo NIR para anticipar las  
10 condiciones de carga de tratamiento previo/enzimas para el procesamiento de biomasa, que son optimizadas para ya sea el rendimiento del producto o la capacidad de ganancia del proceso. Por ejemplo, se pueden recolectar datos de espectro NIR de una muestra de materia prima de prueba, y uno o más modelos NIR del carbohidrato accesible en las materias primas del mismo tipo que la muestra se aplican a los datos de espectro. Con base en los resultados de la aplicación del modelo, se identifican las condiciones de carga del tratamiento previo/enzimas que producen una  
15 sacarificación máxima de la muestra de materia prima. Como otro ejemplo, una biorefinería puede recolectar datos de espectro NIR después del tratamiento previo de un lote de materia prima y anticipar los carbohidratos accesibles promedio utilizando modelos NIR para dicho tipo de biomasa y diferentes condiciones de sacarificación. La condición de sacarificación que es la más económica proporciona la mayor producción de biocombustible posteriormente puede ser seleccionada. También se contempla que los datos de espectro NIR pueden ser recolectados durante la  
20 sacarificación y se utilizan en modelos NIR para modificar condiciones de sacarificación en "tiempo real", si el proceso es sacarificación por lotes, sacarificación semi-continua o sacarificación continua. Por lo tanto, las biorrefinerías pueden identificar condiciones de tratamiento previo y/o cócteles de enzimas que optimicen el procesamiento de la biomasa para una producción económica máxima. Ver por ejemplo, la Publicación de Patente Norteamericana No. 2003/0092097.

25 3.2 Modelos NIR para Procesamiento Termoquímico de Materia prima

Las condiciones de procesamiento termoquímico se definen a través de la cantidad de oxígeno presente, la temperatura del procesamiento y el producto de procesamiento en la zona de reacción de la biorefinería. Dependiendo de las condiciones seleccionadas, el procesamiento termoquímico da como resultado ya sea 1) degradación completa de los polímeros de biomasa a monóxidos de carbono (CO) e hidrógeno (H<sub>2</sub>) (por ejemplo, gas de síntesis o syngas), un proceso conocido como gasificación, o 2) rendimiento parcial de los polímeros de biomasa a aceite de pirólisis, un proceso conocido como pirólisis. En procesos termoquímicos híbridos, se producen biocombustibles a partir de syngas o el gas de producción se somete a fermentación, por ejemplo mediante  
35 bacterias acetogénicas, anaeróbicas o facultativas tales como *Acetogenium kivui*, *Acetobacterium woodii*, *Acetoanaerobium noterae*, *Clostridium aceticum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium thermoaceticum*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium ljungdahlii* PETC, *Clostridium ljungdahlii* ER12, *Clostridium ljungdahlii* C- 01, *Clostridium ljungdahlii* 0-52, y *Peptostreptococcus productus*. Ver por ejemplo las Publicaciones de Patentes Nos. US 7, 285,402, 20070275447 y la Publicación de 20080057554, y la Publicación de Datar y asociados. (2004) Biotecnología y Bioingeniería, v.86, no.5, 587-594.

Por ejemplo, una condición de procesamiento termoquímica puede ser el uso de un reactor de cama fluidizada para pirólisis, en donde la biomasa es pirolizada en el reactor en la ausencia de oxígeno, seguido de gasificación de los vapores de pirólisis a gas de síntesis en solución de vapor en un proceso de etapas múltiples con el objeto de proporcionar hidrógeno y la cantidad adecuada de oxígeno para llevar a cabo la gasificación. El calor para el proceso es proporcionado quemando el carbón. Como otro ejemplo, una condición de procesamiento termoquímico puede ser el uso de un reactor de barrena de tornillo, en el cual se introduce humedad, y por lo tanto oxígeno en la etapa de pirólisis. El calor para el proceso es proporcionado quemando parte del gas producido en la etapa de pirólisis. Aún en otro ejemplo, una condición de procesamiento termoquímico puede ser el uso de un reactor de cama fluidizada y un reactor de gasificación de etapa simple en donde el vapor y el aire externo son introducidos en un flujo de ingreso durante la gasificación.

Se pueden desarrollar modelos NIR para procesos termoquímicos en una forma análoga tal como se describe para procesos bioquímicos. En forma similar a los procesos bioquímicos, algunas veces un tratamiento previo se utiliza antes de procesamiento termoquímico y los modelos NIR pueden ser desarrollados también a partir de dichos procesos. Ver, por ejemplo, la Patente Norteamericana No. 4.982.027. Por lo tanto, en algunas modalidades, se genera un modelo NIR que anticipa la eficiencia del procesamiento termoquímico de una materia prima cuando se utiliza el tratamiento previo con una condición de procesamiento termoquímico particular.

Una vez que se ha generado un modelo NIR, el modelo puede ser aplicado a una muestra de prueba de biomasa para anticipar rápidamente diversos parámetros y características útiles para la producción de biocombustible o para la generación de calor/electricidad. Por ejemplo, la cantidad de carbón fijo en la muestra de prueba puede ser anticipada recolectando datos de espectro NIR de una muestra de materia prima que será probada, aplicando a los datos de espectro un modelo NIR de carbón fijo en materias primas del mismo tipo que la muestra y anticipando la cantidad de carbón fijo en la muestra de prueba, con base en la producción del modelo. Como otro ejemplo, un modelo NIR, tal y como el que se describe en el presente documento, permite que se anticipe la

eficiencia/rendimiento de pirólisis de muestra de alimentación recolectando los datos de espectro NIR de una muestra de materia prima que será probada, aplicando a los datos de espectro un modelo NIR de carbón fijo en materias primas del mismo tipo que la muestra, y anticipando la cantidad de material volátil en la muestra con base en la producción del modelo. Se podrá apreciar que la cantidad de carbón fijo y la cantidad de material volátil son valores matemáticamente interconvertibles. Por lo tanto, se modifica rápidamente un modelo NIR que tiene la capacidad de anticipar un valor, para anticipar el otro valor. Posteriormente estos valores pueden ser correlacionados con el contenido de energía de la materia prima, permitiendo una anticipación del calor electricidad o rendimiento de biocombustible y/o eficiencia de conversión al momento el procesamiento termoquímico de la materia prima.

En algunas modalidades, se desarrolla un modelo NIR que anticipa los rendimientos del producto de la gasificación de biomasa bajo condiciones de procesamiento termoquímicas definidas. Dicho modelo puede ser utilizado para anticipar rendimientos del producto para procesamiento en biorefinería de una materia prima que tiene un perfil de composición en particular. Por ejemplo, los datos de espectro NIR de una muestra de materia prima de prueba pueden ser recolectados, y se aplican a los datos de espectro uno o más modelos NIR de carbón fijo en las materias primas del mismo tipo que la muestra. Con base en los resultados de la aplicación del modelo, se identifican condiciones de procesamiento termoquímico que producen gasificación máxima de la muestra de materia prima. Como otro ejemplo, una biorefinería puede recolectar datos de espectro NIR después del tratamiento previo de un lote de materia prima y anticipar los rendimientos del producto promedio y/o eficiencias de conversión utilizando modelos NIR para dicho tipo de biomasa y diferentes condiciones de procesamiento termoquímico. La condición de procesamiento termoquímico que es la más económica y/o eficiente (por ejemplo, proporciona la mayor producción de biocombustible) posteriormente puede ser seleccionada. También se contempla que los datos de espectro NIR puedan ser recolectados durante la gasificación y utilizarse en modelos NIR para modificar las condiciones de procesamiento termoquímico en "tiempo real". Por lo tanto, las biorefinerías pueden identificar las condiciones de tratamiento previo y/o condiciones de procesamiento que optimizan el procesamiento de biomasa para una producción económica máxima.

### 3.3 Modelos NIR para Procesamientos de Biomasa a Calor y Electricidad de las Materias primas

Se definen condiciones de procesamiento termoquímicas a través de la cantidad de oxígeno presente, la temperatura del procesamiento y el tiempo de procesamiento en la zona de reacción de la biorefinería. Dependiendo de la condiciones seleccionadas, el procesamiento termoquímico da como resultado ya sea 1) completar la degradación de los polímeros de biomasa a monóxido de carbono (CO) e hidrógeno (H<sub>2</sub>) (por ejemplo, gas de síntesis o syngas), un proceso conocido como gasificación o 2) rompimiento parcial de los polímeros de la biomasa a aceite de pirólisis, un proceso conocido como pirólisis. Los procesos termoquímicos designados para producir electricidad de calor toman el primer método (es decir, syngas). Después de la producción de syngas, el hidrógeno es purificado fuera de otros datos no combustibles y es quemado para generar calor adicional, el cual se utiliza para encender generadores de vapor que producen electricidad, muy parecido a lo que se realiza actualmente en utilidades eléctricas encendidas con carbón modernas.

Para estos procesos, HHV y carbón fijo son parámetros importantes que se relacionan con la calidad de materia prima. Los modelos NIR para estimar estos parámetros, son creados y validados tal como se describe en la Sección 3.2.

### 4. Materias primas para Modelos NIR

Tal como se mencionó anteriormente, se desarrollan modelos NIR para utilizarse con un solo tipo de biomasa. Por lo tanto, se pueden generar modelos NIR para las materias primas de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, ya sea un tipo herbáceo, de madera dura o madera suave, que se sabe o se espera que sean útiles para producir combustibles tales como etanol. Las especies de las siguientes familias se sabe que son o se espera que sean útiles: *Acanthaceae*, *Alliaceae*, *Alstroemeriaceae*, *Amaryllidaceae*, *Apocynaceae*, *Arecaceae*, *Asteraceae*, *Berberidaceae*, *Bixaceae*, *Brassicaceae*, *Bromeliaceae*, *Cannabaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cephalotaxaceae*, *Chenopodiaceae*, *Colchicaceae*, *Cucurbitaceae*, *Dioscoreaceae*, *Ephedraceae*, *Erythroxilaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Linaceae*, *Lycopodiaceae*, *Malvaceae*, *Melanthiaceae*, *Musaceae*, *Myrtaceae*, *Nyssaceae*, *Papaveraceae*, *Pinaceae*, *Plantaginaceae*, *Poaceae*, *Rosaceae*, *Rubiaceae*, *Salicaceae*, *Sapindaceae*, *Solanaceae*, *Taxaceae*, *Theaceae*, o *Vitaceae*. Géneros adecuados que incluyen *Panicum spp.*, *Sorghum spp.*, *Miscanthus spp.*, *Saccharum spp.*, *Erianthus spp.*, *Salix spp.*, *Eucalyptus spp.* y *Populus spp.* Por lo tanto, las especies de plantas adecuadas incluyen *Panicum virgatum* (pasto varilla), *Sorghum bicolor* (sorgo, pasto del Sudán), *Miscanthus giganteus* (hierba de plata), *Saccharum sp.* (residuo de caña de azúcar), *Populus balsamifera* (álamo), otras especies de álamo y sus híbridos, *Zea mays* (maíz), *Glycine max* (frijol soya), *Brassica napus* (sésamo), *Brassica júncea*, *Triticum aestivum* (trigo), *Gossypium hirsutum* (algodón), *Oryza sativa* (arroz), *Helianthus annuus* (girasol), *Medicago sativa* (alfalfa), *Beta vulgaris* (remolacha), *Pennisetum glaucum* (mijo perla), *Andropogon gerardii* (tallo azul grande), *Pennisetum purpureum* (pasto de elefante), *Phalaris arundinacea* (alpiste Reed), *Cynodon dactylon* (pasto de bermudas), *Festuca arundinacea* (festuca alta), *Spartina pectinata* (pradera espartillo), *Arundo donax* (caña gigante), *Sécale cereale* (sorgo), *Triticosecale* (sorgo de trigo X), *Carthamus tinctorius* (cártamo), *Jatropha curcas* (jatrofa), *Ricinus communis* (ricino), *Elaeis guineensis* (palma de aceite), *Linum usitatissimum* (linaza), o

*Manihot esculenta* (mandioca).

5. Parámetros y aplicaciones del modelo NIR

5 Tal como se explica con mayor detalle más adelante, los modelos NIR son útiles para una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, se pueden utilizar modelos NIR en métodos para: anticipar la composición de la materia prima, características de conversión y biocombustible, elección entre alternativas de procesamiento bioquímico y/o termoquímico disponibles, selección de materia prima para procesamiento, selección de variedad para procesamiento, selección de plantas individuales de una población, cultivo de plantas, valuación de materia prima, 10 definición de condiciones de procesamiento óptimas, análisis de tiempo real y retroalimentación para ajustes del proceso, anticipación de rendimiento de biocombustible, anticipación de rendimiento del producto, manejo de operaciones de biorefinería, manejo de una cadena de suministro de una biorefinería e influencia en el diseño de la biorefinería. Los modelos NIR pueden quedar disponibles para usuarios en diferentes formas, tal como aplicaciones por computadora o un firmware de instrumentos.

15 5.1 Anticipación de composición

En algunos aspectos la presente invención se refiere a métodos para anticipar la composición de materia prima, tal como carbohidrato total, carbohidrato accesible, carbohidrato recalcitrante, glucano, xilano, arabinano, mañano, galactano, lignina, ferulato, acetato, nitrógeno, proteína, carbón fijo, ceniza, y contenido de composición elemental. Además, las cantidades de subunidades de lignina (porcentajes en peso S:G:H), porcentajes en peso de carbono:hidrógeno:oxígeno (C:H:O), y el mayor nivel de calentamiento (HHV) podrán ser anticipadas. Todos de estos parámetros de composición pueden ser correlacionados, o enlazados, con secuencias de transgen específicas, polimorfismos de secuencias naturales, marcadores genéticos o locis genéticos. Por consiguiente, el 20 espectro NIR de las muestras de biomasa se recolectan y utilizan en un modelo NIR. El resultado puede ser una anticipación directa de una o más propiedades de composición de alimentación, uno o más valores intermedios que pueden servir para anticipar la composición de materia prima, uno o más parámetros de corriente descendente que son influenciados por la composición de materia prima. Las anticipaciones de la composición se pueden utilizar para calcular las características de desempeño de materia prima en uno o más métodos de procesamiento de interés. Dichas características de desempeño incluyen eficiencia de sacarificación o rendimiento de azúcar (Glu, Xyl, Ara, Man, Gal), diversas condiciones enzimáticas (tipo, proporción, carga) para sacarificación, condiciones de tratamiento previo, rendimiento de energía total o neta o eficiencia de conversión de energía, rendimiento de biopotencia o eficiencia de conversión, rendimiento de biocombustible o eficiencia de conversión, rendimiento de co-producto o eficiencia de extracción/conversión, valor económico de la materia prima original, emisiones NOX, co- 30 productos de proteína, e indicadores con capacidad de sostenimiento.

35 5.2 Anticipación de Conversión

En algunos aspectos de la presente invención se refiere a métodos para anticipar la eficiencia de conversión de la materia prima. La eficiencia de conversión puede ser en términos de la conversión de la materia prima de biomasa a azúcares libres, azúcares fermentables, syngas, biocombustible, etanol, calor, o energía en un proceso de escala de laboratorio, piloto o de producción. Los parámetros de eficiencia de conversión relevantes dependen del tipo de proceso de conversión empleado (bioquímico, termoquímico a biocombustible, o termoquímico a calor y electricidad). Todos de estos parámetros de conversión pueden ser correlacionados o enlazados con secuencias de transgen específicas, polimorfismos de secuencia natural, marcadores genéticos, o locis genéticos. Por consiguiente, los espectros NIR de muestras de biomasa son recolectados y traducidos por un modelo NIR. El resultado puede ser una anticipación directa de las propiedades de conversión de materia prima (tal como azúcares libres o carbohidrato accesible), uno o más valores intermedios que pueden servir para anticipar las propiedades de conversión de la materia prima (tal como carbohidrato recalcitrante), o uno o más parámetros de corriente descendente que son influenciados por la eficiencia de conversión de materia prima (tal como rendimiento de biocombustible o energía). Las anticipaciones de las propiedades de conversión pueden utilizarse para calcular las características de desempeño de materia prima de uno o más métodos de procesamiento de interés. Dichas características de desempeño incluyen eficiencia de sacarificación o rendimiento de azúcar (Glu, Xyl, Ara, Man, Gal), diversas condiciones enzimáticas (tipo, proporción, carga) para sacarificación, condiciones de tratamiento previo, rendimiento de energía total o neta o eficiencia de conversión de energía, rendimiento de biocombustible o eficiencia de conversión de biocombustible, rendimiento de biopotencia o eficiencia de conversión de biopotencia, rendimiento de co-producto o eficiencia de extracción/conversión, valor económico de la materia prima original, emisiones NOX, co- 50 productos de proteína, o indicadores con capacidad de sustentabilidad.

60 5.3 Selección de materia prima (especies y/o variables)

En algunos aspectos la presente invención se refiere a 5 métodos para seleccionar una especie de planta que tiene características de composición o conversión deseables para una materia prima de biomasa. Por consiguiente, el espectro NIR de las muestras de biomasa se recolecta y es traducido por un modelo NIR para anticipar las características de la composición o conversión, o el rendimiento del producto o biocombustible de las diferentes especies de plantas bajo consideración. La comparación de las características de composición o conversión, o los 65



rendimientos del producto o biocombustibles relevantes para un proceso de conversión particular bajo consideración, pueden permitir la selección de las materias primas de biomasa particularmente bien adaptadas para utilizarse en dicho proceso. Las especies de plantas seleccionadas pueden requerir menos recursos (calor, energía, reactivos, enzimas, catalizadores) para el proceso, mayores cantidades de rendimiento del producto (biocombustible, biopotencia, calor, electricidad, energía, o co-productos), mejorando de esta forma las economías del proceso de conversión de biomasa de plantas a productos. También se pueden seleccionar especies deseables mediante la detección de secuencias de transgen específicas, polimorfismos de secuencia natural, marcadores genéticos o locis genéticos que han estado asociados con características de composición o conversión deseables, o rendimiento del producto o biocombustible.

En algunos aspectos la presente invención se refiere a métodos para seleccionar una variedad, cultivos, crianza interna, híbridos, líneas o genotipos de una materia prima de biomasa de una planta que tiene características de composición o conversión deseables. Por consiguiente, se recolectan espectros NIR de las muestras de biomasa y son traducidas por un modelo NIR para anticipar las características de composición o conversión de las variedades de plantas, cultivos, crianzas internas, híbridos, líneas o genotipos bajo consideración. La comparación de las características de la composición o conversión relevantes para un proceso de conversión particular bajo consideración, puede permitir la selección de las materias primas de biomasa particularmente bien adecuadas para utilizarse en dicho proceso. Una variedad, cultivo, crianza interna, híbrido, línea o genotipo seleccionado puede requerir menos recursos (calor, energía, reactivos, enzimas, catalizadores) para el proceso, mayores cantidades de rendimiento del producto (biocombustible, biopotencia, calor, electricidad, energía, o co-productos), mejorando de esta forma las economías el proceso para convertir materia prima en productos. También se puede seleccionar una variedad, cultivo, crianza interna, híbrido, línea, o genotipo mediante la detección de secuencias de transgen específicas, polimorfismos de secuencias natural, marcadores genéticos o locis genéticos que han estado asociados con características de composición y i conversión deseables. Las secuencias de transgen específicas que confieren una alteración deseada en las características de composición y/o conversión de biomasa pueden identificarse clasificando plantas modelo que contienen dichos transgenos, utilizando modelos NIR tal como se describe anteriormente. Las plantas modelo adecuadas, incluyen, sin limitación *Arabidopsis*, *Brachypodium* y arroz.

#### 5.4 Selección de una población

En algunos aspectos la presente invención se refiere a métodos para seleccionar individuos de una población genéticamente diversa de una variedad, cultivo, crianza interna, híbrido, línea, o genotipo de una materia prima de biomasa de una planta que tiene características de composición o conversión deseables. Por consiguiente, se recolectan los espectros NIR de las muestras de biomasa de las plantas individuales y son traducidas por un modelo NIR para anticipar las características de la composición o conversión de los individuos bajo consideración. La comparación de las características de composición o conversión de interés entre los individuos en una población genéticamente diversas, puede permitir la selección de genotipos únicos que son particularmente bien adecuados para sistemas de producción de biomasa a energía. Los individuos seleccionados pueden ser propagados en forma sexual o vegetativa para desarrollar una nueva variedad, cultivo, crianza interna, híbrido, línea, o genotipo que puede requerir menos recursos (calor, energía, reactivos, enzimas, catalizadores) para el proceso, mayores cantidades de rendimiento del producto (biocombustible, biopotencia, calor, electricidad, energía, o co-productos), mejorando de esta forma las economías del proceso para convertir la materia prima en productos. Los individuos seleccionados pueden ser utilizados como padres en cruces genéticos o en un poli cruce para desarrollar una nueva variedad, cultivo, crianza interna, híbrido, línea, o genotipo que puede requerir menos recursos (calor, energía, reactivos, enzimas, catalizadores) para el proceso, mayores rendimientos del producto (biocombustible, calor, energía, o co-productos), mejorando de esta forma las economías del proceso para convertir la materia prima en productos.

#### 5.5 Cultivo de Plantas

En algunos aspectos la presente invención se refiere a métodos para el cultivo de plantas con características de composición y conversión deseables que pueden hacerlas más valiosas como materias primas de biocombustible dedicados. Por consiguiente, el espectro NIR de las muestras de biomasa de plantas individuales en una población de cultivo, se recolectan y son traducidas por un modelo NIR para anticipar las características de la composición o conversión. Se pueden utilizar modelos NIR para seleccionar las plantas de cultivo, las cuales se anticipa que tienen atributos deseables relacionados con la eficiencia de conversión. La eficiencia de conversión puede ser en términos de eficiencia de sacarificación, la conversión de la materia prima de biomasa, azúcares libres, azúcares fermentables, syngas, biocombustible, etanol, calor, energía, o producto en un proceso de escala de laboratorio, piloto o de producción. El parámetro(s) deficiencia de conversión relevante depende del tipo del proceso de conversión empleado (bioquímico, termoquímico a biocombustible, o termoquímico a biopotencia, calor y electricidad). Las características de la composición incluyen carbohidrato total, carbohidrato accesible, carbohidrato recalcitrante, glucano, xilano, arabinano, mañano, galactano, lignina, ferulato, acetato, nitrógeno, proteína, carbono fijo, ceniza, y contenido o rendimiento de la composición elemental. Además, los porcentajes en peso de siringilo: guaiacil- hidroxifenol (porcentajes en peso S:G:H), carbón:hidrógeno:oxígeno (C:H:O), y el valor de calentamiento más alto (HHV) pueden ser anticipados. Todos estos parámetros de conversión y composición pueden ser correlacionados, o ligados, con secuencias de transgen específicas, polimorfismos de secuencia naturales, marcadores genéticos, o locis genéticos que pueden ser útiles para acelerar el proceso de cultivo de la planta

utilizando el método de cultivo asistido por marcador. La selección de los padres del cultivo con características de composición o conversión de biomasa deseables se puede utilizar junto con el cultivo asistido por marcador, para obtener como resultado el desarrollo acelerado de un plasma germinal superior para materias primas de bioenergía dedicadas.

