

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 487 511**

51 Int. Cl.:

D21C 3/02 (2006.01)

C12P 19/02 (2006.01)

C13K 1/02 (2006.01)

C12P 7/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2008 E 08836116 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 2179085**

54 Título: **Mejora de tratamiento previo de la biomasa**

30 Prioridad:

22.08.2007 US 843157

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

21.08.2014

73 Titular/es:

**E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
(50.0%)
1007 Market Street
Wilmington, DE 19898, US y
ALLIANCE FOR SUSTAINABLE ENERGY, LLC
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**HENNESSEY, SUSAN MARIE;
FRIEND, JULIE;
ELANDER, RICHARD T. y
TUCKER III, MELVIN P.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 487 511 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

Mejora de tratamiento previo de la biomasa

Campo de la invención

5 Se proporciona un método para producir un producto de biomasa pretratada mejorado para su uso en la sacarificación para producir un hidrolizado de alto contenido de azúcar. En forma específica, el producto de biomasa pretratada derivada del uso del presente método tiene un menor número de inhibidores de sacarificación y/o fermentación.

Antecedentes

10 Las materias primas y residuos celulósicos y lignocelulósicos, tales como los residuos agrícolas, madera, residuos forestales, los lodos procedentes de la fabricación de papel y los residuos sólidos urbanos e industriales, proporcionan una gran materia prima potencialmente renovable para la producción de productos de valor, tales como los combustibles y otros productos químicos. Las materias primas y residuos celulósicos y lignocelulósicos, compuestos por polímeros de hidratos de carbono que comprenden celulosa, hemicelulosa, y lignina glucanos por lo general se tratan por medio de una variedad de medios químicos, mecánicos y enzimáticos para liberar
15 principalmente hexosa y pentosa, que luego se puede fermentar en productos útiles.

En primer lugar, las materias primas de biomasa se tratan para hacer que los polímeros de hidratos de carbono de los materiales celulósicos y lignocelulósicos estén disponibles con mayor facilidad para las enzimas de sacarificación, que normalmente se denomina tratamiento previo. La biomasa pretratada se hidroliza en forma
20 adicional en la presencia de enzimas de sacarificación para liberar oligosacáridos y/o monosacáridos en un hidrolizado. Las enzimas de sacarificación utilizadas para producir azúcares fermentables a partir de una biomasa pretratada incluyen en forma típica una o más glicosidasas, tales como glicosidasas de celulosa de hidrolización, glicosidasas de hemicelulosa de hidrolización, y glicosidasas de almidón de hidrolización, así como peptidasas, lipasas, ligninasas y/o feruloil esterases. Las enzimas de sacarificación y los métodos para el tratamiento de biomasa se revisan en Lynd, LR, et al. (Microbiol. Mol. Biol. Rev. (2002) 66:506 a 577).

25 Durante el tratamiento de la biomasa, se pueden liberar diferentes componentes de la celulosa, la hemicelulosa y la lignina que pueden incluir azúcares y/o subproductos, que incluyen compuestos tales como ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, furaldehídos y compuestos fenólicos. Algunos de los subproductos son inhibidores en cuanto a que afectan las actividades de las enzimas de sacarificación y/o el crecimiento y el metabolismo de los microorganismos utilizados en la fermentación posterior. Estos inhibidores pueden reducir la eficiencia de los
30 procesos de sacarificación y/o fermentación. Se han hecho algunos intentos para eliminar dichos inhibidores con pasos adicionales, tales como la recolección de azúcares, lo que de ese modo crea un prehidrolizado. Estas medidas no son satisfactorias dado que no son económicas y dan como resultado una producción reducida de azúcares.

35 Por lo tanto, existe una necesidad de un método de tratamiento previo que produce una biomasa pretratada que tiene una máxima retención de azúcares y una mínima presencia de inhibidores, sin formar una corriente de azúcar de tratamiento previo separada (prehidrolizado). Esto proporcionaría una biomasa de entrada más económica y efectiva para su uso en la sacarificación seguida por la fermentación para producir productos útiles.

Kurakake et al., en Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 90, núm. 3, páginas 251 a 259 (2001), describen el tratamiento previo de una cáscara de maíz, bagazo de caña y pasto varilla con agua amoniacal.