5 En algunos aspectos la presente invención se refiere a métodos para cultivar plantas, los cuales permiten condiciones enzimáticas favorables (tipo, proporción, carga) para sacarificación, condiciones de tratamiento previo, valor económico, emisiones NOX, co-productos de proteína, indicadores de sustentabilidad. Cuando se emplea en un sistema de procesamiento de biomasa a combustibles, biopotencia o energía. La selección de los padres del cultivo con las características de biomasa deseables anteriores, se puede utilizar junto con el cultivo asistido por marcador, para obtener como resultado un desarrollo acelerado del plasma germinal superior para la materia prima de bioenergía dedicada.

15 Por lo tanto, un método para cultivar una variedad de plantas comprende cruzar dos o más plantas de biomasa de origen y seleccionar la progenie del cruce de modo que tengan una mayor eficiencia de sacarificación en forma relativa a la eficiencia de sacarificación de al menos uno de los orígenes.

20 Las técnicas adecuadas para utilizarse en el programa de cultivo de plantas son conocidas en la técnica e incluyen sin limitación retrocruce, policruce, selección de masa, cultivo de pedigree, selección por volumen, cruce con otra población y selección recurrente. Estas técnicas pueden ser utilizadas solas o en combinación con una o más de otras técnicas en un programa de cultivo.

25 El número de plantas utilizadas en el cruce inicial se elige con base en la biología de las especies que serán utilizadas en el método, y en los programas de cultivo adecuados para dichas especies. Se pueden utilizar cualquiera de las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas mencionadas anteriormente en los métodos de cultivo descritos en el presente documento. Las plantas tales como pasto varilla, sorgo o pasto del Sudán, hierba de plata, residuos de caña de azúcar, álamo, maíz, mandioca, frijol soja, canola, cártamo, jatrofa, ricino, palma, triticale, trigo, algodón, arroz, girasol, alfalfa, caña de azúcar, remolacha, festuca alta, alpiste rojo, pradera espartillo, pasto de Bermuda, pasto elefante, tallo azul grande, caña gigante, sorgo, linaza, o mijo perla son particularmente adecuados. Las técnicas de cultivo aplicables a diversas especies de biomasa son conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, la Publicación de Allard, Principios de Cultivo de Plantas, John Wiley & Sons, Inc. (1960); Simmonds, Principios de Mejora de la Cosecha, Longman Group Limited (1979); y, Jensen, Metodología de Cultivo de Plantas, John Wiley & Sons, Inc. (1988). Por ejemplo, se conocen técnicas de cultivo aplicables a especies con polinización abierta tales como el pasto varilla. Ver, por ejemplo, la Publicación de Vogel y Jung, 5 Critical Rev. Plant Sci. 20:15-49 (2001).

35 La progenie del cruce de plantas de origen se clasifica con respecto a las que tienen mayores niveles de carbohidrato accesible. La progenie que puede ser clasificada incluye descendientes de  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ ,  $F_4$ ,  $F_5$ ,  $F_6$  y plantas de generación subsecuente,  $BC_1$ ,  $BC_2$ ,  $BC_3$ , y plantas de generación subsecuente o  $F_1BC_1$ ,  $F_1BC_2$ ,  $F_1BC_3$ , y plantas de generación subsecuente. Por lo tanto, el paso de selección puede incluir recolectar datos de espectro NIR de una muestra de materia prima de cada una o más plantas de progenie, aplicar un modelo NIR de carbohidrato accesible en reserva del mismo tipo que la muestra y anticipar la eficiencia de sacarificación de la muestra. Las progenies que tienen un incremento anticipado en eficiencia de sacarificación relativa a la eficiencia de sacarificación anticipada de al menos una de las plantas de origen, se seleccionan para cultivo adicional.

45 La selección utilizando niveles anticipados de carbohidrato accesible de modelos NIR, puede aplicarse comenzando con la progenie de generación  $F_1$ , o puede aplicarse comenzando con la progenie de una generación subsecuente. Por ejemplo, una población con polinización abierta puede utilizar un programa de selección con pruebas de progenie. Los ejemplos de selección con programas de cultivo de pruebas de progenie para pasto varilla incluyen Selección Fenotípica Recurrente Restringida (RRPS) y Selección Entre y Dentro de Familias de Medios Hermanos (B&WFS). Como alternativa, se puede utilizar un programa de selección de masa. En la selección de masa, se eligen plantas individuales deseables, semillas recolectadas, y la semilla compuesta sin pruebas para producir la siguiente generación. Ya que la selección está basada únicamente en el origen materno, y no existe control con respecto a la polinización, la selección de masa se toma en cuenta para una forma de coincidencia aleatoria con selección. La selección de masa normalmente incrementa la proporción de los genotipos deseados en la población. Se puede utilizar pasto varilla en cualquiera de estos programas, aunque la selección con las pruebas de progenie generalmente es la preferida con respecto a la selección de masa.

60 Como otra alternativa, se pueden utilizar plantas de una especie con polinización abierta como orígenes en un cruce inicial para generar una variedad sintética. Se produce una variedad sintética mediante el cruce de diversas plantas de origen. El número de variedades de plantas de origen, poblaciones, accesos naturales, ecotipos y similares, que se utilizan para generar una variedad sintética, pueden variar desde tan poco como 10 hasta tanto como 500. Normalmente aproximadamente de 100 a 300 variedades, poblaciones, etc., son orígenes utilizados para generar una variedad sintética. La semilla del trazo de la producción de semilla de origen de una variedad sintética subsecuentemente puede pasar por una o dos 3 generaciones de multiplicación, dependiendo de la cantidad de semilla producida en el trazo de origen antes de someterse a selección tal y como se describe en el presente documento.

La selección y/o clasificación se puede llevar a cabo en una o más generaciones y/o en más de una ubicación geográfica. Además, la selección y/o clasificación puede aplicarse durante una etapa de desarrollo particular en la cual se espera que el genotipo sea exhibido por la planta. La selección y/o clasificación se puede llevar a cabo para elegir las plantas que tengan una diferencia estadísticamente significativa en el nivel de material de carbohidrato accesible relativo a una planta de control o al promedio de una población de control.

En otro aspecto, los modelos NIR descritos en el presente documento pueden utilizarse para identificar los miembros de poblaciones de plantas que tienen eficiencias de conversión de sacarificación más altas. Se proporciona una población de plantas de biomasa, por ejemplo, como una recolección de plantas de diferentes accesos o una población sintética. Las muestras de biomasa de plantas en las poblaciones se clasifican utilizando modelos NIR para determinar la eficiencia de sacarificación promedio de la población. Una o más plantas en la población que tienen una mayor eficiencia de sacarificación relativa al promedio, posteriormente pueden ser identificadas. En particular, la planta(s) que tiene una eficiencia de sacarificación estadística y significativamente mayor, posteriormente es propagada mediante técnicas sexuales o asexuales. Dichas plantas pueden ser evaluadas en forma adicional con respecto a su capacidad de adaptación para producción comercial en diferentes ubicaciones geográficas, o utilizadas en programas de cultivo tal y como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, los modelos NIR descritos en el presente documento pueden utilizarse en métodos para identificar si uno o más polimorfismos genéticos están asociados con una variación en el nivel de material de carbohidrato accesible. Dichos métodos implican determinar si los polimorfismos genéticos en una población determinada exhiben ligadura con el nivel anticipado de material de carbohidrato accesible en plantas de la población. Si la presencia de un alelo particular está estadística y significativamente correlacionada con una diferencia deseada en el nivel anticipado de material de carbohidrato accesible, el alelo está asociado con la variación del rasgo y es útil como un marcador para el rasgo. Por otra parte, si la presencia de un alelo particular no está correlacionada en forma significativa con la modulación deseada, el alelo no está asociado con variación del rasgo y no se utiliza como un marcador.

Los polimorfismos genéticos que son útiles en dichos métodos incluyen repeticiones de secuencia simple (SSRs, o microsatélites), amplificación rápida de ADN polimórfico (RAPDs), polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), polimorfismos de longitud de fragmento amplificado (AFLPs) y polimorfismos de longitud de fragmento de restricción (RFLPs). Se pueden identificar polimorfismos SSR, por ejemplo, elaborando sondas específicas de secuencia y amplificando el ADN de plantilla de los individuos en la población de interés mediante PCR. Si las sondas flanquean una SSR en la población, se producirán productos PCR de diferentes tamaños. Ver por ejemplo la Patente Norteamericana 5.766.847. Como alternativa, se pueden identificar polimorfismos SSR utilizando productos PCR como una sonda contra manchados Southern de diferentes individuos en la población. Ver la Publicación de U.H. Refseth y asociados, (1997) *Electroforesis* 18: 1519. Se describe la identificación de RFLPs, por ejemplo, en la Publicación de Alonso-Blanco y asociados (*Métodos en Biología Molecular*, vol. 82, "Protocolos de Arabidopsis" pp. 137-146, J. M. Martínez-Zapater y J. Salinas, eds., c. 1998 de Humana Press, Totowa, NJ); Burr ("*Mapeo de Genes con Crianzas Internas Recombinantes*", pp. 249-254, en la Publicación de Freeling, M. y V. Walbot (Ed.), *El Manual del Maíz*, c. 1994 de Springer-Verlag Nueva York, Inc.: New York, NY, USA; Berlín Alemania); Burr y asociados *Genetics* (1998) 118: 519; y Gardiner, J. y asociados, (1993) *Genéticas* 134: 917). Se describe la identificación de AFLPs, por ejemplo, la Publicación de Patente EP 0 534 858 y en la Patente Norteamericana No. 5.878.215.

Los polimorfismos genéticos identificados tal como se describió anteriormente se pueden utilizar en un programa de crianza asistida por marcador para facilitar el desarrollo de líneas que tienen mayores niveles de material de carbohidrato accesible. Una vez que se identifica el polimorfismo genético adecuado como estando asociado con la variación del rasgo, se identifican una o más plantas individuales que poseen el alelo polimórfico correlacionado con la variación deseada. Dichas plantas posteriormente avanzan a un programa de cultivo para combinar el alelo polimórfico con una pluralidad de otros alelos u otros loci, si existen, que están correlacionados con la característica deseada. El programa de cultivo puede llevarse a cabo para un número de generaciones, según sea apropiado con el objeto de lograr la uniformidad y estabilidad deseada en la variedad o población de plantas resultantes, lo cual retiene el alelo(s) polimórfico. En la mayoría de los programas de cultivo, el análisis para el alelo polimórfico particular será llevado a cabo en cada generación, aunque el análisis se puede llevar a cabo si se desea, en generaciones alternas.

Las variedades y poblaciones de plantas obtenidas a través de los métodos descritos en el presente documento, normalmente tienen un nivel de material de carbohidrato accesible relativo a un control que es estadísticamente y significativamente mayor en  $p < 0,05$  con una estadística paramétrica o no paramétrica adecuada, por ejemplo prueba de Chi-cuadrado, prueba t del Estudiante, prueba de Mann-Whitney o prueba F. En algunas modalidades, la diferencia en la cantidad de material de carbohidrato accesible es estadísticamente significativa en  $p < 0,01$ ,  $p < 0,005$ , o  $p < 0.001$ .

En algunos casos, también se lleva a cabo la selección de otros rasgos útiles, por ejemplo selección de resistencia a hongos o tolerancia a sequías. La selección para otros de dichos rasgos se puede llevar a cabo antes, durante o después de la identificación de plantas individuales que poseen el nivel deseado de carbohidrato accesible.

## 5.6 Rendimiento del producto

En algunos aspectos la presente invención se refiere a métodos para anticipar el rendimiento del producto de la materia prima de biomasa. Los productos relevantes derivados de la materia prima de biomasa incluyen energía, combustible líquido de transportación, biocombustible, combustible automotriz, combustible de inyector, etanol, coproductos, biopotencia, calor y electricidad. El rendimiento del producto se puede anticipar para procesos de escala de laboratorio, piloto o de producción. Por consiguiente, se recolectan espectros NIR de las muestras de biomasa y son traducidos por un modelo NIR. El resultado puede ser una anticipación directa de uno o más rendimientos del producto o uno o más valores intermediarios que pueden ser correlacionados con el rendimiento(s) del producto. Se puede utilizar un modelo NIR para el rendimiento del producto producido a partir de los datos de la escala de laboratorio, para anticipar el desempeño en una instalación de escala de producción. Las anticipaciones del rendimiento del producto pueden ser útiles para manejar operaciones de generación de biorrefinería o biopotencia, seleccionar materias primas preferidas para procesamiento, imponer un valor en las materias primas suministradas, anticipar y programar la producción y manejar una cadena de suministro. Las anticipaciones de rendimiento del producto pueden ser útiles en la selección y especies, variedades, poblaciones de plantas o plantas individuales que serán las más productivas. Las plantas individuales seleccionadas en esta forma pueden ser introducidas en programas de cultivo para producir nuevas variedades, cultivos, crías internas e híbridos con un rendimiento de producto mejorado.

## 5.7 Rendimiento de biocombustible

En algunos aspectos la presente invención se refiere a métodos para anticipar el rendimiento de biocombustible de una materia prima de biomasa. Los biocombustibles fueron definidos anteriormente e incluyen etanol, butanol, biodiesel, syngas y alcanos mezclados. El rendimiento de biocombustible puede ser anticipado para procesos de escala de laboratorio piloto o de producción. Por consiguiente, los espectros NIR de las muestras de biomasa son recolectados y traducidos por un modelo NIR. El resultado puede ser una anticipación directa de rendimiento de biocombustible o uno o más valores intermediarios que pueden ser correlacionados con el rendimiento de biocombustible. Se puede utilizar un modelo NIR para el rendimiento de biocombustible producido de los datos de escala de laboratorio, para anticipar el desempeño en una instalación de escala de producción. Las anticipaciones de rendimiento de biocombustible pueden ser útiles para manejar operaciones de biorrefinería, seleccionar materias primas preferidas para procesamiento, imponer un valor en las materias primas suministradas, anticipar y programar la producción y manejar una cadena de suministro. Las anticipaciones del rendimiento de biocombustible pueden ser útiles en la selección de especies, variedades, poblaciones de plantas o plantas individuales que serán las más productivas. Las plantas individuales seleccionadas en esta forma pueden ser introducidas en programas de cultivo para producir nuevas variedades, cultivos, crías internas e híbridos con rendimiento de biocombustible mejorado.

## 5.8 Valuación de materia prima (graduación)

En algunos aspectos la presente invención se refiere a métodos para imponer un valor económico en la materia prima de biomasa de la planta. Por consiguiente, se recolectan los espectros NIR de las muestras de biomasa de la planta y son traducidos por un modelo NIR para anticipar las características de composición o conversión conocidas como favorables para un proceso en particular, o una anticipación directa o indirecta del rendimiento de biocombustible o del producto. El valor de una materia prima puede ser determinado a través de anticipaciones de las características de composición o conversión de la de las materias primas que revelan que se requieren recursos reducidos (calor, energía, reactivos, enzimas, catalizadores) para el procesamiento de dicha materia prima, mejorando de esta forma las economías en general. Las anticipaciones del rendimiento del producto biocombustible de una materia prima de biomasa de la planta pueden utilizarse para utilizar directamente la ganancia producida mediante el procesamiento de la materia prima. El valor que posteriormente paga un granjero, vendedor, intermediario u otro comerciante de la materia prima de biomasa de la planta por su materia prima, posteriormente puede verse influenciado directamente por el valor de los productos producidos y los costos de producción. La valuación de la materia prima puede ser implementada a la salida de una instalación de biorrefinería o generación de biopotencia. Conforme llegan los vagones, camiones o gabarras de la biomasa de la planta para procesamiento, se toman los espectros NIR y son traducidos por un modelo NIR para asignar un valor sobre la base de las economías generales del proceso.

## 5.9. Definición de costos de procesamiento

En algunos aspectos la presente invención se refiere a métodos para determinar el costo de la conversión de una materia prima de biomasa de la planta a un producto(s). El costo asociado con múltiples procesos alternos puede ser determinado en forma simultánea. Por consiguiente, los espectros NIR de las muestras de biomasa de la planta son recolectados y traducidos por un modelo NIR para anticipar las características de composición y conversión, o el rendimiento del producto o biocombustible. Posteriormente estos resultados son utilizados para calcular las economías asociadas con el procesamiento de la biomasa utilizando métodos alternos. La anticipación de materia prima de procesamiento puede permitir una decisión, de cuando una materia prima es más productiva en un proceso en particular. Por ejemplo, los espectros NIR de una materia prima de biomasa pueden ser traducidos por un modelo NIR para anticipar el contenido de lignina. Se pueden seleccionar materias primas con un contenido de lignina arriba

del especificado para un proceso de combustión termoquímico para generar calor y electricidad para una biorrefinería, en tanto que las muestras de biomasa con un contenido de lignina debajo del especificado son dirigidas a un proceso bioquímico para producir biocombustibles.

5 5.10 Definición de las condiciones del proceso

En algunos aspectos la presente invención se refiere a métodos para determinar las condiciones para convertir una materia prima de biomasa de la planta a uno o más productos. Los parámetros asociados con múltiples procesos alternativos pueden ser determinados en forma simultánea. Por consiguiente, se recolectan los espectros NIR de la biomasa de la planta y son traducidos por un modelo NIR para anticipar las características de composición y conversión. Estos resultados posteriormente se utilizan para calcular los parámetros económicamente importantes (calor, energía, tiempo, reactivos, enzimas, catalizadores y carga de materia prima) asociados con el procesamiento de la biomasa en un producto(s) o biocombustible(s). La anticipación de las condiciones de procesamiento puede permitir una decisión para optimizar los parámetros en un proceso particular, con el objeto de minimizar los costos de procesamiento, aumentando de esta manera las economías de la biorrefinería. Por ejemplo, los espectros NIR de una materia prima de biomasa pueden ser traducidos por un modelo NIR para anticipar el carbohidrato accesible. Las materias primas con un nivel de carbohidrato accesible arriba del especificado pueden ser seleccionadas para un protocolo de procesamiento previo acelerado, en tanto que las muestras de biomasa con un nivel de carbohidrato accesible debajo del especificado son procesadas a través de un proceso más costoso y tardado.

20 5.11 Análisis de tiempo real y retroalimentación

En algunos aspectos la presente invención se refiere a métodos para monitorear el proceso de conversión de biomasa a productos. La conversión de biomasa de la planta biocombustibles y productos, es un proceso de múltiples pasos. Los cambios químicos que ocurren durante, y en cada paso del proceso, tienen efectos potenciales en los pasos subsecuentes. Las características de la composición de la biomasa, biomasa procesada previamente, mezcla de sacarificación, mezcla de fermentación, syngas y otros intermediarios, se puede determinar durante, entre o después de los pasos en este proceso de pasos múltiples. Por consiguiente, los espectros NIR de la biomasa, biomasa procesada previamente, mezclas de sacarificación, mezcla de fermentación, syngas y otros intermediarios son recolectados y traducidos por un modelo NIR para anticipar las características de composición o conversión. Estos resultados se utilizan posteriormente para calcular parámetros económicamente importantes (calor, energía, tiempo, reactivos, enzimas, catalizadores y carga de materia prima) asociados con el procesamiento de la biomasa en el producto(s) (por ejemplo biocombustible, en los pasos corrientes o subsecuentes dentro del proceso. La anticipación de las condiciones de procesamiento pueden permitir una decisión para optimizar los parámetros en un proceso particular) con el objeto de minimizar los costos de procesamiento, mejorando de esta forma las economías de la biorrefinería.

5.12 Materia prima y manejo de biorrefinería

También se pueden incorporar modelos NIR desarrollados tal como se describe en el presente documento en métodos para manejar una producción y suministro de materia prima, y/o manejar operaciones de economía y biorrefinería. En algunas modalidades, cuyo ejemplo se muestra en la figura 9, se recolectan datos de espectro NIR 106 de una muestra de materia prima 102 que será probada utilizando el espectrómetro NIR 104. Se aplica a los datos de espectro un modelo NIR 110 de un carbohidrato accesible en materia prima del mismo tipo que la muestra, y se anticipa la eficiencia de sacarificación 112 de la muestra de materia prima con base en los resultados del paso de aplicación. Posteriormente se ingresa la eficiencia de sacarificación anticipada 112 en un sistema de índice de cosecha 114 accesible a través de un procesador de materia prima como una biorrefinería, mostrada como el servidor 116. El sistema de índice de cosecha 114 puede contener diversos datos además de la eficiencia de sacarificación anticipada 112, por ejemplo, datos del clima, análisis del clima, datos de plantación, datos de rendimiento e información de cosecha. Un procesador de 116 tiene una mejor capacidad de manejar recursos de materia prima, instalaciones de operación y distribución de productos, accedando dicha información en el sistema de índice de cosecha 114. Por ejemplo, un procesador de materia prima 116 que utiliza pasto varilla como una fuente de biomasa, puede requerir menos biomasa cuando se anticipan lotes de entrada de biomasa para tener una eficiencia de sacarificación particularmente alta. Un procesador 116 con acceso a un sistema de índice de cosecha 114 puede tomar en cuenta la eficiencia de sacarificación anticipada 112 así como factores tales como tiempo de cosecha esperado y distancia geográfica entre un productor y la biorrefinería, con el objeto de manejar de manera más eficiente las operaciones de la refinería. En algunos casos, la materia prima 102 se clasifica en forma adicional de acuerdo con las especificaciones de calidad de materia prima establecidas por el procesador de materia prima 116, y se ofrece un precio específico 120 al productor 122 de la materia prima 102 con base en la clasificación de la materia prima 118. Por ejemplo, un procesador de materia prima puede establecer un precio más alto para una biomasa que tenga una mayor eficiencia de sacarificación anticipada, pero también modificar el precio con base en la distancia entre el productor y la biorrefinería. En algunos casos, el productor 122 podrá aceptar o rechazar el precio 124.