40 Compendio de la invención

La presente invención proporciona un método para la preparación de un producto de biomasa pretratada mejorado de acuerdo con la reivindicación 1.

En otros aspectos, el método además comprende la adición de un componente acuoso adicional en una o más de las siguientes maneras:

- 45 i) antes del paso (b)
ii) como un componente adicional en el paso (b); o
iii) después del paso (b) como un paso de lavado.

Además, el producto de sólidos de biomasa pretratada se puede sacarificar para formar un hidrolizado de azúcares que después se pueden fermentar para producir un producto químico blanco.

50 La biomasa se refiere a cualquier material celulósico o lignocelulósico, por ejemplo, los cultivos bioenergéticos, residuos agrícolas, residuos sólidos urbanos, residuos sólidos industriales, desechos de jardín, madera, residuos forestales y las combinaciones de los mismos. La solución acuosa que comprende amoníaco se puede derivar a

partir de gas de amoníaco, hidróxido de amonio, urea, y las combinaciones de los mismos. La solución acuosa que comprende amoníaco puede comprender por lo menos una base adicional. Además, en el presente método, se puede aplicar vacío a la biomasa antes de poner en contacto la biomasa con una solución acuosa que comprende amoníaco. El amoníaco también se puede retirar antes del paso (c); el amoníaco se puede reciclar de nuevo al reactor de tratamiento previo. El amoníaco y la biomasa se hacen reaccionar en el presente método a una temperatura que está entre aproximadamente 4 °C y aproximadamente 200 °C. En el presente método se pueden utilizar un plastificante, un agente de ablandamiento o una combinación de los mismos. Además, la energía se puede aplicar a la biomasa antes de, durante, o después del paso (a) con el fin de reducir el tamaño, incrementar el área de superficie expuesta, y/o aumentar la accesibilidad al amoníaco acuoso o a las enzimas de sacarificación.

10 Descripción detallada de la invención

Cuando se presenta una cantidad, concentración, u otro valor o parámetro como cualquiera de un intervalo, un intervalo preferido o una lista de valores superiores preferibles y valores inferiores preferibles, esto se debe comprender como la descripción en forma específica de todos los intervalos formados desde cualquier par de cualquier límite de intervalo superior o valor preferido y cualquier límite de intervalo inferior o valor preferido, sin importar si los intervalos se describen por separado. Cuando se recita un intervalo de valores numéricos en la presente memoria, a menos que se indique lo contrario, el intervalo pretende incluir los puntos finales de los mismos, y todos los números enteros y fracciones dentro del intervalo. No se pretende que el alcance de la invención se limite a los valores específicos citados cuando se define un intervalo.

La presente invención proporciona un método para el tratamiento previo de la biomasa que reduce la cantidad de inhibidores en un producto de biomasa pretratada. Debido a la presencia reducida de inhibidores, los procesos de sacarificación y fermentación para la producción de productos valiosos a partir de dicha biomasa son más eficientes. El uso eficiente de la biomasa renovable, que incluye la biomasa de residuos, para producir productos químicos valiosos puede disminuir la necesidad de petróleo.

Definiciones

En esta descripción, se utilizan una serie de términos. Se proporcionan las siguientes definiciones:

Los términos "azúcar fermentable" o "azúcares" se refieren a oligosacáridos y monosacáridos que se pueden utilizar como fuentes de carbono por un microorganismo en un proceso de fermentación.

El término "lignocelulósica" se refiere a una composición que comprende tanto lignina como celulosa. El material lignocelulósico también puede comprender hemicelulosa.

El término "celulósico" se refiere a una composición que comprende celulosa.

Por "peso en seco" de la biomasa se comprende el peso de la biomasa que tiene todo o esencialmente todo el agua retirada. El peso en seco se mide de acuerdo al estándar de la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM) E1756-01 (Método de Prueba Estándar para la Determinación de Sólidos Totales en la Biomasa) o el estándar de la Asociación Técnica de la Industria de la Pulpa y el Papel, Inc. (TAPPI) T- 412 om-02 (Humedad en la Pulpa, el Papel y el Cartón).

Los términos "plastificante" y "agente de ablandamiento" se refieren a materiales que provocan una reducción en las fuerzas intermoleculares cohesivas a lo largo de o entre las cadenas de polímero. Tales materiales pueden actuar, por ejemplo, para disminuir la cristalinidad, o para romper los enlaces entre la lignina y las fibras de carbohidrato no de lignina (por ejemplo, celulosa o hemicelulosa).

El término "sacarificación" se refiere a la producción de azúcares fermentables a partir de polisacáridos.

Los términos "tratar" y "pretratar" con respecto a la biomasa se relacionan de la siguiente manera. La biomasa se trata con reactivo para formar un producto de biomasa tratado, que también se puede denominar como el tratamiento para formar una biomasa pretratada o el tratamiento previo para formar una biomasa pretratada. El uso de "pre" distingue el tratamiento de biomasa que es anterior a la sacarificación de la biomasa,

El término "biomasa pretratada" significa biomasa que ha sido sometida a un tratamiento previo antes de la sacarificación.

Los procesos de tratamiento previo se describen en detalle a continuación.

"Biomasa" se refiere a cualquier material celulósico o lignocelulósico e incluye materiales que comprenden celulosa, y en forma opcional además comprende hemicelulosa, lignina, almidón, oligosacáridos y/o monosacáridos. La biomasa también puede comprender componentes adicionales, tales como proteínas y/o lípidos. Según la invención, la biomasa se puede derivar de una sola fuente, o la biomasa puede comprender una mezcla derivada de más de una fuente; por ejemplo, la biomasa podría comprender una mezcla de mazorcas de maíz y tallos de maíz o de fibra, o una mezcla de hierba y hojas. La biomasa incluye, pero no se limita a, los cultivos bioenergéticos, residuos agrícolas, residuos sólidos urbanos, residuos sólidos industriales, todos procedentes de la fabricación de papel,

5 desechos de jardín, madera y residuos forestales. Los ejemplos de biomasa incluyen, pero no se limitan a, grano de maíz, mazorcas de maíz, residuos de cultivos tales como hojas de maíz, forraje de maíz, fibra de maíz, pastos, trigo, paja de trigo, cebada, paja de cebada, heno, paja de arroz, pasto varilla, residuos de papel, bagazo de caña de azúcar, sorgo, soja, los componentes obtenidos de la molienda de granos, árboles, ramas, raíces, hojas, virutas de madera, aserrín, arbustos y matas, de verduras, frutas, flores y el estiércol de animales. En una realización, la biomasa que es útil para la invención incluye la biomasa que tiene un valor relativamente alto de hidratos de carbono, es relativamente densa, y/o es relativamente fácil de recoger, transportar, almacenar y/o manipular. En una realización de la invención, la biomasa que es útil incluye mazorcas de maíz, tallos de maíz, fibra de maíz y bagazo de caña de azúcar.

10 Para los fines de esta invención, un "solución acuosa que comprende amoníaco" se refiere a la utilización de gas de amoníaco (NH_3), compuestos que comprenden iones de amonio (NH_4^+), tales como hidróxido de amonio o sulfato de amonio, compuestos que liberan amoníaco tras la degradación, tales como urea, y las combinaciones de los mismos en un medio acuoso.

15 Un "consorcio de enzimas" para la sacarificación es una combinación de enzimas que son capaces de actuar sobre una mezcla de biomasa para producir azúcares fermentables. En forma típica, un consorcio de enzimas de sacarificación puede comprender una o más glicosidasas; las glicosidasas se pueden seleccionar del grupo que consiste de glicosidasas de celulosa de hidrolización, glicosidasas de hemicelulosa de hidrolización y glicosidasas de almidón de hidrolización. Otras enzimas en el consorcio de enzimas de sacarificación pueden incluir peptidasas, lipasas, ligninasas y feruloil esterasas.

20 El tratamiento previo de alta concentración de biomasa con una baja concentración de amoníaco acuoso se describe en la solicitud de patente de los EE.UU de propiedad conjunta y en tramitación US. 20070031918A1. Los solicitantes han hallado sorprendentemente que los inhibidores de sacarificación y/o fermentación se liberan a partir de la biomasa que se trata previamente por el uso del método del documento US 20070031918A1, si bien se liberan pocos azúcares. Los azúcares que se liberan son considerados insustanciales. Por ejemplo, una pérdida de azúcar
25 insustancial es de aproximadamente 0,0% hasta aproximadamente 10%, o aproximadamente 0,01%, 0,02%, 0,04%, 0,06%, 0,07%, o 0,09%. Los inhibidores son componentes solubles de una fracción líquida que se puede separar de los sólidos de biomasa pretratada. La extracción del líquido elimina los inhibidores y no reduce sustancialmente el rendimiento de azúcar, lo que de esta manera produce un producto de biomasa pretratada mejorado.