65 Normalmente, los métodos descritos anteriormente son implementados en un sistema de computadora configurado para aceptar datos de espectro NIR recolectados de una muestra de materia prima que será probada, cuyo ejemplo

se muestra en la figura 10. Dicho sistema normalmente contienen un modelo NIR 212 de carbohidrato accesible en materias primas del mismo tipo que la muestra de materia prima, de modo que la eficiencia de sacarificación 214 de la muestra de materia prima puede ser anticipada con base en la aplicación del modelo NIR 212. La eficiencia de sacarificación anticipada 214 posteriormente es producida para ser utilizada por un sistema de índice de cosecha 216. En algunas modalidades, dichos métodos implementados por computadora incluyen recibir, en un sistema de índice de cosecha 216, una eficiencia de sacarificación anticipada 214 de una materia prima 102. La materia prima 102 está asociada en el sistema de cómputo con el productor 222 quien proporcionó la materia prima. Posteriormente se determina una distribución de cadena de suministro con base en la eficiencia de sacarificación anticipada 214 y otra información en el sistema de índice de cosecha 216, y se produce 218 una indicación de la distribución de cadena de suministro en un formato accesible para un procesador de materia prima, mostrado como el servidor 220. El procesador de materia prima 220 posteriormente puede enviar instrucciones de suministro al productor 222, quien puede reconocer el recibo de dichas instrucciones 224 y puede suministrar la materia prima 102 de acuerdo con dichas instrucciones.

Un sistema útil en dichos métodos, incluye una interface para recibir datos de espectro NIR de la muestra de materia prima, un modelo NIR de carbohidrato accesible en materia prima del mismo tipo que la muestra de materia prima que produce, para ser utilizado por un sistema de índice de cosecha, una eficiencia de sacarificación anticipada de la muestra de materia prima con base en la aplicación del modelo NIR. El sistema de índice de cosecha está configurado para determinar la calidad de biomasa de las materias primas del mismo tipo que la muestra de materia prima.

La presente invención también presenta un método para anticipar el rendimiento de biocombustible de las condiciones de bioprocesamiento consolidado y proceso termoquímico. El método es útil no únicamente para anticipar el rendimiento de biocombustible de una biomasa, sino también para seleccionar variedades adecuadas en el programa de cultivo de plantas y para colocar un valor en la biomasa recibida a través de un procesador de materia prima. Dicho método implica recolectar datos de espectro NIR de muestra de materia prima que será probada. Se aplica un modelo NIR del HHV y/o carbón fijo de las materias primas del mismo tipo que la muestra a los datos de espectro para determinar el HHV y/o el carbón fijo de la muestra de materia prima, con base en los resultados del paso de aplicación. También se aplica un modelo NIR de carbohidrato accesible en las materias primas del mismo tipo que la muestra a los datos de espectro, y se anticipa la eficiencia de la calificación de la muestra de materia prima, con base en el resultado del paso de aplicación. Las condiciones de procesamiento bioquímico y termoquímico consolidadas que producen un rendimiento de biocombustible de la muestra de materia prima posteriormente son anticipadas con base en los resultados de la aplicación de los modelos NIR.

### 5.13 Manejo de cadena de suministro

En algunos aspectos la presente invención se refiere a métodos para manejar la cadena de suministro de la materia prima de biomasa de la planta para una estación de biorrefinería o generación de biopotencia. El conocimiento del tiempo de recolección óptimo para cosechas de biomasa, distancia y tiempo de transporte, tiempo de procesamiento anticipado y el rendimiento del producto o biocombustible anticipado, permitirán el suministro en tiempo de la materia prima adecuada para asegurar que la estación de biorrefinería o generación de biopotencia está corriendo con una eficiencia óptima. Por consiguiente, se recolectan espectros NIR de las muestras de biomasa de la planta y son traducidas por un modelo NIR para anticipar las características de composición o conversión conocidas por ser favorables para un proceso en particular, o una anticipación directa o indirecta del rendimiento de biocombustible o producto. Esta información puede ser recolectada de múltiples campos en donde crecen múltiples cosechas, y producidos por múltiples actividades de crecimiento. Las anticipaciones de las características de composición o conversión, o el rendimiento del producto o biocombustible de una materia prima de biomasa de la planta pueden realizarse en el campo con el objeto de determinar el tiempo de cosecha óptimo. Las anticipaciones del tiempo de cosecha óptimo a través de múltiples campos permiten la coordinación de la recolección para llevar el valor más alto al agricultor granjero y la biorrefinería. La coordinación del tiempo de recolección con la distancia y tiempo de transporte también puede permitir el suministro "en tiempo" de la materia prima, reduciendo de esta forma la cantidad de almacenamiento del sitio que requiere la biorrefinería. Además, la anticipación de las características de composición o conversión y la anticipación directa o indirecta del rendimiento del biocombustible o producto pueden permitir que el operador de la estación de biorrefinería o de generación de biopotencia maneje la cantidad y calidad de materia prima procesada en cualquier momento, con el objeto de asegurar que se puedan cumplir de manera dependiente las metas y cuotas de producción. Tal como se observó anteriormente, las medidas NIR y las anticipaciones de los parámetros pueden iniciar en el campo, pero también se pueden utilizar conforme ingresen a la biorrefinería camiones, vagones o gabarras de la materia prima de biomasa, y continúan conforme los materiales son llevados al proceso y durante el procesamiento.

### 5.14 Indicadores de sustentabilidad

En algunos aspectos la presente invención se refiere a métodos para anticipar la sustentabilidad del sistema de producción de biomasa de la planta, monitoreando los niveles de nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, magnesio, calcio, silicón, manganeso, hierro, zinc, cloro, boro y otros micronutrientes presentes en biomasa de plantas cosechadas (referencia: Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Buchanan, Gruissem, Jones, Ed., ASPB Press,

2000, pg 1205). Por consiguiente, los espectros NIR o Raman de las muestras de biomasa de la planta son recolectados y traducidos a través de un modelo NIR o Raman para anticipar la composición elemental. Los análisis de materiales de biomasa utilizando métodos tales como absorción atómica (AA) y espectroscopia de plasma acoplado en forma inductiva (ICP) permiten la medición directa de la composición elemental que posteriormente puede ser correlacionada con características de espectro NIR y Raman para crear el modelo NIR o Raman para anticipar estos parámetros. La anticipación de los niveles elementales en biomasa de planta cosechada se puede utilizar para monitorear la cantidad y rango de ciertos elementos y micronutrientes que están siendo eliminados de la tierra, y por lo tanto la cantidad y rango que estos elementos deben ser reemplazados. Este conocimiento puede ser utilizado para realizar decisiones de manejo de cosecha, tal como determinar las rotaciones de cosecha o decisiones de co-cosecha. Este conocimiento también se puede utilizar para determinar la cantidad y composición de fertilizante aplicado a los campos en años subsecuentes para asegurar un sistema de producción sostenible.

#### 5.15 Emisiones NOX

En algunos aspectos la presente invención se refiere a métodos para anticipar las emisiones NOX, SOX, y otras emisiones de gas de invernadero asociadas con procesamiento de materia prima de biomasa de plantas en una estación de biorrefinería o generación de biopotencia particular. La composición de nitrógeno, azufre y otra composición elemental de la materia prima se puede utilizar para anticipar la emisión producida a través del procesamiento. Por consiguiente, se recolectan los espectros NIR o Raman de las muestras de biomasa de la planta y son traducidos por un modelo NIR o Ramn para anticipar la composición elemental. El análisis de los materiales de biomasa utilizando métodos tales como absorción atómica (AA) y espectroscopia de plasma acoplado en forma inductiva (ICP) permite la medición directa de la composición elemental que posteriormente puede ser correlacionada con las características del espectro NIR y Raman para crear el modelo NIR o Raman para anticipar estos parámetros. La anticipación de los niveles elementales en biomasa de plantas cosechadas se puede utilizar para monitorear la cantidad y rango ya que ciertos elementos están siendo liberados a la atmósfera al momento del procesamiento de la biomasa de la planta bajo diferentes condiciones. Este conocimiento puede ser utilizado para tomar decisiones de manejo de suministro de materia prima. Con la probabilidad de que ciertas emisiones serán gravadas, las decisiones tales como la selección de la materia prima de biomasa de la planta que será utilizada en una estación de biorrefinería o de generación de biopotencia o el precio pagado por la materia prima de biomasa de la planta, pueden ser influenciadas por la anticipación de emisiones NOX, SOX u otras emisiones de gas de invernadero.

#### 5.16 Proteína y otros co-productos

En algunos aspectos la presente invención se refiere a métodos para anticipar el rendimiento de proteína y otros co-productos de una materia prima de biomasa de planta utilizada en una biorrefinería. Los co-productos de proteína relevantes derivados de la materia prima de biomasa de plantas incluyen granos destiladores, fracciones enriquecidas con proteína de biomasa de planta para alimentos para animales, y aplicaciones comestibles, colágeno, gelatina, proteína nutricionalmente relevante y proteínas útiles para procesamiento de alimentos, aplicaciones nutricionales y farmacéuticas. Otros co-productos de interés pueden incluir fitoquímicos con aplicaciones nutricionales, de salud y farmacéuticas. Los coproductos químicos tales como ácido metacrílico, ácido acrílico y sus esteres, así como otros químicos e intermediarios para procesamiento químico pueden ser anticipados. Estos incluyen los químicos definidos como parte de la definición de biocombustibles anteriores. El rendimiento de co-producto puede ser anticipado para procesos de escala de laboratorio, piloto o de producción. Por consiguiente, los espectros NIR de las muestras de biomasa son recolectados y traducidos por un modelo NIR. El resultado puede ser una anticipación directa de uno o más rendimientos de co-producto o uno o más valores intermediarios que pueden ser correlacionados con el rendimiento(s) del co-producto. Se puede utilizar un modelo NIR para el rendimiento del co-producto producido a partir de los datos de escala de laboratorio, para anticipar el desempeño en una instalación de escala de producción. Las anticipaciones del rendimiento de co-producto pueden ser útiles para manejar las operaciones de la biorrefinería o generación de biopotencia, seleccionar las materias primas preferidas para procesamiento, imponer un valor en las materias primas suministradas, anticipar y programar la producción y manejar una cadena de suministro. Las anticipaciones del rendimiento de co-producto pueden ser útiles para seleccionar especies, variedades, poblaciones de plantas o plantas individuales que serán las más productivas. Las plantas individuales seleccionadas en esta forma pueden ser introducidas en programas de cultivo para producir nuevas variedades, cultivos, crías internas e híbridos con el rendimiento de co-producto mejorado.

#### 6. Software

En algunos aspectos la presente invención se refiere a una materia prima para desarrollar modelos NIR. Por ejemplo, el software puede correlacionar datos espectroscopios con características de desempeño de composición y conversión de biocombustible para materias primas lignocelulósicas. El software puede establecer correlaciones matemáticas validadas entre espectros NIR y constituyentes químicos determinados en forma independiente utilizando métodos de regresión estadística de multivariable, tales como los descritos anteriormente.

En algunos aspectos la presente invención se refiere a un software para utilizar uno o más modelos NIR para determinar las características de composición y/o eficiencias de conversión de una muestra de biomasa. El software

- 5 puede ser utilizado para anticipar la composición de una materia prima, tal como carbohidrato total, carbohidrato accesible, carbohidrato recalcitrante, glucano, xilano, arabinano, manano, galactano, lignina, ferulato, acetato, nitrógeno, proteína, carbón fijo, ceniza y contenido de composición elemental. El software también puede anticipar los porcentajes en peso de siringil:guiacil:p-hidroxifenol (porcentajes en peso S:G:H), carbón:hidrógeno:oxígeno (C:H:O) y el valor de calentamiento más alto (HHV). El software también puede anticipar la eficiencia de conversión de una materia prima a azúcares libres, azúcares fermentables, syngas, biocombustible, etanol, calor o energía en un proceso de escala de laboratorio, piloto o de producción. El software también puede anticipar el rendimiento de la proteína y otros co-productos de una materia prima de biomasa de planta utilizada en una biorrefinería. El software también puede anticipar las emisiones de gas NOX, SOX y otras emisiones de gas de invernadero asociadas con el procesamiento de una materia prima de biomasa de planta en particular en una estación de biorrefinería o generación de biopotencia particular. El software puede también anticipar las características de composición y/o conversión en una población de cultivo y/o recomendar o seleccionar plantas para cultivo con base en dichas anticipaciones.
- 10
- 15 El software también puede utilizar modelos NIR para seleccionar una materia prima en particular para un proceso particular. El software también puede ser utilizado para diseñar un proceso particular, diseñar una biorrefinería y/o diseñar una instalación de generación de biopotencia con base en la materia prima. Las materias primas particulares pueden ser agrupadas y analizadas con base en la especie, variedad, cultivo, crianza interna, híbrido, línea, genotipo, y/o plantas individuales dentro de una población de plantas genéticamente diversa. El software también puede utilizar los espectros NIR y los modelos NIR para valorar un lote de materia prima con base en las características de composición y conversión de la materia prima. Al proporcionar una valoración del lote de materia prima, el software puede factorizar los costos de procesamiento, transporte, impuestos y otros de dicho lote de materia prima para un proceso en particular.
- 20
- 25 El software también puede ser utilizado para manejar la producción y suministro de la materia prima y/o manejar las operaciones y economías de la biorrefinería. Por ejemplo, el software puede manejar la cadena de suministro de la materia prima de biomasa de una estación de biorrefinería o de generación de biopotencia. El software también puede anticipar la sustentabilidad de un sistema de producción de biomasa de plantas, dando seguimiento a los niveles de nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, magnesio, calcio, silicón, manganeso, hierro, zinc, cloro, boro, y otros micronutrientes presentes en la biomasa de la planta recolectada procedente de una fuente en particular.
- 30

## 7. Usos/Ventajas

- 35 La tecnología descrita proporciona una cantidad de ventajas cuando se compara con las soluciones alternativas, aunque no todas las ventajas pueden estar presentes en una modalidad específica. En general, los modelos NIR reducen en gran medida costos y aceleran el análisis del contenido de la materia prima, y por consiguiente son útiles para muchos participantes en la industria de la conversión de energía de materia prima. En consecuencia, los modelos NIR pueden acelerar el desarrollo de procesos económicamente viables para degradar la biomasa celulosa a azúcares fermentables. En algunos aspectos, los métodos y materiales descritos en el presente documento pueden utilizarse para lograr un procesamiento más eficiente en azúcares libres, y subsecuentemente etanol. Por ejemplo, el uso de modelos NIR, tal y como se describe en el presente documento, que analiza en forma rápida y precisa las muestras de materias primas proporciona un medio nuevo con el cual se ajustan las condiciones de la conversión de biomasa para lograr un procesamiento económico y/o más eficiente. Utilizando estas tecnologías, una biorrefinería puede elegir los procesos más efectivos para las materias primas disponibles. Por ejemplo, las queuing de materia prima, las condiciones de tratamiento previo, y las combinaciones y cargas de enzimas y otros parámetros de sacarificación pueden seleccionarse con base en parte, en los resultados de la aplicación de los modelos NIR a los datos de las muestras de materias primas. Particularmente atractivas son las anticipaciones de material de carbohidrato accesible en muestras de biomasa que permiten que las instalaciones de biomasa optimicen la carga de enzima para cada lote de materia prima de biomasa, ya que el costo de las enzimas con frecuencia es un componente importante del costo en la producción de bioetanol celulósico. Al proporcionar mayores rendimientos con un costo de producción equivalente o incluso disminuido, los métodos y materiales descritos en el presente documento mejoran las ganancias para agricultores y procesadores, así como también disminuir los costos para los consumidores, ayudando de esta forma a que los biocombustibles tengan un precio más excesivo, y se disminuye la necesidad de subsidio por su adopción. También se pueden llevar a cabo análisis de variables diferentes al costo, tales como rendimiento de biocombustible, producto y/o co-producto, emisiones, sustentabilidad del sistema, diseño de biorrefinería, reserva de alimento para actividades de corriente ascendente y descendente y también llevarse a cabo para influenciar las decisiones en cuanto al procesamiento de biomasa y el manejo de cadenas de suministro de la industria.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60 En otros aspectos, los modelos NIR contribuyen a desarrollar y a producir las mejores materias primas. El uso de modelos NIR tal y como se describe en el presente documento, permite una rápida identificación de la variabilidad y heredabilidad de la eficiencia de composición y conversión en poblaciones de plantas de biomasa, guiando de esta manera el cultivo de variedades o poblaciones de plantas con un desempeño superior en rendimiento de biomasa y biocombustible. Los modelos también son útiles para seleccionar orígenes potenciales de poblaciones y evaluar su progenie, avanzando de esta forma los programas de cultivo de materia prima de bioenergía. Los atributos de conversión de bioenergía valiosos pueden estar asociados con marcadores moleculares específicos de una especie
- 65



de materia prima de interés, ayudando en forma adicional al cultivo hacia objetivos con alto rendimiento de energía. Por ejemplo, las variedades de materia prima pueden ser desarrolladas con características optimizadas para opciones de conversión de energía. Utilizando la tecnología descrita, quienes cultivan plantas pueden optimizar el plasma germinal para características económicamente valiosas tal como rendimiento incrementado de biocombustible producido por acre de campo agrícola, rendimiento incrementado para un proceso de conversión específico, rendimiento y calidad del co-producto, sustentabilidad del cultivo de la de materia prima, y emisiones de invernadero disminuidas de los procesos de conversión de energía de la materia prima. La tecnología descrita puede ayudar a determinar el tiempo de recolección, la transportación y/o condiciones de almacenamiento adecuadas u óptimas.

Además, los modelos NIR reportan datos en una forma que puede ser integrada directamente en modelos de ingeniería, economía, y ciclo de vida para una evaluación más clara del valor mejorado y los puntos de precio adecuados a través de una amplia variedad de procesos de conversión de biomasa. La valoración de la materia prima puede ser más precisa, y puede tomar en cuenta estimado de rendimiento y costo de procesamiento más preciso. En síntesis, la tecnología descrita puede ser valiosa para muchos participantes en la industria de la producción de biocombustible, tal como los fabricantes de instrumentos NIR, investigadores en campos tales como las mejoras de plasma germinal y la producción de enzimas, agricultores de materia prima, mayoristas y biorrefinadores, así como operaciones de transportación y logística asociadas.

La presente invención se describirá en forma adicional en los ejemplos que se encuentran a continuación, los cuales no limitan el alcance de la misma, el cual se describe en las reivindicaciones adjuntas.

### Ejemplos

#### **Ejemplo 1 - Preparación de la Muestra y Espectroscopia NIR**

Las muestras de biomasa (normalmente al menos 20 g de peso en seco) de plantas de pasto varilla fueron recolectadas y preparadas para análisis de composición tal como se describe en la Publicación de "Preparación de Muestras para Análisis de Composición", Septiembre 2005, de US Dept. of Energy National Renewable Energy Laboratory, la cual es sustancialmente similar al método ASTM E1757-01. En síntesis, las muestras fueron secadas hasta un contenido de humedad de 10% o menos, ya sea a temperatura ambiente o en un horno de aire forzado ajustado a una temperatura de o debajo de 45°C. Después de secarse, las muestras fueron molidas en un molino de cuchilla de laboratorio estándar para pasar por un colador de 2 mm.

Se adquirieron datos de espectros de infrarrojo cercano de las muestras de pasto varilla utilizando un espectrómetro Bruker Optics MPA™ FT-NIR (Bruker Optics, Ettlingen, Alemania), corriendo el software Opus 5.5 de acuerdo de manera esencial con los protocolos del fabricante.

Se utilizó una esfera de integración con un tazón de ensamble de tazón de muestra giratorio para obtener los espectros. Se utilizó una formación de detector de sulfuro-plomo estándar para monitorear la luz NIR de 12.800 - 5.800  $\text{cm}^{-1}$ . Se seleccionó una función de apodización de 3 términos Blackman-Harris con un factor de llenado de cero de 2. El instrumento Bruker tiene una resolución máxima de 2  $\text{cm}^{-1}$ . Para minimizar el efecto de agua en el espectro de biomasa, cada muestra se secó con aire a menos del 10% de humedad antes del análisis NIR. Se recolectó la información de espectro de 12.500  $\text{cm}^{-1}$  a 3.600  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 8  $\text{cm}^{-1}$ . Para cada muestra espectroscópica, se recolectaron y promediaron un total de 64 espectros para compensar la heterogeneidad de la muestra. Cada muestra de calibración fue submuestreada tres veces y los espectros de la submuestra fueron promediados. Los espectros promediados finales fueron utilizados en la calibración del método. Estas técnicas espectroscópicas permitieron que se obtuviera un espectro de reflejo NIR de alta calidad, reproducible para cada una de las muestras de calibración. El espectro fue representativo de los datos de química de fase húmeda tal como se indica mediante los experimentos de validación que se describen más adelante. Las pruebas de capacidad de reproducción del instrumento indicado en que los límites de capacidad de reproducción de espectrómetro NIR contribuyeron a menos del 0.2% con los errores de anticipación absolutos en modelos NIR/PLS.

#### **Ejemplo 2 - Rangos de Composición de Grupo de Calibración**

Se recolectaron aproximadamente 1.000 muestras de biomasa de pasto varilla de diversas localidades geográficas en los Estados Unidos. Utilizando el análisis de componente principal (PCA), se seleccionó un conjunto de calibración de 55 muestras de crecimiento en invernadero y crecimiento en campo para representar el conjunto de muestras más grande. La figura 1 compara las calificaciones PCA del ajuste de calibración en forma relativa con las calificaciones de la población más grande de pasto varilla, demostrando la capacidad del conjunto de calibración más pequeño para representar la población más grande. Se determinaron los componentes de glucano, xilano, arabinano, lignina y ceniza mediante métodos ASTM E1758-01 *Determinación de Azúcares de Biomasa mediante Cromatografía Líquida de Alto Desempeño*, E1721-01 *Determinación de Residuos Insolubles Ácidos (Lignina) en Biomasa* y E1755-01 *Determinación de Contenido de Proteína en Biomasa DOE/EERE*. La proteína fue determinada utilizando el Método de *Determinación de Contenido de Proteína en Biomasa* DOE/EERE. Los extractos se midieron siguiendo los métodos de Extracción de Solvente Automático (ASE) en el método de *Determinación de Extractos en Biomasa*

DOE/EERE. Se calcularon azúcares fermentables como la suma de glucano, xilano y arabinano. Los rangos de composición del ajuste de calibración se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1. - Rangos de Composición de Grupo de calibración**

Componente	Rango (% peso seco)
Glucano	17,9-42,5
Xilano	15,7-26,7
Azúcares Fermentables	45,6 – 64,5
Arabinano	3,1- 9,0
Sacarosa	0,4 – 12,7
Lignina	17,2 – 23,5
Proteína	0,9 – 1,8
Ceniza	0,9 – 7,9
Extractos	5,0 – 28,3

5 Se obtuvo un análisis de cierre de masa acumulativo de las 55 muestras, utilizando un portafolio de métodos analíticos estándar descritos anteriormente. El cierre de masa promedio para las muestras de calibración fue de  $100,34 \pm 3,5\%$  (95% de Intervalo de Confianza).

10 **Ejemplo 3 - Desarrollo y Validación de Modelo de Composición**

Se utilizaron métodos de análisis multivariable para revelar las correlaciones entre la composición química de 55 muestras de biomasa de pasto varilla del Ejemplo 2 y los datos de espectro NIR de las mismas muestras. Se utilizó un procedimiento de validación de cruce total para desarrollar y validar una serie de proyecciones para ecuaciones de análisis multivariable de estructuras latentes (PLS-1) que se pueden utilizar para determinar la composición química de las muestras desconocidas. Durante el proceso de validación cruzada, se eliminó una muestra simple del conjunto de calibración, todas las otras muestras fueron utilizadas para elaborar una ecuación y la muestra faltante fue anticipada utilizando dicha ecuación. Las ecuaciones del método final fueron un promedio de todas las ecuaciones de validación cruzada. Las ecuaciones PLS-1 resultantes fueron designadas como el modelo SWG\_2. En la figura 2 muestra una ecuación representativa.

La figura 3 muestra el porcentaje en peso seco de diversos componentes de biomasa anticipados mediante el modelo SWG\_2 para cada muestra *versus* el porcentaje de peso en seco de dichos componentes, tal como se determina mediante química de fase húmeda. La gráfica indica que el modelo SWG\_2 anticipa el análisis de composición para una amplia variedad de muestras con una precisión que coincide con los métodos químicos de fase húmeda.

La composición de dos muestras de biomasa pasto varilla fue determinada a través de los métodos del Ejemplo 2. Los datos de espectro NIR son recolectados de cada muestra y la composición es anticipada a través de modelo SWG\_2. La figura 4 muestra los resultados de los análisis. Los resultados indican que la composición anticipada a través del modelo SWG\_2 no se puede distinguir de la composición determinada a través de una química de fase húmeda dentro de los errores del método. Por lo tanto, se puede utilizar el modelo SWG\_2 NIR para determinar la composición química de las muestras de prueba pasto varilla directamente de sus espectros NIR.

Se utilizó el modelo SWG\_2 para identificar las muestras de biomasa adicionales que tenían cantidades de uno o más componentes que caían fuera del rango de dicho componente en el conjunto de calibración y/o tenían un valor no representado en el conjunto de calibración original. Posteriormente se desarrollaron modelos NIR expandidos utilizando las muestras de calibración SWG\_2 originales, así como muestras adicionales y validadas. Los resultados representativos para ciertos componentes de biomasa de los modelos NIR adicionales se muestran en la tabla 2.

Tabla 2.

Modelo	Número de Muestras de calibración	Nº de PCs	R <sup>2</sup>	RMSECV	Rango (% porcentaje en peso seco)
<b>Lignina</b>					
SWG_2	44	4	0,72	1,1	16,1-23,5
SWG 3	81	6	0,93	0,8	11,6-22,6
SWG 4	85	6	0,93	0,8	11,6-22,6
<b>Glucano</b>					
SWG 2	37	4	0,79	1,7	30,3-40,2
SWG 3	55	6	0,81	2,1	23,3-40,8
SWG 4	83	6	0,82	2,3	20,8-42,8

**Ejemplo 4 - Desarrollo y Validación de Modelo de Conversión**

Se utilizaron veintiocho de las muestras utilizadas en el desarrollo de modelo de composición SWG\_2 (Ejemplo 3) para el desarrollo y validación del modelo de conversión NIR. Se recolectaron espectros NIR de cada muestra antes del procesamiento adicional. Posteriormente cada muestra fue sometida a un procedimiento de tratamiento previo con ácido y sacarificación enzimática tal como se indica a continuación. Se agregaron a un tubo de microondas aproximadamente 0,025 g de peso en seco de cada muestra y 55,6 ul de ácido sulfúrico 72% (p/p) en un volumen total 5 ml (1,3% en peso de ácido en la fase líquida del envase). El tubo fue calentado en un sistema de microondas Biotage Initiator 60 a una temperatura de 160°C durante 5 minutos con agitación. Después de enfriar con enfriamiento de conversión forzado, cada tubo fue centrifugado en 4.000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante (licor de tratamiento previo, PL) se registró un pH y se congeló el sobrenadante. Los sólidos centrifugados de cada tubo de muestra posteriormente fueron lavados de tres a cuatro veces con agua hasta que el pH de lavado fue entre 5 y 6.

Después de eliminar el agua en exceso de los tubos, los sólidos húmedos, lavados de cada muestra fueron transferidos a un nuevo tubo que contiene 50 mM de amortiguador de citrato (pH 4.8), 0.04 mg/ml de tetraciclina, 0.03 mg/ml de cicloheximida, y 20 mg de proteína total de Spezyme® CP y 20 mg de proteína total de una mezcla Novozyme 188 por gm de biomasa seca. El volumen total fue de 1 ml. Cada tubo fue incubado a una temperatura de 50°C con agitación. Después de 1 hora, se eliminaron 150 ul de cada tubo utilizando una punta con perforación ancha de 200 ul, se transfirieron a un frasco de centrifugación de 1.5 ml, y se hirvieron durante 5 minutos. La punta con perforación ancha permitió la recolección completa de los sólidos en cada tubo. Cada frasco fue centrifugado posteriormente en 14,000 rpm durante 2 minutos. Se transfirió una parte de 100 ul de cada sobrenadante a un tubo de 12 x 75-mm, se agregaron 900 ul de agua y las muestras se analizaron para glucosa en un analizador YSI 2700D Dual-Channel Biochemistry Analyzer (YSI Life Sciences, Yellow Springs, Ohio). Después de 24 horas, se eliminó toda la muestra restante, se hirvió y se centrifugó tal como se describió anteriormente. Se eliminó una alícuota de 100 ul, se diluyó 1:10, y se analizó para glucosa en el analizador YSI.

La cantidad de glucosa total liberada en el licor de tratamiento previo de ácido fue determinada como se indica a continuación. Para glucosa monomérica, se agregó carbonato de calcio a una parte de cada muestra PL mientras se sometió a agitación vorticial, hasta que se alcanzó un pH de 5-6. Posteriormente los frascos fueron centrifugados en 4.000 rpm durante 5 minutos, se transfirió una alícuota de 1 ml de cada muestra a un tubo de 12 x 75-mm, y cada alícuota fue analizada para glucosa en el Analizador YSI. Para la determinación de la cantidad de glucosa oligomérica, se utilizaron los pHs registrados previamente para determinar la cantidad de ácido sulfúrico al 72% que debe ser agregada con el objeto de lograr un 4% de ácido total (NREL Lab Practice "Determinación de Azúcares Subproductos y Productos de Degradación en muestras de Proceso de Fracción Líquida"). Se agregó el ácido sulfúrico al 72% a 2 ml de PL en un frasco de suero, posteriormente se selló con prensado y se sometió a autoclave a una temperatura de 121°C durante 60 minutos utilizando el ciclo líquido. Después de permitir que las muestras se enfriaran a temperatura ambiente, se agregó carbonato de calcio mientras se sometió a agitación vorticial hasta que el pH fue elevado a 5-6. Posteriormente se separó el carbonato de calcio del líquido, mediante centrifugación y se midió la glucosa mediante YSI. Posteriormente se calculó la glucosa oligomérica sustrayendo la concentración de glucosa monomérica medida en la muestra PL original de la concentración de glucosa monomérica medida en la muestra PL hidrolizada mediante ácido.

Se analizaron treinta y siete muestras de pasto varilla diversas utilizando un procedimiento de tratamiento previo con base. Para el tratamiento previo alcalino, se agregaron 5 ml de una solución diluida de hidróxido de amonio aproximadamente a 0,025 g de peso en seco de biomasa en un tubo de microondas Biotage 2-5 ml, de modo que la proporción en masa del amoniaco con respecto a la biomasa fuera de 2:25. El tubo se calentó en un microondas Biotage Initiator 60 a una temperatura de 205°C y se mantuvo a temperatura constante durante 30 minutos mientras se agitaba en 900 rpm. Después del enfriamiento de convección forzado a una temperatura de 50°C, el tubo fue centrifugado en 4.000 rpm durante 5 minutos y se recolectó el licor de tratamiento previo (PL). Los sólidos se lavaron agregando agua, centrifugando y desechando el agua de lavado de 2 a 3 veces hasta que se alcanzó un pH de 5 a 6 tal como se mide mediante una tira de indicación de pH 2-9.

Los sólidos húmedos, lavados de cada muestra de tratamiento previo con ácido y alcalino fueron sacarificados tal como se describió anteriormente, utilizando 20 mg de proteína/gm de biomasa seca de cada una de Spezyme® CP y Novozyme 188 filtradas. La cantidad de glucosa liberada fue determinada tal como se describe para el sistema de tratamiento previo con ácido. Para las muestras de sacarificación del tratamiento previo alcalino, se llevó a cabo una prueba adicional de azúcares oligoméricos. Se diluyeron 1:10.200 ul de líquido de sacarificación, y se agregaron 69.7 ul de ácido sulfúrico al 72% a cada muestra. Posteriormente los frascos se sometieron autoclave y se determinó el azúcar oligomérico en la misma forma que las muestras PL tratadas previamente con ácido.

La cantidad de glucosa total liberada en el licor de tratamiento previo alcalino fue determinada como se indica a continuación. Para glucosa monomérica, se evaluó directamente una porción de PL para el contenido de glucosa en el Analizador YSI. La cantidad de glucosa oligomérica fue determinada agregando 69,7 ul de ácido sulfúrico al 72% a 2 ml de PL en un frasco de suero. Posteriormente los frascos se sometieron a autoclave y se evaluaron a través de los mismos métodos tal como se describió anteriormente para las muestras PL de tratamiento previo con ácido.

Se llevó a cabo un análisis de azúcar total mediante HPLC en cada muestra PL y la muestra de sacarificación de 24 horas, con el objeto de cuantificar todos los demás azúcares disponibles, por ejemplo, xilosa y arabinosa.

5 Se utilizó el modelo de composición SWG\_2 para calcular el rendimiento teórico de la glucosa que puede ser liberada en forma máxima a través de una muestra de biomasa determinada. Se calculó la eficiencia de conversión de glucosa como la cantidad total de glucosa liberada mediante tratamiento previo con ácido/sacarificación enzimática, dividida entre la cantidad máxima teórica de la glucosa de la muestra de biomasa que puede haber sido liberada y convertida a un porcentaje, multiplicando por 100.

10 Se utilizaron los métodos de análisis multivariable para revelar las correlaciones entre el porcentaje de rendimiento de glucosa teórico bajo condiciones de conversión ácida y los datos espectro NIR de las mismas muestras. La figura 5 compara el porcentaje medido de eficiencia de conversión de glucosa *versus* la eficiencia de conversión de glucosa anticipada a partir del modelo de conversión NIR. Los resultados mostraron que el valor  $R^2$  para el porcentaje de eficiencia de conversión de glucosa anticipados por el modelo de conversión *versus* la eficiencia de conversión medida fue de 0,78, con un Error de Mínimos Cuadrados de Validación Cruzada (RMSECV) de 2,89, lo que indica una buena correlación.

20 Se utilizaron métodos de análisis multivariable para revelar las correlaciones entre la glucosa total liberada por gramo de biomasa seca bajo condiciones de tratamiento previo alcalino/sacarificación y los datos de espectro NIR a partir de las mismas. Los resultados de validación cruzados indicaron que el valor  $R^2$  para la glucosa total medida *versus* anticipada liberada por gramo de biomasa seca fue de 0,85 con un RMSECV de 12,4. La buena correlación entre los valores medidos y los anticipados a través del modelo indica que los modelos NIR de otros tipos de biomasa pueden ser desarrollados para anticipar la glucosa total liberada por gramo de biomasa seca bajo condiciones de conversión alcalina.

25 El porcentaje de rendimiento teórico, porcentaje en peso de glucano recalcitrante, y glucosa total liberada por gramo de biomasa seca son valores interconvertibles, y un modelo NIR que puede determinar uno de estos valores de los espectros NIR puede ser utilizado para determinar los otros valores.

30 **Ejemplo 5 - Variabilidad en Poblaciones de Pasto varilla**

Se recolectaron aproximadamente 30 a 200 gm de biomasa tal como se describe en el Ejemplo 1 a partir de cada una de las 790 plantas de pasto varilla crecidas en un lugar en la región plana central del sur de los Estados Unidos. La biomasa fue obtenida de las plantas que habían sido establecidas durante aproximadamente 10 a 15 años. Las plantas procedieron de 150 diferentes accesos de pasto varilla. Se adquirió un espectro FT-NIR tal como se describe en el Ejemplo 1 y la composición de cada muestra fue anticipada utilizando el modelo SWG\_2. Las figuras 6 a 8 son histogramas que muestran la distribución de frecuencia de las cantidades de glucano, xilano y lignina, respectivamente, en biomasa procedente de 790 plantas. La tabla 3 muestra el rango y cantidades promedio de ciertos componentes de biomasa en el conjunto de 790 plantas.

40 **Tabla 3. Composición de Plantas de Pasto varilla**

Componente de Biomasa	Promedio	Rango
Glucano	34,9	27,6-41,1
Xilano	23,0	17,1-27,8
Lignina	20,1	15,3-22,9
Ceniza	4,5	1,0-12,1

**Ejemplo 6 - Composición de Pasto varilla en Diferentes Etapas de Desarrollo**

45 Las muestras de biomasa de dos plantas de pasto varilla fueron recolectadas en diferentes etapas de desarrollo. Las muestras se prepararon y se obtuvieron los datos NIR tal como se describe en el Ejemplo 1. La composición fue determinada a partir de los datos NIR utilizando un modelo SWG\_2. Las cantidades de los componentes de biomasa se muestran en la tabla 4 que se encuentra más adelante.

50 **Tabla 4. Composición de Biomasa en Diferentes Etapas de Desarrollo**

Componente de Biomasa	SWG E			SWG F		
	vara joven	vara con botón	vara florecimiento	vara joven	vara con botón	vara florecimiento
Glucano	31,2	33,6	35,1	29,3	32,1	36,6
Xilano	20,2	20,2	21,0	19,8	19,9	20,6
Arabinano	4,1	4,6	6,2	3,8	4,2	4,7
Sacarosa	0,0	0,2	0,5	0,5	0,3	2,3
Lignina	17,0	18,3	19,6	16,1	17,5	20,0
Proteína	7,0	5,8	5,2	8,9	7,4	5,5

Componente de Biomasa	SWG E			SWG F		
	vara joven	vara con botón	vara florecimiento	vara joven	vara con botón	vara florecimiento
Ceniza	3,0	2,6	1,9	3,6	2,6	2,0
Extractos	13,9	13,2	11,1	13,4	12,9	10,1

Se llevó a cabo el procedimiento de tratamiento previo con ácido/sacarificación enzimática descrito en el Ejemplo 4 en cada una de las muestras de biomasa. La tabla 5 muestra el porcentaje de conversión de glucosa en los puntos de tiempo de 1 y 24 horas después del tratamiento previo ácido/sacarificación enzimática de las muestras de biomasa.

Los resultados indican que la cantidad de glucano y otros componentes en pasto varilla varían en diferentes etapas de desarrollo. Los resultados también indican que la eficiencia de conversión de glucosa para dichas muestras es mayor al 87% en la etapa de vara joven después de una sacarificación de 24 horas. En contraste, la eficiencia de conversión de glucosa para estas muestras es del 81% o menos en la etapa de la vara en florecimiento. Dichos datos pueden ser utilizados para desarrollar un modelo NIR para anticipar la composición en diversas etapas de desarrollo de un tipo de biomasa determinado y carbohidrato accesible en cada una de dichas etapas con un procedimiento de tratamiento previo y/o sacarificación determinada. Uno de los usos de dicho modelo es manejar una cosecha de biomasa de modo que ocurra la recolección en la etapa de desarrollo de la planta, ya que se obtiene como resultado una máxima producción de biocombustible de la cosecha con un procedimiento de tratamiento previo/sacarificación determinado.

**Tabla 5.**

Muestra	SWGE			SWG F		
	Vara joven	Vara con botón	Vara de florecimiento	Vara joven	Vara con botón	Vara de florecimiento
% de Eficiencia de Conversión de Glucosa (incubación 1 hora)	59,5	55,0	44,2	66,0	56,8	42,2
% de Eficiencia de Conversión de Glucosa (incubación 24 horas)	87,8	85,5	79,3	89,3	88,4	81,0

**Ejemplo 7 -Eficiencia de Conversión de Glucosa de Muestras de Pasto varilla**

La composición de biomasa para dos de las 790 plantas pasto varilla del Ejemplo 5 tal como se anticipa a través del modelo SWG\_2 se muestra en la tabla 6.

**Tabla 6.**

Planta	Glucano	Xilano	Arabinano	Sacarosa	Azúcares Fermentables	Lignina	Proteína	Ceniza	Extractos
A	39,54	24,10	7,79	1,04	63,64	22,36	1,14	228	5,62
B	35,24	23,34	7,68	2,5	58,58	20,17	1,22	4,82	6,7

El procedimiento de determinación de la eficiencia de conversión bajo condiciones de tratamiento previo con ácido, ha sido descrito en el Ejemplo 4 como se ha repetido las muestras de biomasa de las plantas A y B, midiendo la eficiencia de conversión de glucosa después de 24 y 72 horas de incubación con diversas cantidades de una mezcla de celulosa suplementada con Novozyme 188. La figura 11 muestra la eficiencia de conversión en el punto de tiempo 72 horas del tratamiento previo con ácido/sacarificación enzimática de la biomasa procedente de las plantas A y B, versus la cantidad de enzimas. El resultado indica que más del 90% del rendimiento glucosa teórico máximo de la planta B se puede lograr cuando aproximadamente 5 a 20 mg de las celulosas agregada por gramo de biomasa. En contraste, aproximadamente del 55 al 65% del rendimiento glucosa teórica máxima de la planta A, se puede lograr cuando se agregan por gm de biomasa aproximadamente 5 a 20 mg de celulasa. Estos resultados indican que la biomasa de la planta B es digerida más fácilmente con una cantidad determinada de enzimas en comparación con la biomasa de la planta A, y que la planta A no puede lograr el 100% de conversión a glucosa bajo estas condiciones, incluso en altas cargas de enzimas.

Las muestras de biomasa de otras 90 plantas de pasto varilla fueron sometidas al mismo procedimiento de tratamiento previo con ácido y sacarificación enzimática tal como se describió anteriormente para las plantas A y B, utilizando 20 mg de proteína/gm de biomasa seca de cada una de Spezyme® CP y Novozyme 188 filtrada. La figura 12 muestra la distribución de frecuencia para la eficiencia de conversión de glucosa para las 90 muestras de

biomasa. Los resultados indican que la eficiencia de conversión de glucosa varía considerablemente entre las plantas de pasto varilla.

**Ejemplo 8 - Porcentaje en Peso Anticipado de Glucano versus Glucosa Liberada**

Se recolectaron muestras de biomasa múltiple de una variedad de diferentes plantas de pasto varilla de diversas localizadas geográficas en los Estados Unidos, y se preparan tal como se describe en el Ejemplo 1. Los datos NIR de cada muestra de biomasa se utilizan posteriormente para anticipar el porcentaje en peso del glucano en cada muestra utilizando el modelo SWG\_2. Las muestras de biomasa posteriormente fueron sometidas al procedimiento de tratamiento previo con ácido y al procedimiento de tratamiento previo alcalino descrito en el Ejemplo 4.

La cantidad de glucosa liberada, en términos de mg/g, posteriormente fue trazada contra el porcentaje en peso anticipado por SWG\_2 del glucano para cada muestra de tratamiento previo con ácido y para cada muestra de tratamiento previo con base. Los resultados se muestran en las figuras 13 y 14. Los resultados indican que no existe una correlación significativa entre la cantidad anticipada de glucano versus la cantidad de glucosa liberada para el tratamiento previo con ácido, y una ligera correlación positiva por el tratamiento previo con base.

Los resultados de estos experimentos junto con los resultados descritos en el Ejemplo 4 indican que la medición y anticipación de la cantidad de glucano presente en la muestra de biomasa es insuficiente para identificar el material de biomasa que produce una mayor cantidad de glucosa. Además, los resultados indican que un modelo NIR de conversión tal como el descrito en el Ejemplo 4, anticipa la eficiencia de conversión de glucosa con suficiente precisión para identificar un material de biomasa que produce una cantidad relativamente mayor de glucosa liberada incluso aunque el material posea un contenido de glucano relativamente inferior.

**Ejemplo 9 - Rendimiento de Etanol de la Biomasa de Pasto varilla**

Se recolectó la biomasa de tres plantas de pasto varilla y los datos NIR fueron adquiridos tal como se describe en el Ejemplo 1. La cantidad de glucano fue anticipada utilizando el modelo SWG\_2 de cada planta, y el rendimiento de la biomasa de cada planta fue determinada. Los resultados, los cuales se muestran en la tabla 7, indican que la cantidad de glucano en cada muestra es similar, mientras que el rendimiento de la biomasa varía entre las muestras. Con base en estos datos, el rendimiento teórico máximo del etanol a partir de glucano por tonelada de biomasa y el rendimiento teórico máximo del etanol por acre, fueron calculados para cada muestra, y se ilustran en la tabla 7.

**Tabla 7.**

% de Rendimiento de Glucano y Biomasa para Muestras de Pasto varilla				
Variedad de Pasto varilla	% de Glucano*	Rendimiento de Etanol Teórico (Gal/Ton)**	Rendimiento de Biomasa (tons/acre)	Rendimiento de Etanol Teórico (Gal/Acre)***
Origen	39,11	67,6	7,7	518
Variedad C	40,18	69,4	7,9	548
Variedad D	39,27	67,9	6,4	435
*Anticipado del modelo SWD_2				
**Gal etanol/ton de biomasa (con base en la cantidad de glucano y suponiendo 100% de conversión de glucano en glucosa)				
*** Gal etanol/acre de pasto varilla (con base en la cantidad de glucano, rendimiento de biomasa y suponiendo 100% de conversión de glucano en glucosa)				

La eficiencia de conversión de la glucosa de la biomasa de cada planta fue determinada utilizando el procedimiento de tratamiento previo con ácido/sacarificación enzimática descrito en el Ejemplo 4, y los resultados se muestran en la tabla 8. Los resultados indican que la biomasa de la Variedad D tuvo una mayor eficiencia de conversión de glucosa que la biomasa de las otras dos plantas y por lo tanto tuvo más carbohidrato accesible como un % del carbohidrato total relativo a la Variedad C.