Tratamiento Previo de Amoníaco Acuoso Bajo

30 En el tratamiento previo de amoníaco acuoso bajo utilizado en el presente método, la concentración de amoníaco es mínimamente una concentración que es suficiente para mantener el pH de la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso alcalina y máxima de menos de aproximadamente 12 por ciento en peso con respecto al peso en seco de la biomasa. Esta baja concentración de amoníaco es suficiente para el tratamiento previo, y la baja concentración también puede ser menos de aproximadamente 10 por ciento en peso con respecto al peso en seco de la biomasa.
35 Una concentración muy baja de 6 por ciento de amoníaco en relación con el peso en seco de la biomasa, o menos, también se puede utilizar para el tratamiento previo. Por alcalina se comprende un pH de más de 7,0. Es adecuado en particular un pH de la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso que es mayor que 8. En una realización, el amoníaco está presente en menos de aproximadamente 10 por ciento en peso con respecto al peso en seco de la biomasa. Es adecuado en particular el amoníaco en menos de aproximadamente 6 por ciento en peso con respecto
40 al peso en seco de la biomasa.

La solución acuosa que comprende amoníaco puede comprender en forma opcional por lo menos una base adicional, tal como hidróxido de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de potasio, carbonato de potasio, hidróxido de calcio y carbonato de calcio. La por lo menos una base adicional se puede añadir en una cantidad que se combina con amonio para formar una cantidad de base total que es menos de aproximadamente 20 por ciento en peso con respecto al peso en seco de la biomasa. Preferiblemente, el segundo amoníaco total más base se encuentra en una
45 cantidad que es menor que aproximadamente 15 por ciento en peso. Se pueden utilizar bases adicionales, por ejemplo, para neutralizar los ácidos en la biomasa, para proporcionar iones metálicos para las enzimas de sacarificación, o para proporcionar iones metálicos para el medio de cultivo de fermentación.

50 En el presente método, el peso en seco de la biomasa se encuentra en una concentración inicial de por lo menos aproximadamente 15% del peso de la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso. En forma típica, el peso en seco de la biomasa se encuentra en una concentración inicial de desde por lo menos aproximadamente 15% a aproximadamente 80% del peso de la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso. En otro aspecto, el peso en seco de la biomasa se encuentra en una concentración de por lo menos aproximadamente 15% a aproximadamente 60% del peso de la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso. El porcentaje de la biomasa en la mezcla de biomasa y
55 amoníaco acuoso se mantiene alta para reducir al mínimo la necesidad de concentración de los azúcares resultantes de la sacarificación de la biomasa pretratada, para su uso en la fermentación. La alta concentración de biomasa también reduce el volumen total de material de tratamiento previo, lo que hace el proceso más económico.

La biomasa se puede utilizar directamente como se obtiene de la fuente, o la energía se puede aplicar a la biomasa para reducir el tamaño, incrementar el área de superficie expuesta, y/o se puede aumentar la disponibilidad de

celulosa, hemicelulosa, y/u oligosacáridos presentes en la biomasa de amoníaco y de enzimas de sacarificación utilizados para producir azúcares a partir de biomasa pretratada. Significa que la energía útil para reducir el tamaño, aumentando el área de superficie expuesta, y/o el aumento de la disponibilidad de celulosa, hemicelulosa, y/u oligosacáridos presentes en la biomasa para el amoníaco y para las enzimas de sacarificación incluyen, pero no se limitan a, molienda, trituración, rompimiento, aplastamiento, picado, refinación en disco, ultrasonidos y microondas. Esta aplicación de energía puede ocurrir antes, durante o después del tratamiento previo.