**Tabla 8. Eficiencia de Conversión de Glucosa de Muestras de Pasto varilla**

Variedad de Pasto varilla	% de Glucano	Eficiencia de Conversión de Glucosa (%)	Rendimiento de Etanol (Gal/Ton)*	Rendimiento de Etanol Teórico (Gal/Acre)**
Origen	39,11	75,7	51,2	393
Variedad C	40,18	74,8	52,0	410
Variedad D	39,27	83,2	56,5	362
*Con base en la cantidad de eficiencia de conversión de glucano y glucosa				
** Con base en la cantidad de eficiencia de conversión de glucano, glucosa y rendimiento de biomasa				

Con base en la eficiencia de conversión glucosa y el rendimiento de biomasa, se calculó el rendimiento de etanol por tonelada de rendimiento de etanol por acre que pueden ser producidos por cada planta. Los resultados se muestran en la tabla 5, e indican que la mayor eficiencia de conversión de glucosa puede compensar los rendimientos de biomasa reducidos. Los resultados también indican que las plantas han sido identificadas de modo que tengan tanto un mayor rendimiento de biomasa como una mayor eficiencia de conversión de glucosa.

**Ejemplo 10 - Anticipación de Condiciones de Carga Enzimática para Procesamiento de Biomasa**

Se recolectó biomasa de una pluralidad de plantas de pasto varilla que crecen en campo de una variedad simple. Se preparó una muestra de biomasa tal como se describe en el Ejemplo 1 y se determinó la composición utilizando técnicas de química de fase húmeda descritas en el Ejemplo 1. El componente de glucano constituyó el 36,8% del peso seco de la biomasa. La cantidad máxima teórica de glucosa en la muestra de biomasa que pudo haber sido liberada se calculó para ser de 408 mg de glucosa por gm de biomasa seca.

Se llevó a cabo el procedimiento de tratamiento previo con ácido/sacarificación enzimática descrito en el Ejemplo 4 en la muestra de biomasa, y la cantidad promedio de glucosa liberada después de 24 horas de incubación con un exceso de Spezyme® y Novozyme 188 (20 mg Spezyme® suplementado con 20 mg Novozyme 188 por gm de biomasa) fue determinada para ser de 254 mg de glucosa por gm de biomasa. Con base en el rendimiento de glucosa máximo teórico con un exceso de enzimas, la cantidad de enzima necesaria para lograr la eficiencia de conversión de glucosa máxima se calculó para ser de 2,5 mg de Spezyme y 12.5 mg de Novozyme 188 por gm de glucano accesible.

Se repitió el procedimiento de tratamiento previo con ácido/sacarificación enzimática con la muestra de biomasa, excepto que se utilizaron 12,5 mg de Spezyme® y 12,5 mg de Novozyme 188 por gm de glucano accesible. La cantidad de glucosa solubilizada después de la incubación durante 1 y 24 horas, se determinó y se muestra en la tabla 9. Los resultados indican que el porcentaje de conversión de glucosa en 12,5 mg/gm de glucano accesible es equivalente o mejor al porcentaje de conversión de glucosa en 20 mg/gm de biomasa.

**Tabla 9.**

Cantidad de Enzimas (mg/min)	% de Conversión de Glucosa (incubación 1 hora)	% de Conversión de Glucosa (incubación 24 horas)
20	25	65
12,5	26	70

Asumiendo un costo de enzimas de \$0,32 por galón de etanol, estos resultados indican que se puede tener como resultado ahorros de \$0,13 por galón de etanol. Bajo esta suposición, una biorrefinería que produce 100.000.000 galones de etanol al año puede reducir los costos anuales por enzimas aproximadamente el \$12.800.000 por enzimas de carga sobre la base de carbohidratos accesibles.

**Ejemplo 11 - Anticipación de Mezclas de Enzimas Óptimas para Procesamiento de Biomasa**

Se recolectó biomasa de una pluralidad de plantas de pasto varilla que crecen en campo de una variedad simple. Se preparó una muestra de biomasa tal como se describe en el Ejemplo 1 y se determinó la composición utilizando técnicas de química de fase húmeda descritas en el Ejemplo 1. El componente de glucano constituyó el 36,8% del peso seco de la biomasa. La cantidad máxima teórica de la glucosa en la muestra de biomasa que pudo haber sido liberada se calculó como 408 mg de glucosa por gm de biomasa seca.

El procedimiento de tratamiento previo con ácido/sacarificación enzimática descrito en el Ejemplo 4 se llevó a cabo en la muestra de biomasa, excepto que se utilizaron diferentes cocteles de enzimas. El cóctel de enzima I contenía un complejo de celulasa propietario (designado como S13) y Novo 188. El complejo de celulasa cataliza el rompimiento del material celulósico en glucosa, celobiosa, y polímeros de glucosa superior. El cóctel de enzimas II contenía un complejo de enzimas propietario (designado S12) y Novo 188. El complejo de enzimas contenía diversas carbohidrasas, incluyendo arabinasa, celulasa, beta-glucanasa, hemicelulasa y xilanas. El cóctel de enzima III contenía una xilanasa propietaria (designada S14), Spezyme® y Novo 188. La xilanasa tuvo una endoxilanasas de alta temperatura que hidroliza xilanos y arabino-xilanos en oligosacáridos y algunos mono, di- y trisacáridos, y es activa con arabino-xilanos tanto solubles como insolubles. Se utilizó como control un cóctel de enzimas que contiene Spezyme® y Novo 188.

Los resultados se muestran en la tabla 10. Los resultados indican que la cantidad de glucosa solubilizada varía dependiendo del cóctel de enzima utilizado para la sacarificación. Dichos datos pueden ser utilizados para desarrollar un modelo NIR de carbohidratos accesibles para cada combinación de cóctel de enzimas, tipo de biomasa y procedimiento de tratamiento previo/sacarificación.

**Tabla 10.**

Cantidades de enzimas*	% de Eficiencia de Conversión de Glucosa (incubación 24 horas)			
	Mezclas de Enzimas de Control	Cóctel de Enzimas I	Cóctel de Enzimas II	Cóctel de Enzimas III
0	0	0	0	ND
2,5	45	42	5	ND
5	53	52	7	ND
10	56	55	12	ND
20	58	58	14	56
40	58	58	13	ND

\*=mg de cada enzima o complejo de enzima por gm de biomasa  
 ND=No Determinado

**Ejemplo 12 Modelos NIR para Contenido de Lignina**

- 5 Se prepararon muestras de biomasa tal como se describe en el Ejemplo 1 a partir plantas de pasto varilla, *Arabidopsis thaliana*, y sorgo. Se prepararon veintiséis, 71 y 24 muestras de pasto varilla, *Arabidopsis*, y sorgo, respectivamente. Se recolectaron los espectros NIR para cada una de las muestras de biomasa de pasto varilla, *Arabidopsis*, y sorgo antes del procesamiento adicional.
- 10 Se determinaron cantidades S, G, y H mediante la siguiente técnica de química húmeda. Se llevó a cabo la GC-MS en un pirolizador Py-2020is (Frontier Labs, Japón), acoplado a un QP2010 GC-MS (Shimadzu, Japón). Se pesaron tres mg de material de biomasa molido finamente (2 mm máximo) de cada muestra, en un tazón de acero inoxidable desactivado. Se introdujo cada muestra mediante gravedad en el pirolizador ajustado a una temperatura de 550°C. La inferiase entre el pirolizador y la entrada GC se ajustó a una temperatura de 300°C. La separación de los pirolisados se llevó a cabo en una columna GC (VF-5MS, 30M x 0,25mm x 0,25um). Se ajustó el flujo de helio a través del pirolizador de la columna en 450 ml/min y 1,0 ml/min respectivamente. La proporción de división de entrada fue de 350:1. Se ajustó inicialmente el programa de temperatura de columna a una temperatura de 70°C (mantenida durante 4 minutos) en un rango de elevación de 20°C/min hasta una temperatura final de 350°C. La adquisición de espectro de masa fue de 3.333 amu/seg, a partir de 50 amu - 300 amu después de un retraso de 4,5 minutos.
- 20 Se recolectaron las áreas de los picos que corresponden a diferentes unidades de lignina y a levoglucosano y furfural (ambos como marcadores de celulosa). Se utilizó un metilestearato como un estándar interno para cuantificar la cantidad de cada componente y determinar en forma cuantitativa de esta manera la cantidad de H, G, y S presente en la muestra. Se calculó la lignina total como la suma de H, G, y S.
- 25 Los datos GC-MS de pirólisis y los datos de espectro NIR fueron determinados para desarrollar y validar los modelos NIR para H, G, S, y las cantidades de lignina total en pasto varilla, *Arabidopsis*, y sorgo. Los valores R<sup>2</sup> y RMSECV para H, G, S medidos versus anticipado, y/o contenido de lignina total se muestran en la tabla 11. Las correlaciones positivas significativas entre los valores medidos y los anticipados a través de los modelos indican que los modelos NIR pueden ser desarrollados para H, G, S, y las cantidades de lignina total en otros tipos de biomasa y otras especies de plantas.
- 30

**Tabla 11.**

Especie de planta	Componente	R <sup>2</sup>	RMSECV
Pasto varilla	H Lignina	0,61	0,408
	G Lignina	0,81	0,487
	S Lignina	0,91	0,0591
	Lignina total	--*	--
Arabidopsis	H Lignina	0,78	0,347
	G Lignina	0,78	0,763



Especie de planta	Componente	R <sup>2</sup>	RMSECV
	S Lignina	0,70	0,133
	Lignina total	0,79	1,13
Sorgo	H Lignina	--	--
	G Lignina	0,77	0,886
	S Lignina	0,90	0,22
	Lignina total	0,81	1,86
*--= No Determinado			

**Ejemplo 13 Modelo NIR para Contenido de Ferulato**

5 Se obtuvieron muestras de biomasa libres de extracto tal como se indica a continuación. Se extrajo un gramo de una muestra de biomasa, preparado como se describe en el Ejemplo 1, con 70 ml de agua y 70 ml de etanol durante 15 minutos cada uno a una temperatura de 70°C para eliminar los extractos. Los sólidos que permanecen después de la eliminación del solvente, se secaron en horno a una temperatura de 45°C y se almacenaron en un desecador.

10 Se recolectaron los espectros NIR de cada una de las diez muestras de pasto varilla y los extractos. Se extrajeron cincuenta mg de cada muestra con 1,5 ml de 2M KOH a una temperatura de 80°C durante 10 minutos utilizando un extractor asistido por microondas. El extracto se eliminó y los sólidos fueron desechados. Cada extracto como de color café oscuro, fue neutralizado con 500 microlitros de 4M HCl, lo cual convirtió a cada extracto a un color amarillo pálido. Cada extracto fue secado en un secador de vacío con un trampa criogénica, se resuspendió en 1,0 ml de metanol, se sónico para facilitar la re-suspensión y se filtró para eliminar las partículas. La solución resultante tuvo un color dorado claro.

20 Se transfirieron quinientos microlitros de cada solución filtrada a un frasco LC-MS junto con 200 ul de un estándar de ácido sinapínico de 1 mg/ml (50/50 metanol: agua). Se agregaron al frasco 300 uL de agua. La separación de ácido ferúlico se llevó a cabo en un espectrómetro de masa Agilent 1200 acoplado a un Unique ToF utilizando Phenomenex Synergi Max-RP (150x4,6 mm) y un perfil de elución de gradiente de 10% Metanol con 1% de Ácido Acético a 90%. El tiempo de adquisición de espectro de masa de vuelo se ajustó a 4 espectro/segundos con un rango de 50 - 500 m/z. Se calculó el contenido de ferulato en cada muestra.

25 Se utilizaron los datos MS y los datos de espectro NIR para desarrollar y validar un modelo NIR para contenido de ferulato pasto varilla. Los resultados de la validación cruzada indicaron que el valor R<sup>2</sup> para el contenido de ferulato versus anticipado fue de 0,95 con a RMSECV de 0,26. La buena correlación entre los valores medidos y los anticipados a través del modelo, indica que los modelos NIR pueden ser desarrollados para contenido de ferulato de otros tipos de biomasa y otras especies de planta.

30

**Ejemplo 14 - Análisis de Variedades de Pasto varilla de Campos Altos v Campos Bajos**

35 Se desarrolló un modelo NIR expandido para composición de pasto varilla y eficiencia de conversión de glucosa y se validó tal como se describe para el modelo SWG\_2. El modelo expandido fue designado como el modelo SWG\_5. Se crecieron tres variedades de tierras altas y tierras bajas en un solo lugar en Illinois. Se utilizó el modelo SWG\_5 para anticipar el contenido de glucano libre de extractos y la eficiencia de conversión de glucosa de cada variedad. Los datos mostraron que las variedades de tierras altas y tierras bajas pueden ser distinguidas con base en sus contenidos de glucano libre de extractos y la eficiencia de conversión de glucosa.

**Ejemplo 15 - Desarrollo y Validación de Modelo de Sorgo**

40 Se prepararon muestras de biomasa tal como se describe en el Ejemplo 1 a partir de 30 muestras de sorgo. Se recolectaron espectros NIR de cada muestra antes del procesamiento adicional tal como se describe en el Ejemplo 1.

45

Se determinó la composición de las 30 muestras de sorgo utilizando un método tal como se describe en el Ejemplo 2. Se midió el almidón siguiendo el método de Determinación de Almidón en Biomasa DOE/EERE.

50 Se sometieron veinticuatro de las muestras de biomasa a tratamiento previo con ácido y sacarificación enzimática tal como se describe en el Ejemplo 4, excepto que las condiciones de tratamiento previo con ácido fueron de 0,6% en

peso de ácido y la fase líquida del envase y el sistema de microondas se ajustó a una temperatura de 180°C. Se midió la glucosa total liberada por gramo de biomasa seca, así como el rendimiento de glucosa teórico tal como se describe en el Ejemplo 4. Además, se midió la cantidad de glucano recalcitrante en porcentaje en peso.

5 Se utilizaron la glucosa total liberada, el rendimiento de glucosa teórico y la cantidad de glucano recalcitrante para desarrollar y validar los niveles de conversión NIR para sorgo. Los modelos fueron generados utilizando el software Opus tal como se describe en el Ejemplo 1. Se desarrollaron modelos NIR utilizando el software de análisis multivarianza integrado en el software OPUS. Los modelos para análisis de composición de sorgo utilizaron un rango de longitud de onda de 8.000-3.800  $\text{cm}^{-1}$ . Los tratamientos matemáticos utilizaron primero la normalización de derivado vector con 17 puntos de ablandamiento.

15 El modelo para rendimiento de glucosa teórico utilizó cinco componentes principales, el modelo para glucano recalcitrante utilizó cuatro componentes principales y el modelo para glucosa total liberada utilizó cinco componentes principales. Los resultados de la validación cruzada indicaron que el valor  $R^2$  para el rendimiento de glucosa teórico medido versus anticipado fue de 0,92 con un RMSECV de 2,45. El valor  $R^2$  para el glucano recalcitrante medido versus anticipado fue de 0,92 con un RMSECV de 1,01. El valor  $R^2$  para glucosa total liberada medida versus anticipada fue de 0,86 con un RMSECV de 9,4. La buena correlación entre los valores medidos y los anticipados a través de los modelos, indica que se pueden desarrollar para sorgo otros diversos modelos NIR.

20 Se adquirieron datos de espectros de infrarrojo cercano a partir de las mismas 30 muestras de sorgo utilizando un analizador de contenido rápido Foss XDS (Foss North America, Edén Prairie, MN), corriendo el software WinISI 4.0 de acuerdo con los protocolos del fabricante.

25 Se utilizó un módulo de transporte de sólidos Foss RCA con una célula de muestra granular gruesa, para obtener el espectro de todas las muestras. El instrumento está equipado con una formación de detector de reflectancia estándar que incluye dos detectores de silicón para monitorear la luz visible de 400-850 nm y cuatro detectores de sulfuro plomo para monitorear la luz NIR de 850-2.500 nm. El instrumento Foss tiene una resolución máxima de 1 nm. Para minimizar el efecto del agua en el espectro de biomasa, cada muestra se secó con aire a menos del 10% de humedad antes del análisis NIR. Se recolectó la información de espectro a partir de 400-2.500 nm ( $25.000\text{cm}^{-1}$  a  $4.000\text{cm}^{-1}$ ) con una resolución de 1 nm. Para cada muestra espectroscópica, se recolectaron un total de 64 espectros y se promediaron para compensar la heterogeneidad de la muestra. Cada muestra de calibración fue submuestreada tres veces, y se promediaron los espectros de submuestra. Se utilizaron espectros promediados finales en la calibración del método. Estas técnicas espectroscópicas permiten que se obtenga un espectro de reflectancia NIR reproducible, de alta calidad de cada una de las muestras de calibración. Las pruebas de capacidad de reproducción del instrumento indicaron que los límites de capacidad de reproducción del espectrómetro NIR, contribuyeron en menos del 0,2% a los errores de anticipación absolutos en los modelos NIR/PLS.

35 Se desarrollaron modelos NIR utilizando el software de análisis multivarianza integrado en el software Win I SI. Los modelos para análisis de composición de sorgo utilizaron un rango de longitud de onda de 400-2.500 nm. Los tratamientos matemáticos utilizaron primero el derivado seguido de una corrección de dispersión de variado normal estándar y eliminar la tendencia del ajuste de línea de base con un polinomio de primer orden, bloque de 4 nm y abertura de 4 nm.

45 Los resultados de validación cruzada de los modelos NIR de diversos componentes de biomasa utilizando el instrumento Bruker del instrumento Foss se muestran en la tabla 12. Las buenas correlaciones entre los valores medidos y los anticipados a través de los modelos indican que se pueden desarrollar modelos NIR utilizando diferentes instrumentos y programas de software. Las buenas correlaciones también indican que se pueden desarrollar para sorgo otros diversos modelos NIR.

50

**Tabla 12**

Componente	OPUS Bruker			WinISI Foss		
	$R^2$	SECV	PCs	$R^2$	SECV	PCs
Glucano	0,923	2,1	5	0,969	2,5	4
Xilano	0,858	1,0	3	0,949	0,9	3
Lignina	0,861	1,2	3	0,954	0,9	3
Proteína	0,800	0,4	7	0,951	0,3	3
Ceniza	0,869	0,8	4	0,658	0,6	2
Almidón	0,547	0,4	4	0,976	0,8	3
Extractos	0,925	1,2	4	0,992	1,2	7
Sucarosa	0,978	1,0	4	0,997	1,0	6
Acetilo	0,483	1,4	3	0,875	0,2	2

**Ejemplo 16 - Procesamiento Termoquímico de Biomasa**

Se recolectaron muestras de biomasa de once diferentes plantas de pasto varilla de diversas ubicaciones geográficas en los Estados Unidos, y se prepararon tal como se describe en el ejemplo 1. Se adquirió un espectro FT-NIR tal como se describe en el ejemplo 1, y se anticipó la composición de cada muestra utilizando el modelo SWG\_2. Los resultados se muestran en las tablas 13 y 14.

**TABLA 13. Cantidades de Diversos Componentes en muestras de pasto varilla**

Planta	Arabinano	Ceniza	Extractos	Glucano	Lignina	Proteína	Sacarosa	Xilano	Total
2439 079	9,0	3,4	4,6	37,8	21,9	1,4	0,7	24,8	103,5
2439118	5,9	2,1	7,2	37,3	20,7	1,1	4,0	21,9	100,2
2439 204	7,0	3,2	7,5	33,9	19,3	1,0	1,3	20,6	93,8
2439 471	7,8	5,2	7,7	32,3	18,8	1,2	0,3	23,1	96,4
2439 507	9,5	8,1	5,8	32,0	19,4	1,6	1,3	25,0	102,6
2439613	8,2	4,9	6,1	33,7	19,8	1,1	1,4	23,0	98,2
2439 520	8,0	7,8	7,4	27,6	16,7	0,6	0,8	20,0	88,7
7000 000	3,8	4,2	9,4	31,9	17,5	5,6	3,8	21,0	97,2
7000 005	3,2	4,3	11,8	31,5	17,3	3,9	2,2	21,4	95,6
7000 484	6,2	1,1	7,3	40,7	22,4	2,4	1,0	21,5	102,5
7000 487	6,5	1,6	7,8	40,2	22,4	2,2	-0,6	21,9	101,9

10

**Tabla 14. Rango en Diversos Componentes y Muestras de Pasto varilla**

	Arabinano	Ceniza	Extractos	Glucano	Lignina	Proteína	Sacarosa	Xilano
Min.	3,2	1,1	4,6	27,6	16,7	0,6	-0,6	20,0
Máx.	9,5	8,1	11,8	40,7	22,4	5,6	4,0	25,0
Media	6,6	4,2	7,8	34,1	19,4	2,1	1,5	21,9
Desviación estándar	2,0	2,3	1,9	4,1	2,0	1,5	1,4	1,6

15

Se llevó a cabo unos análisis elementales para carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y azufre en algunas de las muestras de biomasa anteriores, así como muestras de biomasa de una planta adicional. Además, las cantidades de ceniza, material volátil y carbón fijo fueron determinadas utilizando los métodos mostrados en la tabla 15. Los resultados de estas técnicas de química de fase húmeda se muestran en las tablas 16 y 17.

**Tabla 15. Métodos ASTM Estándar Para Análisis Termoquímico (ASTM 2007)**

Determinación	Método
Última	ASTMD3176
Próxima	ASTM D3172
Humedad	ASTM D3173
C, H, N	ASTM D5373
Azufre	ASTM D4239
Oxígeno	ASTM D5622
Ceniza	ASTM D3174
Materia volátil	ASTMD3175
HHV	ASTM D5865

**Tabla 16. Composición Elemental de Muestras de Pasto varilla \***

Planta	C	H	N	O	S	Ceniza	Materia volátil	Carbón fijo
2439 079	47,09	6,53	0,23	49,01	0,05	4,02	78,40	17,58
2439118	46,93	6,55	0,26	49,20	0,05	4,03	78,16	17,81
2439 204	46,64	6,57	0,32	48,33	0,05	4,52	78,50	16,98
2439471	45,67	6,47	0,27	48,04	0,08	6,48	77,79	15,73
2439 507	45,68	6,47	0,26	47,48	N,D,	7,73	76,59	15,68
2439 613	46,76	6,37	0,25	47,24	0,05	5,26	77,37	17,37

Planta	C	H	N	O	S	Ceniza	Materia volátil	Carbón fijo
2439 520	45,29	6,42	0,33	47,44	0,05	7,38	76,66	15,96
7000 000	46,91	6,75	1,11	46,82	0,12	4,68	75,80	19,52
7000 005	46,21	6,64	0,97	46,23	0,10	5,42	74,87	19,71
7000 484	48,01	6,74	0,49	48,76	0,08	2,84	76,62	20,54
7000 488	44,16	6,29	0,84	46,25	0,09	12,07	71,84	16,09

\*Los valores se expresan como porcentaje en peso seco

**Tabla 17. Rango en Cantidades Elementales en Muestras de Pasto varilla \***

	Carbono	Hidrógeno	Nitrógeno	Oxígeno	Azufre	Ceniza	Materia volátil	Carbón fijo
Min	44,16	6,29	0,23	46,23	0,05	2,84	71,84	15,68
Max	48,01	6,75	1,11	49,20	0,12	12,07	78,50	20,62
Promedio	46,30	6,52	0,53	47,65	0,08	5,81	76,39	17,80
Desviación estándar	1,00	0,14	0,35	1,02	0,02	2,42	1,98	1,86

\*Los valores se expresan como porcentaje en peso seco

5 El HHV de cada muestra fue determinado a través de las técnicas de química de fase húmeda descritas en el método de prueba estándar ASTM D5865, para Determinación de Valor de Calentamiento más Alto en Carbón. Los resultados se muestran en la tabla 18.

**Tabla 18. HHV de Muestras de Pasto varilla**

Planta	HHV*
2439 079	8.045,16
2439 118	8.031,80
2439 204	7.968,95
2439 471	7.854,22
2439 507	7.834,56
2439 613	7.899,43
2439 520	7.816,57
7000 000	8.166,72
7000 005	8.020,21
7000 484	8.160,44
7000 488	7.508,44
Min	7.508,44
Máx	8.166,72
Media	7.946,69
Desviación estándar	178,16

\*Los valores se expresan como BTU por libra de biomasa

10 Los resultados indican que el HHV varía aproximadamente el 10% entre las muestras. Los resultados también indican que el rango en las cantidades de carbón fijo entre las muestras varía aproximadamente 25%, y que no existe una fuerte relación entre el análisis elemental y el carbón fijo.

**Ejemplo 17 - Desarrollo y Validación del Modelo Termoquímico**

15 Se prepararon ciento veinte cuatro muestras de pasto varilla y se recolectaron espectros NIR de cada muestra tal como se describe en el Ejemplo 1. Los espectros NIR fueron recolectados de cada una de las muestras antes de procesamiento adicional. El valor de calentamiento más alto C, H, N, O, y la materia volátil de cada muestra fueron determinadas utilizando los métodos estándar ASTM descritos en el Ejemplo 1 6.

20 Se utilizaron datos termoquímicos y datos de espectro NIR para desarrollar y validar los modelos NIR para HHV, C, H, N, O y materia volátil en pasto varilla. Los valores R<sup>2</sup> y RMSECV para HHV medido versus anticipado, C, H, N, O y materia volátil se muestran en la tabla 19. Las correlaciones positivas significativas entre los valores medidos y los anticipados a través de los métodos indican que los modelos NIR pueden ser desarrollados para HHV, C, H, N, O, carbón fijo y materia volátil en otros tipos de biomasa y otras especies de plantas.

25

**Tabla 19.**

Componente (PC)	$R^2$	RMSECV
Nitrógeno (5)	0,964	0,1
Carbono (9)	0,719	0,4
Carbono volátil (6)	0,813	1,0
Hidrógeno (4)	0,681	0,7
Oxígeno (6)	0,708	0,6
HHV(5)	0,696	69,2

Otras modalidades

- 5 Quedará entendido que aunque la presente invención ha sido descrita junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior está proyectada para ilustrar y no limitar el alcance de la presente invención, el cual se define a través del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones que se encuentran a continuación.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para formular un modelo NIR, que comprende:

- 5 a) someter una pluralidad de muestras de materia prima de biomasa del mismo tipo a una espectroscopia de infrarrojo cercano para producir datos espectroscópicos NIR de cada una de dichas muestras;  
 b) medir las composiciones químicas de cada una de dichas muestras de materia prima mediante técnicas de química de fase húmeda;  
 10 c) medir los carbohidratos accesibles definidos como la cantidad total de mono y oligosacáridos solubilizados para cada una de dichas muestras de materia prima después del procesamiento bajo una condición definida de tratamiento previo/carga enzimática; y  
 d) generar dicho modelo NIR a partir de dichos datos espectroscópicos, de dichas composiciones químicas, y de dichas cantidades de mono y oligosacáridos solubilizados, donde dicho modelo NIR tiene la capacidad de anticipar la cantidad de carbohidrato accesible o recalcitrante producida a partir de una muestra de materia prima  
 15 de prueba después del procesamiento bajo dicha condición definida de tratamiento previo/carga enzimática usando datos espectrales de dicha muestra de materia prima de prueba.

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho paso de generación comprende la regresión de dichos datos espectrales con respecto a dichos datos de la composición química y dichas cantidades de mono y oligosacáridos.

20

3. El método de la reivindicación 1, que comprende además:

- e) medir la cantidad total de mono y oligosacáridos solubilizados para cada una de dichas muestras de materia prima después del procesamiento a través de una segunda condición definida de tratamiento previo/carga enzimática; y  
 25 f) generar un segundo modelo NIR de dichas cantidades de mono y oligosacáridos solubilizados bajo dichas segundas condiciones definidas de tratamiento previo /carga enzimática, de dichos datos espectroscópicos y de dichos datos de la composición química.

30 4. El método de la reivindicación 1, en el que la generación de dicho modelo NIR a partir de dichas composiciones químicas y de dichas cantidades de mono y oligosacáridos solubilizados comprenden generar dicho modelo NIR para carbohidrato recalcitrante.

5. Un método para seleccionar una planta, que comprende:

35

- a) proporcionar una población de plantas de una especie de biomasa;  
 b) recolectar datos de espectro NIR de una muestra de materia prima de cada una de las plantas en dicha población;  
 c) aplicar a dichos datos de espectro el modelo NIR de carbohidrato accesible formulado en la reivindicación 1 en materias primas del mismo tipo que dicha muestra;  
 40 d) anticipar la eficiencia de sacarificación de cada una de dichas muestras de materia prima, con base en los resultados de dicho paso de aplicación; y  
 e) identificar una o más plantas en dicha población que tiene una mayor eficiencia de sacarificación anticipada relativa a la cantidad anticipada promedio de carbohidrato accesible para dicha población.

45

6. El método de la reivindicación 5, en el que dicha población de plantas es una población de plantas de pasto varilla, sorgo, hierba de plata o caña común.

7. Un método para determinar la cantidad de material de carbohidrato accesible en una muestra de materia prima, que comprende:

50

- a) recolectar los datos de espectro NIR de una muestra de materia prima que será probada;  
 b) aplicar el modelo NIR de carbohidrato accesible formulado en la reivindicación 1 en materias primas del mismo tipo que dicha muestra a dichos datos de espectro; y  
 55 c) anticipar la cantidad de material de carbohidrato accesible en dicha muestra de materia prima, con base en los resultados de dicho paso de aplicación.

8. Un método para determinar la cantidad de material de carbohidrato recalcitrante en una muestra de materia prima, que comprende:

60

- a) recolectar los datos de espectro NIR de una muestra de materia prima que será probada;  
 b) aplicar el modelo NIR de material de carbohidrato recalcitrante formulado en la reivindicación 1 en materias primas del mismo tipo que dicha muestra a dichos datos de espectro; y  
 65 c) anticipar la cantidad de material de carbohidrato recalcitrante en dicha muestra de materia prima, con base en los resultados de dicho paso de aplicación.

9. Un medio legible en computadora que comprende instrucciones del programa de computadora, que cuando se ejecutan a través de un procesador, llevan a cabo un método, comprendiendo el método:
- 5 a) recibir los datos de espectro NIR de una muestra de materia prima que será probada;  
b) aplicar a dichos datos de espectro el modelo NIR de carbohidrato accesible formulado en la reivindicación 1 en las materias primas del mismo tipo que dicha muestra; y  
c) llevar a un sistema de índice de cosecha la cantidad de material de carbohidrato accesible en dicha muestra de materia prima, con base en los resultados de dicho paso de aplicación.
- 10 10. Un método implementado en computadora, comprendiendo dicho método:
- 15 a) recolectar los datos de espectro NIR de una muestra de materia prima que será probada;  
b) aplicar a dichos datos de espectro el modelo NIR de carbohidrato accesible formulado en la reivindicación 1 en las materias primas del mismo tipo que dicha muestra; y  
c) anticipar la eficiencia de sacarificación de dicha muestra de materia prima con base en la aplicación de dicho modelo NIR; y  
d) producir dicha eficiencia de sacarificación anticipada para ser utilizada por un sistema de índice de cosecha, estando configurado dicho sistema para determinar la calidad de la biomasa de las materias primas a partir de las cuales se obtiene dicha muestra de materia prima.
- 20 11. Un sistema que comprende:
- 25 una interfase para recibir los datos de espectro NIR de una muestra de materia prima; y el modelo NIR de carbohidrato accesible formulado en la reivindicación 1 en materias primas del mismo tipo que dicha muestra de materia prima, el cual produce, para ser utilizada por un sistema de índice de cosecha, una eficiencia de sacarificación anticipada de dicha muestra de materia prima con base en la aplicación de dicho modelo NIR, en donde dicho sistema de índice de cosecha está configurado para determinar la calidad de biomasa para las materias primas del mismo tipo que dicha muestra de materia prima.
- 30 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 7-11, en el que dicha muestra de materia prima es un material herbáceo.
- 35 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 7-11, en el que dicha muestra de materia prima comprende biomasa de pasto varilla, sorgo, hierba de plata o caña común.
- 40 14. El método de la reivindicación 7 u 8, que además comprende anticipar la cantidad de rendimiento de producto, con base en los resultados de dicho paso de aplicación.
15. El método de la reivindicación 14, en el que dicho rendimiento de producto es un rendimiento de biocombustible.

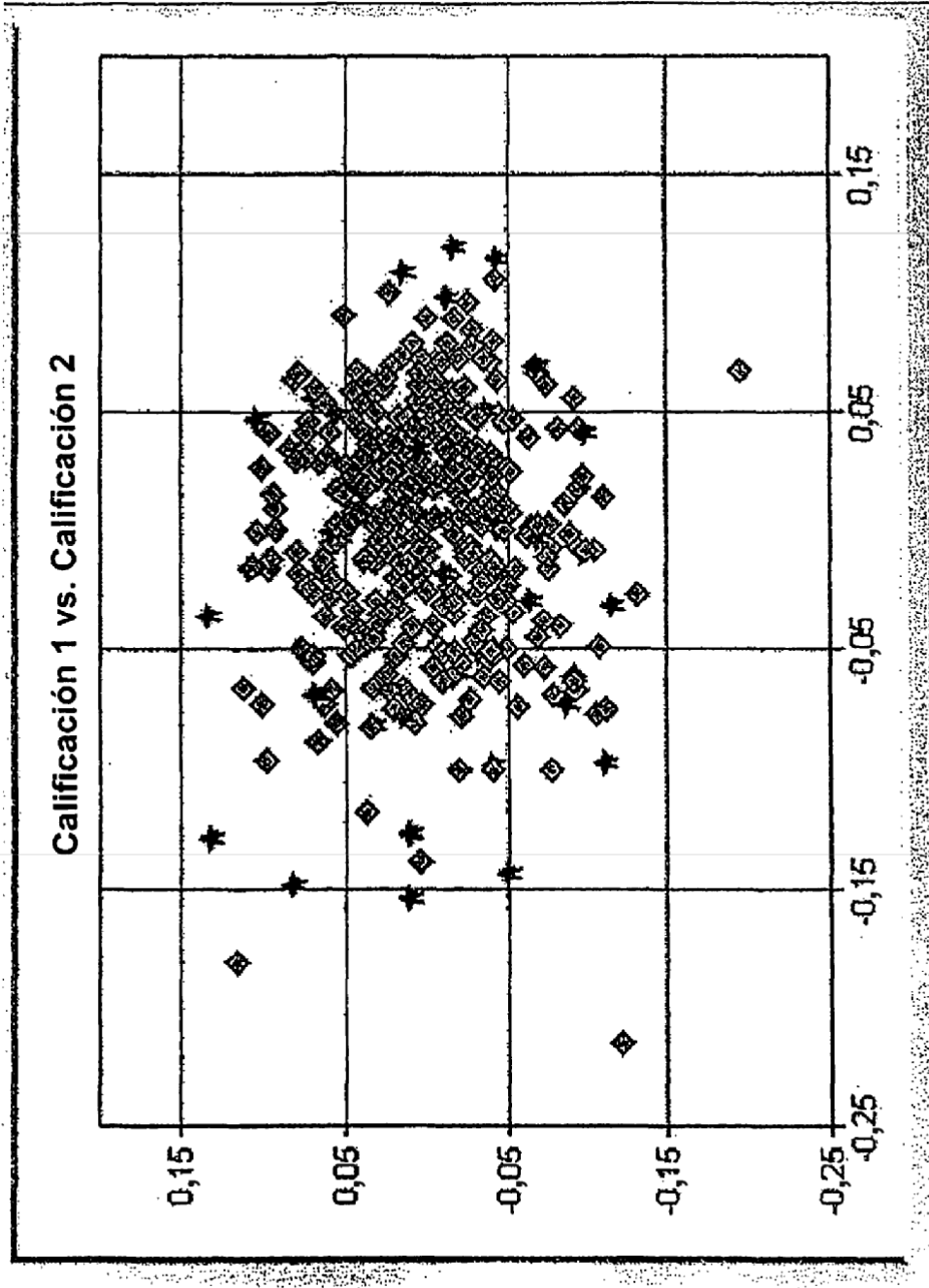


Figura 1



Nombre Constituyente: Proteína		Ecuación: PLS							
Dispersión: NSDV		Regresión: PLS Modificado							
Número de Términos 3									
Segmento 1 408-1092		Segmento 8							
Segmento2. 1108 - 2492		Segmento 8							
Coeficientes de carga									
Coeficientes de Concentración	PC1	PC2	PC3	Punto de Datos	Longitud de onda	Derivado	Segmento	Bloque	Polinomio
-0,9491	0298289	-0,2268181	0,4724126	5	408	1	4	4	1
-0,1527	2797483	-0,0474248	0,0300819	9	416	1	4	4	1
-1,2402	3189894	0,0633619	-0,1555211	13	424	1	4	4	1
0,0631	3086548	0,204904	-0,3018251	17	432	1	4	4	1
-0,4006	2525997	0,2886068	-0,4439142	21	440	1	4	4	1
-0,0416	1647938	0,3611889	-0,6910953	25	448	1	4	4	1
-0,0158	0657302	0,3839316	-0,6891987	29	456	1	4	4	1
-0,4483	0222351	0,4014674	-0,7127866	33	464	1	4	4	1
0,0923	0830106	0,4244998	-0,6678132	37	472	1	4	4	1
-0,1819	1161762	0,4379519	-0,6112673	41	480	1	4	4	1
-0,4734	0976522	0,417154	-0,5502027	45	488	1	4	4	1
0,0111	0166539	0,3671316	-0,4848528	49	496	1	4	4	1
0,4829	0886453	0,2821567	-0,3603398	53	504	1	4	4	1
0,5978	1669909	0,1389464	-0,2294177	57	512	1	4	4	1
-0,2536	1915192	0,0251486	-0,1357904	61	520	1	4	4	1
-1,2585	1719448	-0,0734455	-0,0957339	65	528	1	4	4	1
-1,5422	1461509	-0,1020104	-0,1032614	69	536	1	4	4	1
-1,9759	1323145	-0,0595756	-0,112226	73	544	1	4	4	1
-2,0429	0,12211	-0,0558964	-0,1007662	77	552	1	4	4	1
-2,2672	1260177	-0,1083809	-0,0776803	81	560	1	4	4	1
-1,921	1461328	-0,1610869	-0,0470461	85	568	1	4	4	1
-1,225	1548374	-0,2047525	0,0065508	89	576	1	4	4	1
-0,3841	1424392	-0,2450112	0,0609974	93	584	1	4	4	1
0,2356	1180658	-0,2716325	0,0991446	97	592	1	4	4	1
0,9637	0935725	-0,2699188	0,1154241	101	600	1	4	4	1
1,1831	0712909	-0,2194149	0,106214	105	608	1	4	4	1
1,3446	0487492	-0,1487638	0,0890747	109	616	1	4	4	1
1,2116	0140323	-0,138018	0,0867819	113	624	1	4	4	1
0,748	0461735	-0,2438653	0,0772413	117	632	1	4	4	1
0,7031	0981742	-0,4010255	0,0908111	121	640	1	4	4	1
0,4567	0652106	-0,438279	0,2008534	125	648	1	4	4	1
0,5702	0355418	-0,4113469	0,3015277	129	656	1	4	4	1
1,1499	0623678	-0,3144462	0,2200452	133	664	1	4	4	1
2,0011	028066	0,1142587	-0,0990084	137	672	1	4	4	1
1,6945	2236402	0,5643604	-0,2395304	141	680	1	4	4	1
0,0977	2666233	0,5750148	0,0618667	145	688	1	4	4	1
0,4581	1029303	0,3843774	0,366539	149	696	1	4	4	1
1,9146	049501	0,2833675	0,5019444	153	704	1	4	4	1
2,2326	039189	0,1555958	0,4694388	157	712	1	4	4	1
2,0982	085475	0,0683544	0,3513496	161	720	1	4	4	1
2,5034	067774	0,02683	0,2881375	165	728	1	4	4	1

FIGURA 2

ES 2 453 111 T3

2,8199	019523	0,0065758	0,2053909	169	736	1	4	4	1
2,6745	09427	-0,0059185	0,1405898	173	744	1	4	4	1
1,9878	0872397	-0,009921	0,092575	177	752	1	4	4	1
1,3739	0807018	-0,0052382	0,0677451	181	760	1	4	4	1
1,3333	0777523	-0,0010198	0,0512533	185	768	1	4	4	1
1,6606	0779681	-0,0021209	0,0318117	189	776	1	4	4	1
0,7324	0767962	-0,004291	0,0123137	193	784	1	4	4	1
0,1708	075528	-0,0057157	-0,0016204	197	792	1	4	4	1
0,1744	070726	-0,0065159	-0,0120794	201	800	1	4	4	1
-0,3166	0695227	-0,0068202	-0,0185115	205	808	1	4	4	1
-0,5496	066195	-0,0066382	-0,0226552	209	816	1	4	4	1
-0,8315	0611415	-0,006409	-0,0271551	213	824	1	4	4	1
-0,5432	0563414	-0,0057566	-0,0314391	217	832	1	4	4	1
-0,6775	0519972	-0,0064194	-0,0347483	221	840	1	4	4	1
-0,8205	0487205	-0,0071523	-0,0381124	225	848	1	4	4	1
-0,9192	0467818	-0,0083626	-0,0410311	229	856	1	4	4	1
-0,9728	0443748	-0,0104905	-0,0422615	233	864	1	4	4	1
-1,1779	0438229	-0,0129833	-0,0438376	237	872	1	4	4	1
-1,2342	044959	-0,015538	-0,0442278	241	880	1	4	4	1
-1,1637	0458128	-0,0184223	-0,0447334	245	888	1	4	4	1
-1,1558	0448685	-0,0208269	-0,0455889	249	896	1	4	4	1
-1,2248	0411451	-0,0191387	-0,0488943	253	904	1	4	4	1
-1,4622	0316038	-0,0126967	-0,0541816	257	912	1	4	4	1
-1,7447	0203553	-0,0040468	-0,0506027	261	920	1	4	4	1
-1,7221	014654	0,0018769	-0,0634784	265	928	1	4	4	1
-1,5183	0138818	0,0027397	-0,0636183	269	936	1	4	4	1
-1,4113	0183508	-0,0003699	-0,0607394	273	944	1	4	4	1
-1,2008	0297463	-0,005896	-0,0565986	277	952	1	4	4	1
-0,7625	0452878	-0,0196933	-0,048561	281	960	1	4	4	1
-0,4977	059251	-0,0434015	-0,036861	285	968	1	4	4	1
-0,5079	0514129	-0,0489869	-0,033235	289	976	1	4	4	1
-0,9927	0177175	-0,0195416	-0,0455457	293	984	1	4	4	1
-1,3616	0057094	-0,0055916	-0,0559383	297	992	1	4	4	1
-1,5325	0198612	-0,0027406	-0,0623553	301	1000	1	4	4	1
-1,5479	0313788	0,0051454	-0,0685467	305	1008	1	4	4	1
-1,6904	0395028	0,0124443	-0,0753072	309	1016	1	4	4	1
-1,6812	045687	0,0172638	-0,0784585	313	1024	1	4	4	1
-1,5483	0491985	0,0199021	-0,0798416	317	1032	1	4	4	1
-1,4066	0499585	0,021406	-0,080727	321	1040	1	4	4	1
-1,3251	0503685	0,0227752	-0,0807964	325	1048	1	4	4	1
-1,2936	0522987	0,0234987	-0,0806451	329	1056	1	4	4	1
-1,3316	0556884	0,0239591	-0,0807981	333	1064	1	4	4	1
-1,2151	0586985	0,0237557	-0,080083	337	1072	1	4	4	1
-1,0836	0606114	0,0251248	-0,0805719	341	1080	1	4	4	1
-0,9038	061297	0,027247	-0,0814273	345	1088	1	4	4	1
-1,2982	0625755	0,0074961	-0,040613	355	1108	1	4	4	1
-0,1505	0981438	0,0392831	-0,0726907	359	1116	1	4	4	1
0,9801	1268927	0,0620493	-0,0889237	363	1124	1	4	4	1
1,63	132253	0,055532	-0,0713364	367	1132	1	4	4	1
1,4198	1264827	0,037009	-0,04339	371	1140	1	4	4	1
1,4866	1415472	0,0386029	-0,0341621	375	1148	1	4	4	1

FIGURA 2 - Cont.