El tratamiento previo de la biomasa con una solución acuosa de amoníaco bajo se lleva a cabo en cualquier recipiente adecuado. En forma típica, el recipiente es uno que puede soportar la presión, tiene un mecanismo para la calefacción, y tiene un mecanismo para mezclar el contenido. Los recipientes comercialmente disponibles incluyen, por ejemplo, el reactor Zipperclave[®] (Autoclave Engineers, Erie, PA), el reactor Jaygo (que se describe en General Methods; Jaygo Manufacturing, Inc., Mahwah, NJ), y un reactor de pistola de vapor (descrito en General Methods; Autoclave Engineers, Erie, PA). Se pueden utilizar reactores a mucha mayor escala con capacidades similares. En forma alternativa, la solución de biomasa y amoníaco se puede combinar en un recipiente, y luego transferirse a otro reactor. La biomasa también se puede tratar previamente en un recipiente, y a continuación, procesarse en forma adicional en otro reactor tal como un reactor pistola de vapor (que se describe en General Methods; Autoclave Engineers, Erie, PA).

Antes de poner en contacto la biomasa con una solución acuosa que comprende amoníaco, se puede aplicar vacío al recipiente que contiene la biomasa. Por medio de la evacuación del aire de los poros de la biomasa, se puede lograr una mejor penetración del amoníaco en la biomasa. El período de tiempo para la aplicación de vacío y la cantidad de presión negativa que se aplica a la biomasa dependerá del tipo de biomasa y se puede determinarse en forma empírica a fin de lograr el tratamiento previo óptimo de la biomasa (de acuerdo con lo medido por la producción de azúcares fermentables luego de la sacarificación).

La puesta en contacto de la biomasa con una solución acuosa que comprende amoníaco se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 200 °C. El contacto inicial de la biomasa con amoníaco a 4 °C, que permite la impregnación a esta temperatura, puede aumentar la eficacia de la sacarificación sobre la biomasa nativa no pretratada. En otra realización, dicha puesta en contacto de la biomasa se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 75 °C a aproximadamente 150 °C. En aún otra realización, dicha puesta en contacto de la biomasa se lleva a cabo a una temperatura de más de 90 °C a aproximadamente 150 °C.

La puesta en contacto de la biomasa con una solución acuosa que comprende amoníaco se lleva a cabo durante un período de tiempo de hasta aproximadamente 25 horas. Son posibles períodos más largos de tratamiento previo, sin embargo, un período de tiempo más corto puede ser preferible, por razones prácticas y económicas. En forma típica, un período de tratamiento de contacto de amoníaco es de aproximadamente 8 horas o menos.

En una realización, el proceso de tratamiento previo se puede llevar a cabo a una temperatura relativamente alta durante un período relativamente corto de tiempo, por ejemplo desde aproximadamente 100 °C hasta aproximadamente 150 °C durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 2 horas. En otra realización, el proceso de tratamiento previo se puede llevar a cabo a una temperatura inferior durante un período relativamente largo de tiempo, por ejemplo de aproximadamente 75 °C a aproximadamente 100 °C durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 8 horas. En aún otra realización, el proceso de tratamiento previo se puede llevar a cabo a temperatura ambiente (aproximadamente 22 a 26 °C) durante un período aún más largo de tiempo de aproximadamente 24 horas. También se pueden utilizar otras combinaciones de temperatura y tiempo intermedios a estos.

Para el proceso de tratamiento previo, las "condiciones adecuadas", tales como la temperatura, el tiempo de contacto con el amoníaco, la concentración de amoníaco, la concentración de una o más bases adicionales, la concentración de la biomasa, el tipo de biomasa y el tamaño de partículas de la biomasa están relacionados; por lo tanto, estas variables se pueden ajustar como sea necesario para obtener un producto óptimo.

Se pueden añadir un plastificante, un agente de reblandecimiento, o una combinación de los mismos, tales como polioles (por ejemplo, glicerol, glicol de etileno), ésteres de polioles (por ejemplo, monoacetato de glicerol), éteres de glicol (por ejemplo, dietilenglicol), acetamida, etanol, y etanolaminas, en el proceso de tratamiento previo (es decir, el paso (a)). Un plastificante se puede añadir como un componente de la solución acuosa de amoníaco, tales como una solución separada, o como un componente seco.