1,492	1399466	0,0159145	-0,0152278	379	1156	1	4	4	1
0,8254	1130491	-0,0240164	0,0107612	383	1164	1	4	4	1
0,2563	0968584	-0,051528	0,0215443	387	1172	1	4	4	1
0,6434	0934167	-0,0476326	-0,0003821	391	1180	1	4	4	1
0,9558	0866028	-0,0261261	-0,0229418	395	1188	1	4	4	1
0,7258	0614387	0,0168786	-0,0332744	399	1196	1	4	4	1
0,3704	042349	0,0582286	-0,0565424	403	1204	1	4	4	1
0,1601	0342253	0,0770434	-0,060578	407	1212	1	4	4	1
0,2821	0253471	0,0574134	-0,0351952	411	1220	1	4	4	1
0,1089	0130307	0,0230549	-0,0081342	415	1228	1	4	4	1
-0,795	0069837	-0,010187	0,0119636	419	1236	1	4	4	1
-0,4807	0081111	-0,0217149	0,0212737	423	1244	1	4	4	1
-0,3524	0105809	-0,0168778	0,0199868	427	1252	1	4	4	1
-0,1328	0127645	-0,0065866	0,0111371	431	1260	1	4	4	1
0,1625	0087889	0,0014911	0,0062863	435	1268	1	4	4	1
0,0851	002427	0,0003595	0,0108478	439	1276	1	4	4	1
-0,1717	0068893	0,0044472	0,0103912	443	1284	1	4	4	1
0,1173	0003891	0,0168233	0,0030043	447	1292	1	4	4	1
0,4544	0126303	0,033023	-0,0079831	451	1300	1	4	4	1
1,1751	0273852	0,0490611	-0,0178994	455	1308	1	4	4	1
1,0343	0454174	0,0705813	-0,0285391	459	1316	1	4	4	1
1,336	0893379	0,0980824	-0,0434089	463	1324	1	4	4	1
1,7192	092789	0,1289065	-0,0639615	467	1332	1	4	4	1
1,6788	1228603	0,1438925	-0,0792502	471	1340	1	4	4	1
1,3828	1188148	0,1172261	-0,0658707	475	1348	1	4	4	1
1,3142	086384	0,1042059	-0,0543224	479	1356	1	4	4	1
1,3214	0547843	0,0780036	-0,0257346	483	1364	1	4	4	1
0,3426	0034114	0,0529143	0,0010614	487	1372	1	4	4	1
0,6435	0181797	0,1354519	-0,0380578	491	1380	1	4	4	1
0,1483	0023443	0,2333444	-0,079905	495	1388	1	4	4	1
0,545	0299861	0,2717732	-0,0836878	499	1396	1	4	4	1
1,3428	0768361	0,1878083	-0,0429562	503	1404	1	4	4	1
1,2669	1392033	-0,0182201	0,0319516	507	1412	1	4	4	1
0,2043	1844038	-0,244083	0,1117934	511	1420	1	4	4	1
-0,3473	2011124	-0,3837384	0,1730638	515	1428	1	4	4	1
-0,7019	0791705	-0,2212603	0,1318247	519	1436	1	4	4	1
-0,306	0146456	-0,0539326	0,0701138	523	1444	1	4	4	1
-0,3225	0077498	-0,0585162	0,0489745	527	1452	1	4	4	1
-0,6526	009078	-0,0443871	0,029443	531	1460	1	4	4	1
-0,1816	0124514	-0,0334645	0,0170485	535	1468	1	4	4	1
-0,2002	0161213	-0,0292145	0,0083452	539	1476	1	4	4	1
-0,749	0185381	-0,0224174	0,0017061	543	1484	1	4	4	1
-0,8945	0174908	-0,0190351	0,0016491	547	1492	1	4	4	1
-0,8393	0137431	-0,0284181	0,0138157	551	1500	1	4	4	1
-0,3829	0080367	-0,0515578	0,0328584	555	1508	1	4	4	1
0,1601	001741	-0,0633391	0,0425248	559	1516	1	4	4	1
0,0424	0005201	-0,0531697	0,0375337	563	1524	1	4	4	1
0,3253	0026616	-0,0401694	0,0308803	567	1532	1	4	4	1
0,3143	0105201	-0,0489114	0,0357112	571	1540	1	4	4	1
0,0588	0168383	-0,0685377	0,0459402	575	1548	1	4	4	1
-0,2271	0141516	-0,0766551	0,0462445	579	1556	1	4	4	1

FIGURA 2 - Cont.

ES 2 453 111 T3

-0,2747	0036056	-0,0550918	0,0293165	583	1564	1	4	4	1
-0,2209	0088931	-0,0192458	0,006623	587	1572	1	4	4	1
-0,5235	0185892	0,0024981	-0,0058384	591	1580	1	4	4	1
-0,6894	0257218	0,0033233	0,0007962	595	1588	1	4	4	1
-0,9907	0325489	0,005091	0,0075638	599	1596	1	4	4	1
-1,4623	0358991	0,0134806	0,0062863	603	1604	1	4	4	1
-1,1108	0366747	0,0267156	-0,0059277	607	1612	1	4	4	1
-1,1478	0346921	0,0463785	-0,0263763	611	1620	1	4	4	1
-1,0832	0245849	0,0706615	-0,0537231	615	1628	1	4	4	1
-0,982	0085592	0,0960436	-0,0913609	619	1636	1	4	4	1
-0,7235	0038849	0,1390248	-0,1341754	623	1644	1	4	4	1
-0,2835	007225	0,1906535	-0,1840824	627	1652	1	4	4	1
0,3436	0096046	0,1945012	-0,1498101	631	1660	1	4	4	1
0,3529	0399073	0,0992329	-0,0437883	635	1668	1	4	4	1
-0,8184	0435475	-0,0940839	0,0760264	639	1676	1	4	4	1
-1,061	0865911	-0,1918068	0,1018738	643	1684	1	4	4	1
-0,0178	0745507	-0,1075903	0,0542916	647	1692	1	4	4	1
-0,1962	0588652	-0,0486746	0,0381079	651	1700	1	4	4	1
-0,878	0359296	0,0326932	-0,0085001	655	1708	1	4	4	1
-1,8143	0445135	-0,0015829	-0,0342265	659	1716	1	4	4	1
-1,7684	0869317	-0,0932002	0,0278987	663	1724	1	4	4	1
0,6249	0002187	-0,0692027	0,1025195	667	1732	1	4	4	1
1,8449	021823	-0,0097241	0,0768349	671	1740	1	4	4	1
1,1003	0091217	0,0330577	0,0130689	675	1748	1	4	4	1
0,4758	0183744	0,0637341	-0,0379127	679	1756	1	4	4	1
1,4846	007979	0,0812069	-0,0275499	683	1764	1	4	4	1
1,3403	0161786	0,0748846	-0,0284033	687	1772	1	4	4	1
0,331	006392	0,0816648	-0,0607618	691	1780	1	4	4	1
-0,2963	0165192	0,084768	-0,0687285	695	1788	1	4	4	1
-0,3476	0269646	0,0891819	-0,0572376	699	1796	1	4	4	1
0,0248	0226229	0,0882287	-0,0488809	703	1804	1	4	4	1
-0,0892	0140487	0,0803895	-0,0304747	707	1812	1	4	4	1
-0,1821	012267	0,0552065	-0,0250661	711	1820	1	4	4	1
-0,0406	0214814	0,0652396	-0,0241926	715	1828	1	4	4	1
0,137	0216104	0,0594556	-0,0167628	719	1836	1	4	4	1
-0,8244	0171192	0,0633336	-0,0103936	723	1844	1	4	4	1
0,1904	0241178	0,0767511	-0,0073243	727	1852	1	4	4	1
0,7272	0480685	0,0964676	0,003384	731	1860	1	4	4	1
0,5274	0952503	0,1655956	-0,0082466	735	1868	1	4	4	1
0,7945	1627059	0,2836901	-0,0720872	739	1876	1	4	4	1
-0,8043	255067	0,4373213	-0,1750227	743	1884	1	4	4	1
-1,8354	2936671	0,5286364	-0,2287892	747	1892	1	4	4	1
0,7469	2341329	0,3477146	-0,0877712	751	1900	1	4	4	1
0,2449	1489632	-0,033803	0,1290147	755	1908	1	4	4	1
-0,5388	0749652	-0,3197428	0,2581663	759	1916	1	4	4	1
-0,8418	017671	-0,4208475	0,2800128	763	1924	1	4	4	1
-1,1277	0222391	-0,3878704	0,2030359	767	1932	1	4	4	1
-1,1856	0422177	-0,2480358	0,1083611	771	1940	1	4	4	1
-0,7399	0462454	-0,1413512	0,0579245	775	1948	1	4	4	1
-0,1724	0437807	-0,0731532	0,0423812	779	1956	1	4	4	1
0,245	0387386	-0,0434038	0,0426443	783	1964	1	4	4	1

FIGURA 2 - Cont.

ES 2 453 111 T3

0,5111	0408553	-0,0397072	0,0336391	787	1972	1	4	4	1
0,1528	0538403	-0,051742	0,0101872	791	1980	1	4	4	1
-0,1085	075701	-0,0816762	-0,0088214	795	1988	1	4	4	1
-0,0353	1095578	-0,1463078	-0,0027388	799	1996	1	4	4	1
0,2241	1662687	-0,2376028	0,0223869	803	2004	1	4	4	1
0,4098	1599784	-0,2389191	0,024658	807	2012	1	4	4	1
0,6149	1685745	-0,2672103	0,0290887	811	2020	1	4	4	1
-0,0612	185789	-0,3372449	0,0481759	815	2028	1	4	4	1
-0,5676	1823562	-0,3832788	0,066848	819	2036	1	4	4	1
-0,0587	1632611	-0,3737507	0,0726149	823	2044	1	4	4	1
-0,48	1312414	-0,2768166	0,0682096	827	2052	1	4	4	1
-0,135	1344321	-0,2128445	0,0645757	831	2060	1	4	4	1
1,5287	117833	-0,1622568	0,0583514	835	2068	1	4	4	1
0,5959	0489719	-0,0820892	0,0568112	839	2076	1	4	4	1
1,0318	000299	-0,0139699	0,0447392	843	2084	1	4	4	1
0,25	0243898	0,0390305	0,0126787	847	2092	1	4	4	1
0,0445	0594492	0,1154319	-0,0263021	851	2100	1	4	4	1
-0,0593	0617888	0,1314909	-0,0396635	855	2108	1	4	4	1
-0,8562	0347472	0,1060563	-0,0475418	859	2116	1	4	4	1
-0,8562	0270219	0,1117846	-0,0668531	863	2124	1	4	4	1
-0,1393	050247	0,1188499	-0,0702093	867	2132	1	4	4	1
-1,3975	0645408	0,077724	-0,0531877	871	2140	1	4	4	1
-1,1432	0897033	0,0741271	-0,0521471	875	2148	1	4	4	1
-0,2733	0838305	0,1118103	-0,0598748	879	2156	1	4	4	1
-0,2517	0756611	0,1263029	-0,0507805	883	2164	1	4	4	1
0,2724	042196	0,1376596	-0,051825	887	2172	1	4	4	1
0,9113	0017157	0,1254588	-0,0595678	891	2180	1	4	4	1
0,8766	0051536	0,1462821	-0,0666593	895	2188	1	4	4	1
3,1112	0140879	0,1752303	-0,0671997	899	2196	1	4	4	1
2,8735	0012583	0,166346	-0,078699	903	2204	1	4	4	1
1,2158	0242778	0,1713437	-0,1187224	907	2212	1	4	4	1
0,7702	0494174	0,2165613	-0,1833169	911	2220	1	4	4	1
1,8376	0720025	0,2613153	-0,2372307	915	2228	1	4	4	1
0,4587	0915389	0,1761955	-0,2049805	919	2236	1	4	4	1
-0,3705	0859843	-0,0258055	-0,0785582	923	2244	1	4	4	1
-1,5174	0042859	-0,1448509	-0,0013478	927	2252	1	4	4	1
-0,5258	0747545	-0,2715632	0,0754112	931	2260	1	4	4	1
0,2839	0785018	-0,3944573	0,2136819	935	2268	1	4	4	1
-0,4514	009844	-0,3503446	0,3234998	939	2276	1	4	4	1
0,4945	1598304	-0,0827608	0,2089848	943	2284	1	4	4	1
-1,49	2231499	0,1665051	0,0066736	947	2292	1	4	4	1
-2,2608	2012532	0,0140123	-0,0982895	951	2300	1	4	4	1
-1,4086	0702564	-0,0585169	-0,124995	955	2308	1	4	4	1
3,4879	1771957	0,1381918	0,0153921	959	2316	1	4	4	1
2,8298	0881344	0,2182197	-0,0723481	963	2324	1	4	4	1
0,0521	0278635	0,1384929	-0,1379226	967	2332	1	4	4	1
-0,5042	0890663	0,0448882	-0,0754787	971	2340	1	4	4	1
-1,9967	0893057	0,0956985	-0,0843435	975	2348	1	4	4	1
1,633	0677622	0,1103047	0,0127988	979	2356	1	4	4	1
0,9262	0302188	0,0070979	0,0055675	983	2364	1	4	4	1
-0,8083	0071355	0,0245187	-0,0367879	987	2372	1	4	4	1

FIGURA 2 - Cont.

ES 2 453 111 T3

-1,2252	0163733	-0,0097774	-0,0317304	991	2380	1	4	4	1
0,07	0114154	-0,0809886	0,0729404	995	2388	1	4	4	1
-0,918	0019331	-0,1697068	0,1723908	999	2396	1	4	4	1
-0,2346	0291271	-0,2178754	0,1755645	1003	2404	1	4	4	1
-0,1923	0634367	-0,2323132	0,1389374	1007	2412	1	4	4	1
1,7413	0222494	-0,1123926	0,0814187	1011	2420	1	4	4	1
-0,1827	0199519	-0,0550661	0,0539011	1015	2428	1	4	4	1
-1,5177	0507124	-0,0448004	0,0500707	1019	2436	1	4	4	1
-0,2804	0234917	-0,0477237	0,057649	1023	2444	1	4	4	1
-3,0762	0091297	-0,0619199	0,0290244	1027	2452	1	4	4	1
-0,0636	0004693	-0,0580129	0,0087214	1031	2460	1	4	4	1
-0,6692	0034797	-0,0730783	0,0204012	1035	2468	1	4	4	1
-0,6659	007201	-0,0719952	0,0121356	1039	2476	1	4	4	1
-1,3137	0078079	0,0006311	-0,027481	1043	2484	1	4	4	1

FIGURA 2 - Cont.

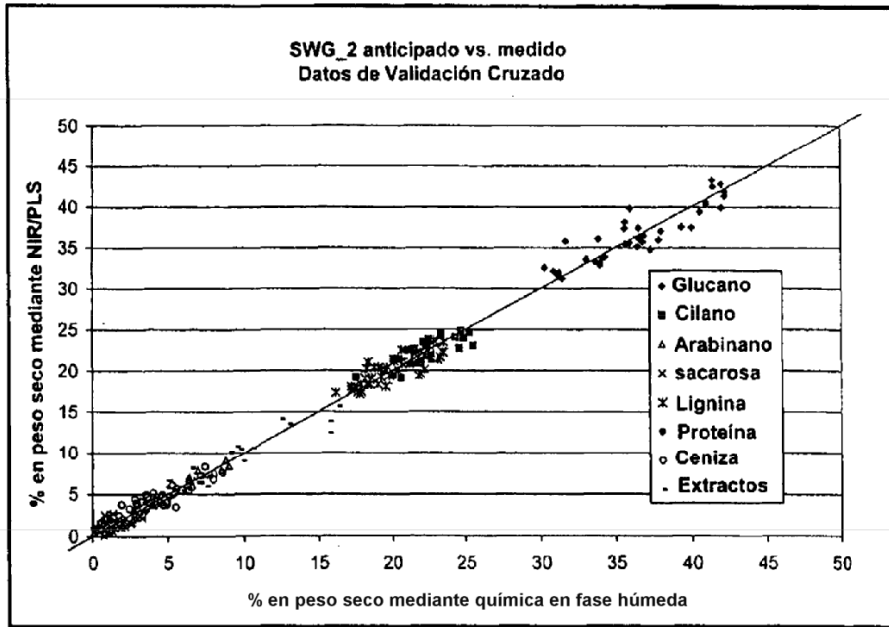


Figura 3

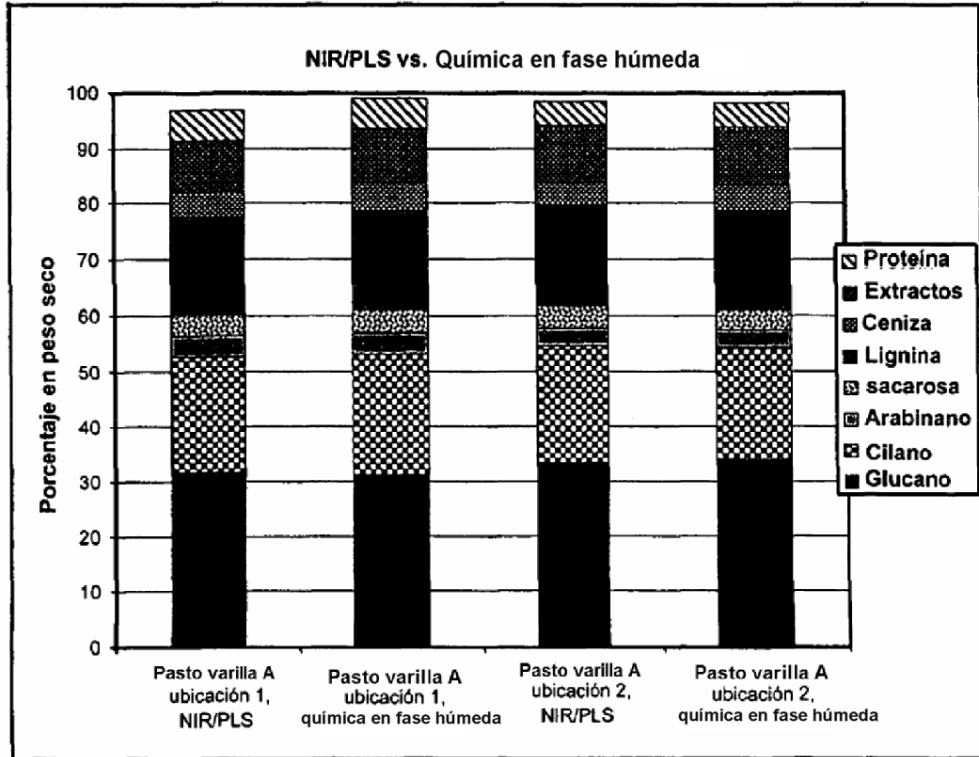


Figura 4



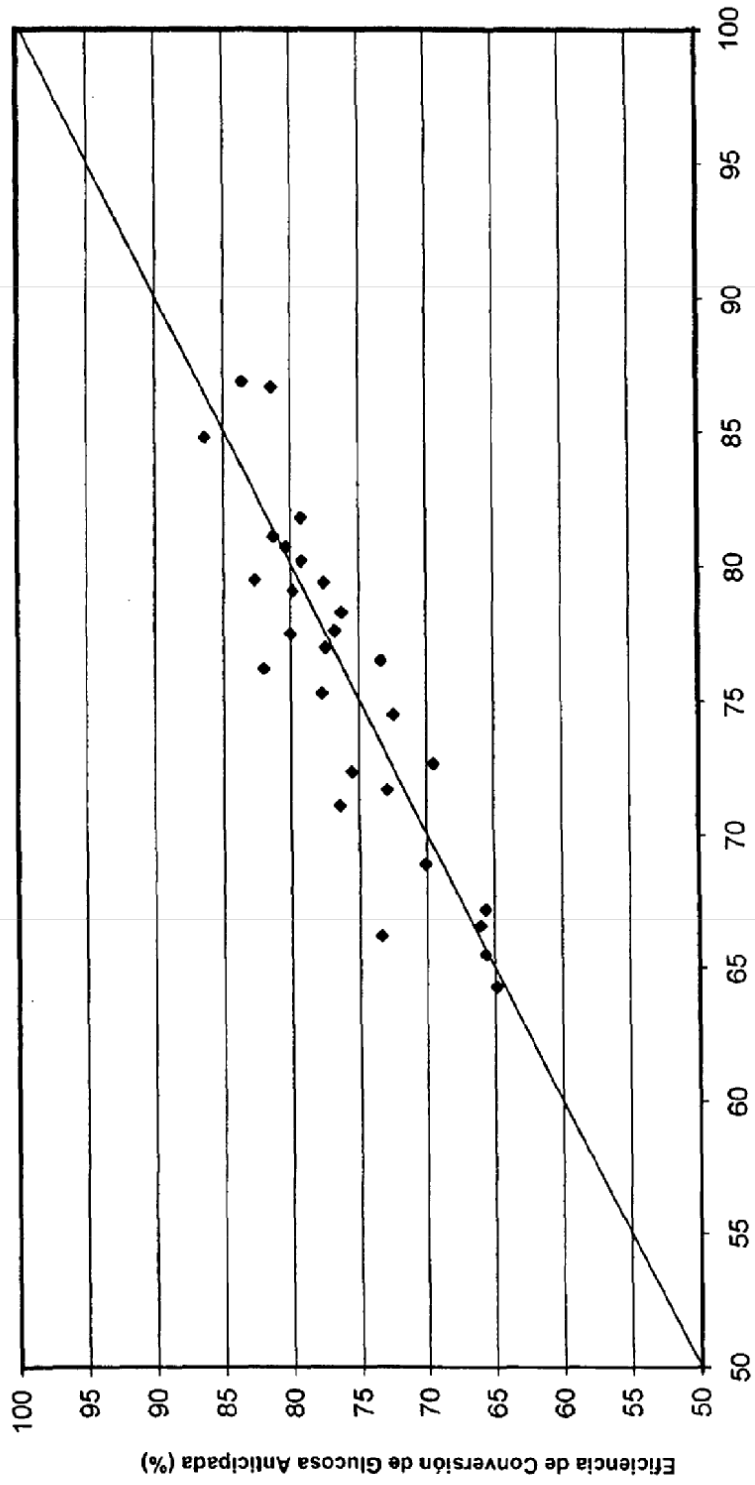


Figura 5

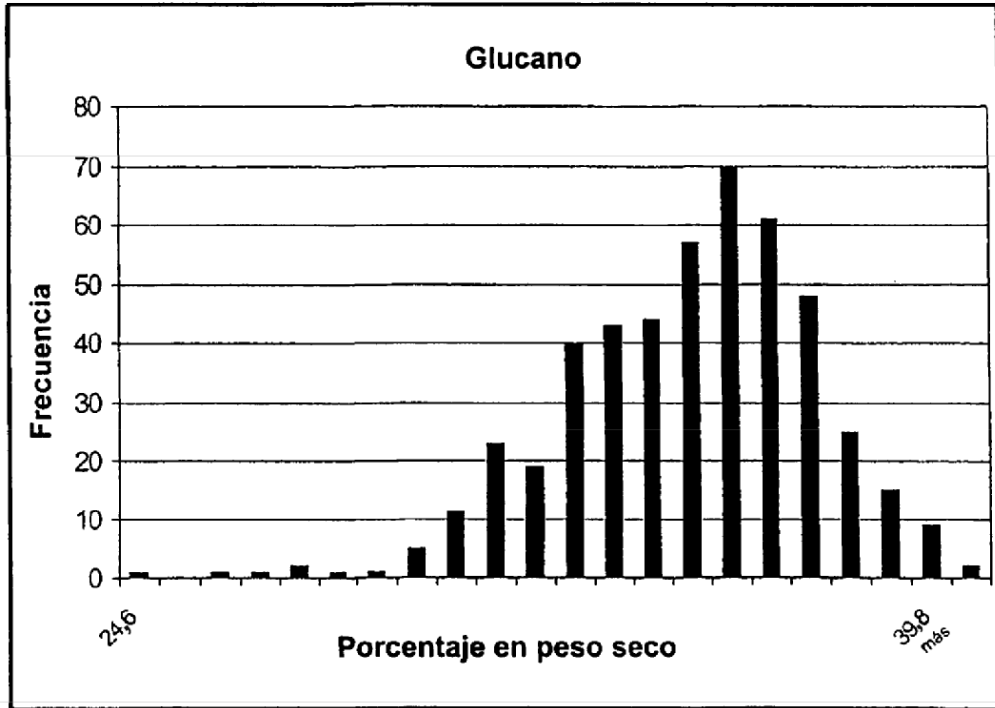


Figura 6

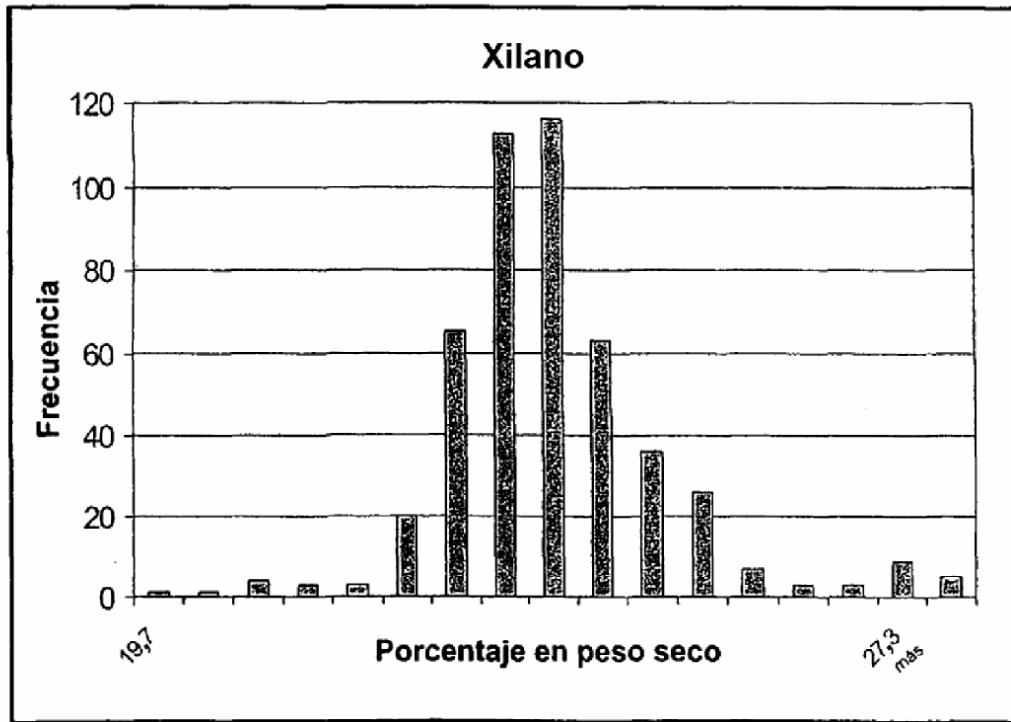


Figura 7

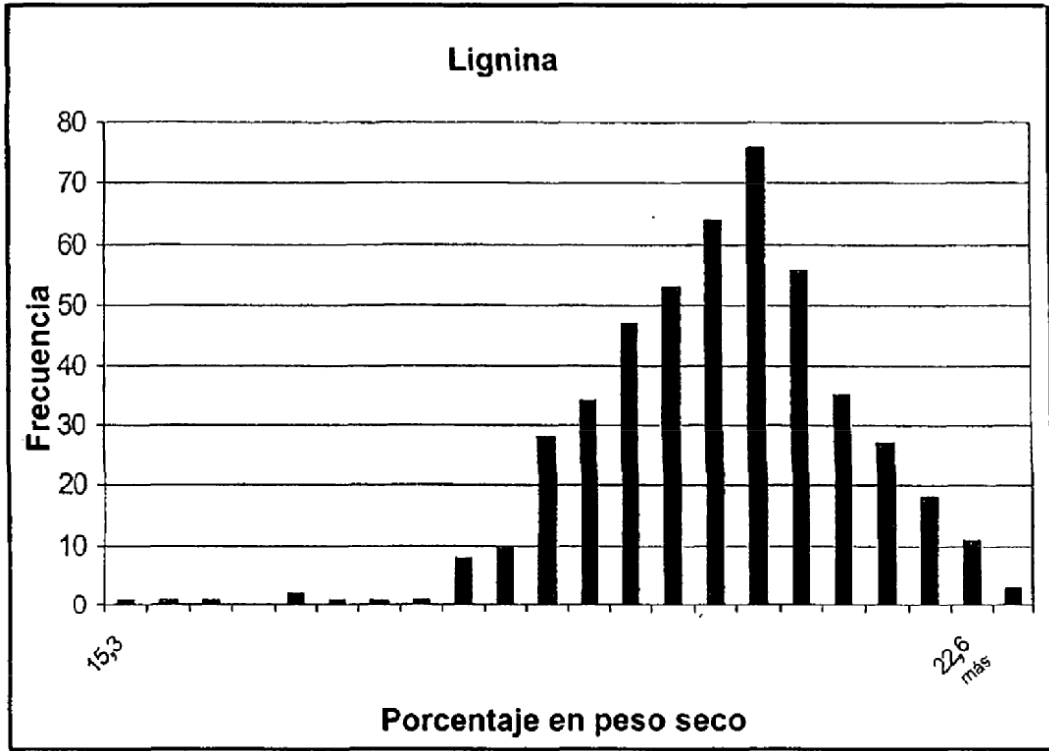


Figura 8

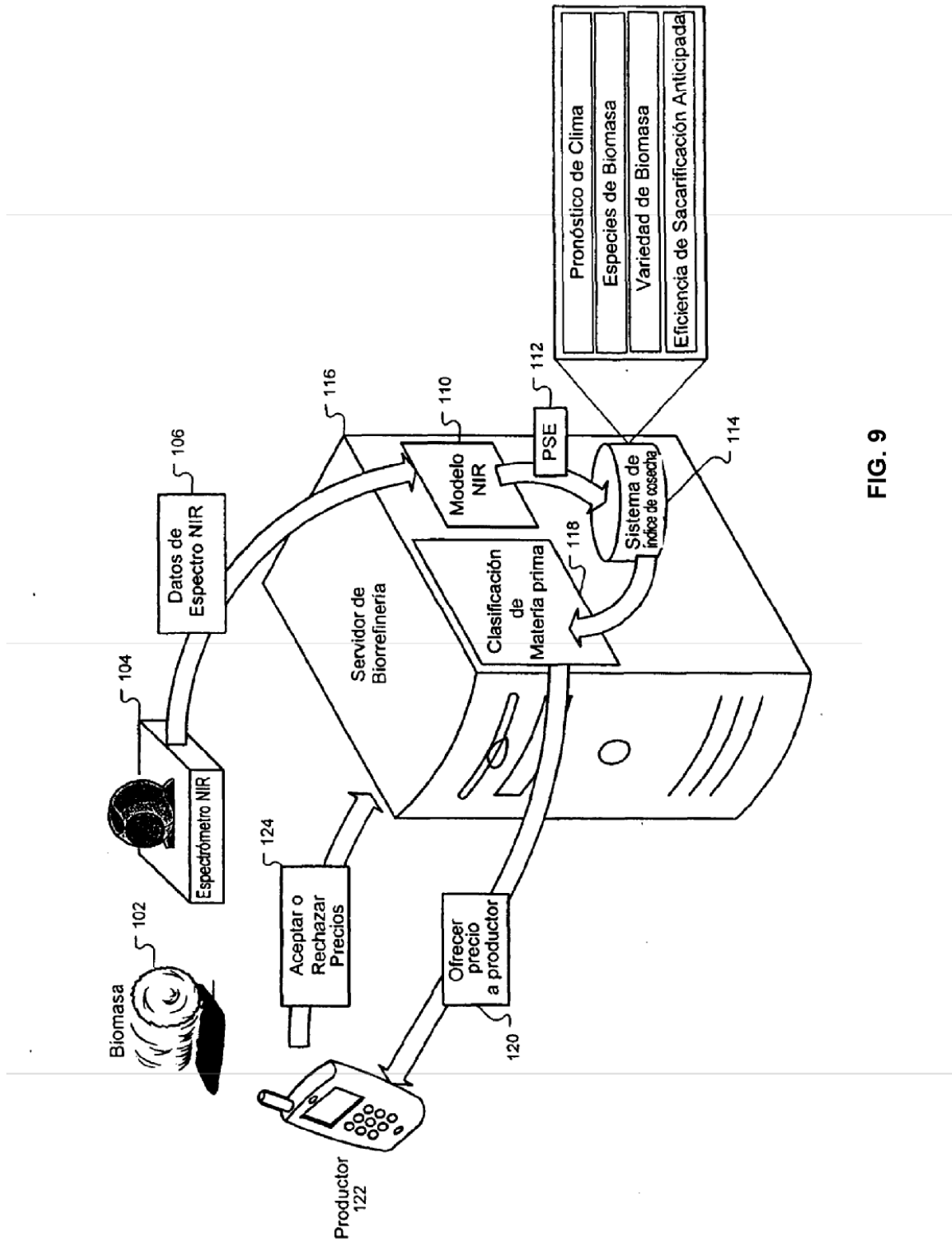


FIG. 9

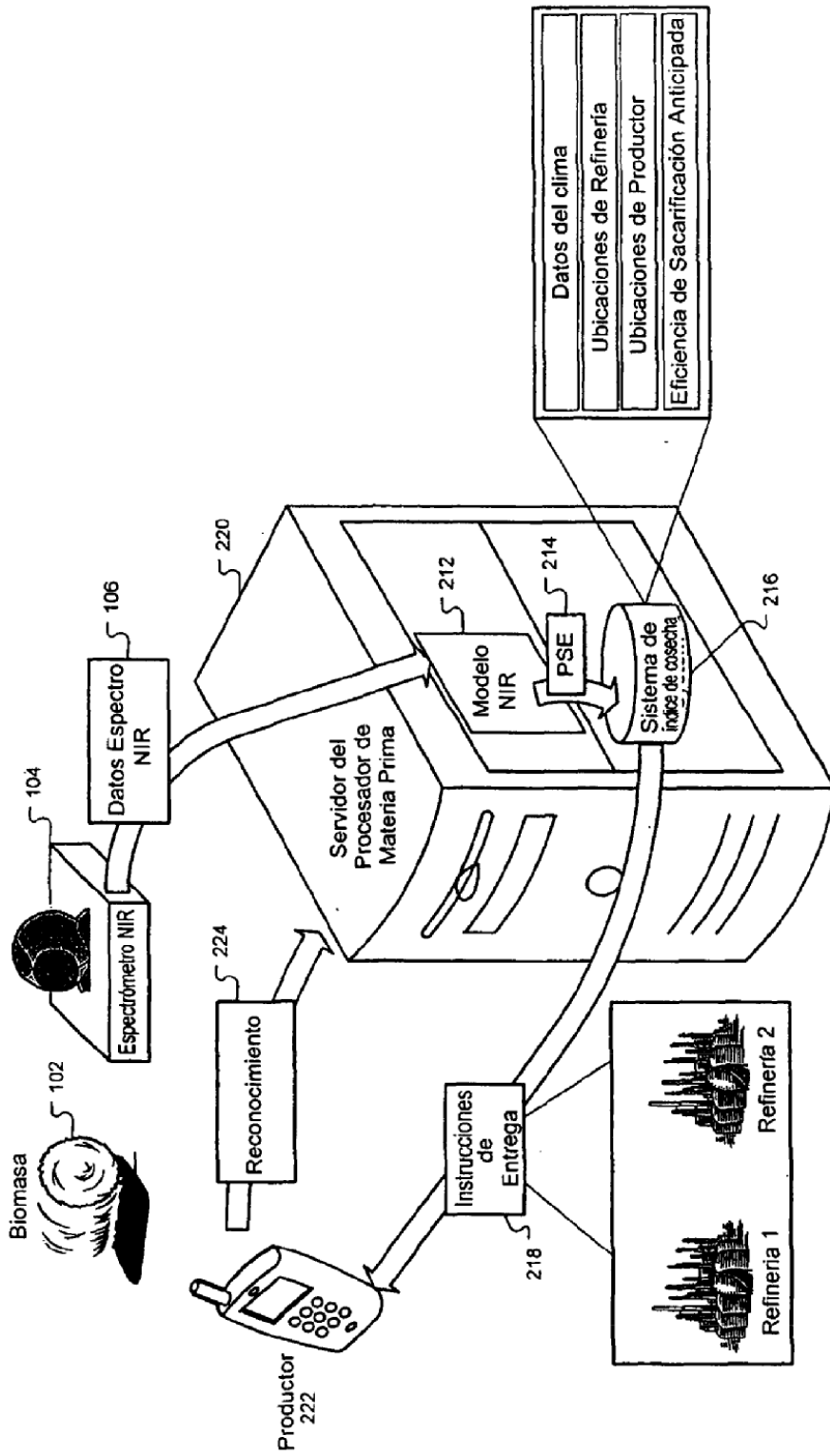


FIG. 10

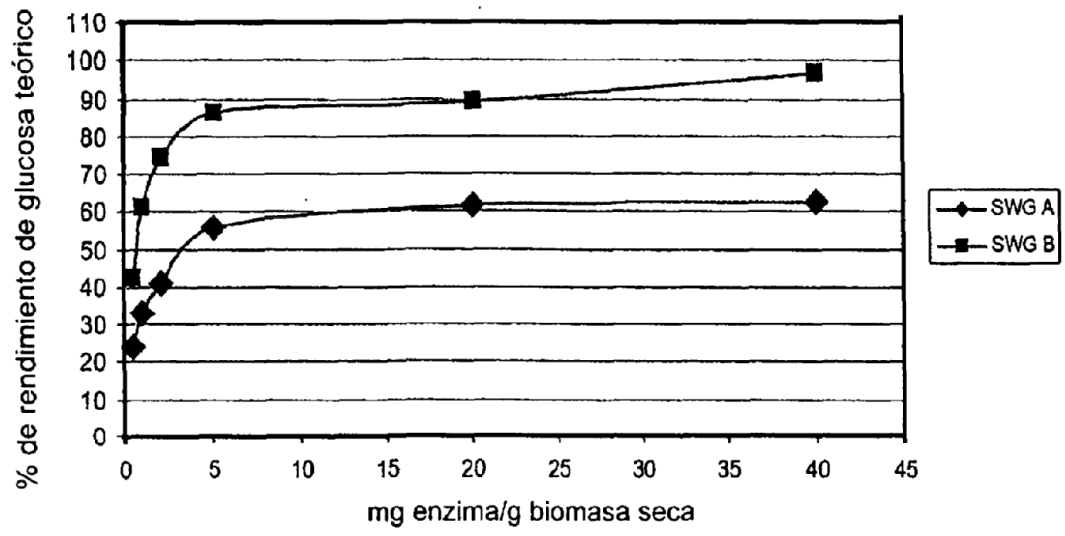


Figura 11

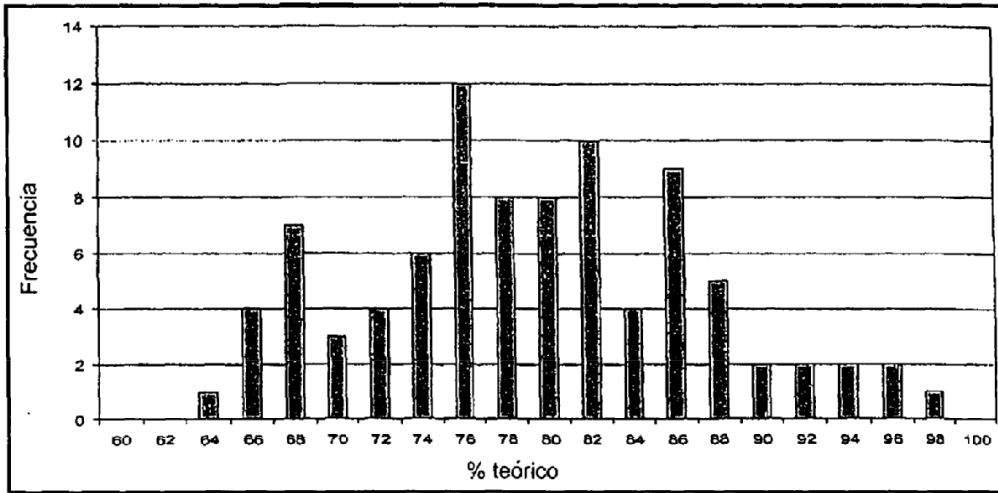


Figura 12



— Pendiente de correlación "esperado" 1:1

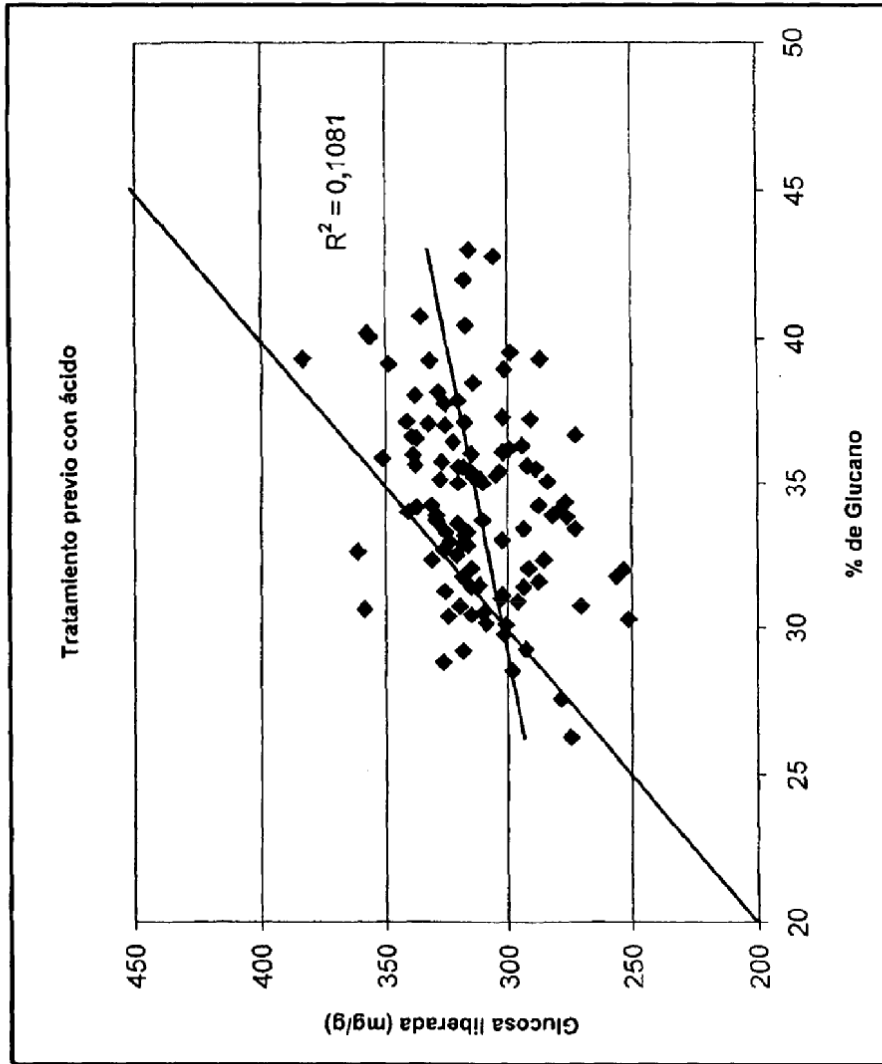


Figura 13

— Pendiente de correlación "esperado" 1:1

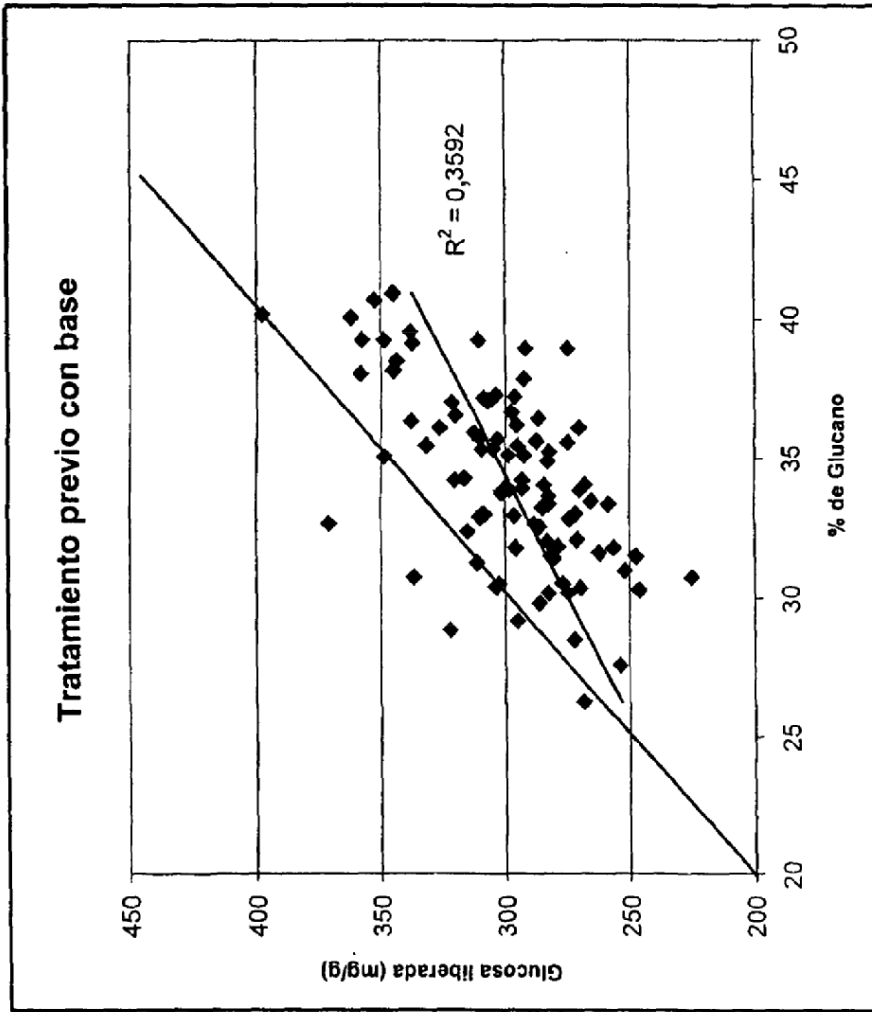


Figura 14