El tratamiento previo o la reacción de tratamiento previo se puede llevar a cabo en cualquier recipiente adecuado, tal como un reactor discontinuo o un reactor continuo. Aquéllos con experiencia en la técnica reconocerán que a temperaturas más altas (por encima de 100 °C), se requiere un recipiente a presión. El recipiente adecuado puede estar equipado con un medio, tales como propulsores, para agitar la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso. El diseño del reactor se discute en Lin, K.-H., y Van Ness, H. C. (en Perry, R.H. y Chilton, C.H. (eds.), Chemical Engineer's Handbook, 5ta Edición (1973) Capítulo 4, McGraw-Hill, NY). La reacción de tratamiento previo se puede llevar a cabo como un proceso discontinuo, o como un proceso continuo.

Es bien sabido por aquéllos con experiencia en la técnica que se requiere una fuente de nitrógeno para el

crecimiento de microorganismos durante la fermentación; por lo tanto el uso de amoníaco durante el tratamiento previo proporciona una fuente de nitrógeno y reduce o elimina la necesidad de complementar el medio de crecimiento utilizado durante la fermentación con una fuente de nitrógeno. Si el pH del producto de tratamiento previo excede a aquella en que las enzimas de sacarificación son activas, o supera el intervalo adecuado para el crecimiento microbiano en la fermentación, los ácidos se pueden utilizar para reducir el pH. La cantidad de ácido utilizada para lograr el pH deseado puede resultar en la formación de sales a concentraciones que son inhibitoras de las enzimas de sacarificación o para el crecimiento microbiano. Con el fin de reducir la cantidad de ácido requerido para alcanzar el pH deseado y para reducir el costo de materia prima de NH₃ en el presente proceso de tratamiento previo, el gas de amoníaco se puede evacuar del reactor de tratamiento previo y reciclarse. En forma típica, se elimina por lo menos una porción del amoníaco, lo que reduce el pH, pero deja algo de nitrógeno que proporciona este nutriente para su uso en la fermentación posterior.

Liberación y remoción del inhibidor

Los solicitantes han hallado sorprendentemente que los inhibidores se liberan a partir de la biomasa que se hace reaccionar con amoníaco acuoso bajo, mientras que se liberan pocos azúcares. Los inhibidores son compuestos que son perjudiciales para la sacarificación y/o la fermentación, por lo que es deseable reducir la cantidad de inhibidores presentes en un producto de biomasa pretratada. Los inhibidores se encuentran como componentes solubilizados de una fracción líquida que estaba presente junto con los sólidos luego de la reacción de la biomasa y amoníaco acuoso bajo. Esta fracción líquida que contiene inhibidores forma un licor de tratamiento previo de biomasa. La extracción del licor de tratamiento previo de biomasa de los sólidos da como resultado la eliminación de los inhibidores liberados, lo que deja una proporción de producto de biomasa pretratada de sólidos que ha reducido la composición de inhibidor sin pérdida sustancial de azúcares.

Este hallazgo está en contraste con otros tipos de procesos de tratamiento previo (tales como los descritos en los documentos US 5.705.369, US 2005161038, y US 20040016525) donde los azúcares solubles sustanciales se liberan durante el tratamiento previo. En estos procesos, el líquido se recoge en forma típica como un prehidrolizado que contiene azúcares, y se utiliza en la fermentación. De este modo, si los inhibidores también son liberados al líquido, no hay ninguna manera sencilla de eliminar aquellos inhibidores sin perder también los azúcares. Se requerirían métodos que implican separaciones de soluto, que son costosos, tales como la cromatografía.

En el presente método, el líquido en el que los inhibidores liberados se solubilizan para formar el licor de tratamiento previo de biomasa es un componente acuoso que se puede proporcionar en diferentes formas. El componente acuoso se puede añadir en cualquier paso del proceso de tratamiento previo. El componente acuoso puede ser cualquier componente basado en agua que se añade antes, durante o después de la adición de amoníaco. Por ejemplo, cuando la biomasa se trata previamente a una concentración de sólidos de aproximadamente 15 por ciento en peso con respecto al peso de la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso, se puede añadir agua a la biomasa antes de la adición de amoníaco acuoso o el amoníaco acuoso se puede diluir lo suficiente como para alcanzar la concentración de biomasa de 15 por ciento final. En cualquiera de los casos, a esta concentración, es probable que una fracción líquida esté presente en la biomasa y la mezcla de amoníaco acuoso. El líquido también puede estar presente cuando la biomasa está en 20 por ciento en peso o incluso más, dependiendo del tipo de biomasa que se está tratando previamente. Si se añade vapor para elevar la temperatura de la biomasa y la mezcla de amoníaco acuoso, la condensación parcial del vapor puede proporcionar el componente acuoso añadido. La cantidad de vapor añadido y la cantidad de condensación que conduce a una fracción líquida dependerá de factores que incluyen la temperatura inicial de la biomasa, el amoníaco acuoso, y el recipiente de reacción, así como de la temperatura final para el tratamiento previo. Aquéllos con experiencia en la técnica determinarán con facilidad la contribución del vapor condensado en las condiciones utilizadas. En forma alternativa o adicional, puede haber un paso de lavado donde, por ejemplo, se añade agua a la biomasa después de la reacción con amoníaco acuoso y los inhibidores liberados se solubilizan en esta agua añadida.

Los inhibidores solubilizados pueden ser cualesquiera compuestos perjudiciales para la sacarificación y/o fermentación que son liberados de la biomasa tratada con amoníaco acuoso bajo. Una porción sustancial de ácido acético, que es un inhibidor de la fermentación, y acetamida estaban presentes en el licor de tratamiento previo de biomasa. Estos compuestos se encuentran en el licor a un nivel que representa alrededor del 10% de la cantidad teórica de ácido acético y acetamida que potencialmente podrían ser liberados de la muestra de biomasa. El ácido acético y acetamida son potentes inhibidores del crecimiento de algunos tipos de células bacterianas. Por ejemplo, el ácido acético es un inhibidor de la *E. coli*, que se cultiva en las fermentaciones de producción. Otro ejemplo es *Zymomonas*, una bacteria que se utiliza en la fermentación para la producción de etanol.

El licor de tratamiento previo de biomasa se puede retirar para separarlo de los sólidos de tratamiento previo por medio de métodos muy conocidos para aquéllos con experiencia en la técnica, tal como por medio de drenaje, decantación, centrifugación, aspiración, y/o filtrado. Además, la biomasa se puede presionar para liberar licor para su eliminación. Cuando se presiona la biomasa para eliminar el líquido, se prefiere no compactar la biomasa para permitir un mejor rendimiento durante la sacarificación.

Después del retiro del licor de tratamiento previo de biomasa, el producto de biomasa pretratada restante se utiliza en la sacarificación, o en la sacarificación y fermentación (SSF) simultánea. Con el fin de obtener cantidades

suficientes de azúcares a partir de la biomasa, la biomasa se puede tratar previamente con una solución acuosa de amoníaco una vez o más de una vez. Del mismo modo, una reacción de sacarificación se puede llevar a cabo una o más veces. Ambos procesos de tratamiento previo y sacarificación se pueden repetir si se desea obtener un mayor rendimiento de azúcares. Para evaluar el rendimiento de los procesos de tratamiento previo y sacarificación, por separado o juntos, se puede determinar el rendimiento teórico de azúcares derivables a partir de la biomasa de partida y compararse con los rendimientos medidos.

Sacarificación

La biomasa pretratada mejorada preparada de acuerdo con el presente método se hidroliza en forma adicional en la presencia de un consorcio de enzimas de sacarificación para liberar oligosacáridos y/o monosacáridos en un hidrolizado. Las enzimas de sacarificación y los métodos para el tratamiento de biomasa se revisan en Lynd, LR, et al. (Microbiol. Mol. Biol. Rev. (2002) 66:506 a 577).

Antes de la sacarificación, la biomasa pretratada se puede tratar para alterar el pH, la composición o temperatura tal de manera que las enzimas del consorcio de enzimas de sacarificación estén activos. El pH se puede alterar a través de la adición de ácidos en forma sólida o líquida. En forma alternativa, el dióxido de carbono (CO₂), que se puede recuperar de la fermentación, se puede utilizar para bajar el pH. Por ejemplo, el CO₂ se puede recolectar a partir de un fermentador y se introduce en el espacio de cabeza del producto de tratamiento previo en el tanque de expansión o se puede burbujear a través de la biomasa pretratada si el líquido adecuado está presente mientras se monitoriza el pH, hasta que se alcanza el pH deseado. La temperatura se puede llevar a una temperatura que es compatible con la actividad de la enzima de sacarificación, de acuerdo con lo indicado a continuación. Se puede añadir cualquier cofactor necesario para la actividad de las enzimas utilizadas en la sacarificación.

El consorcio de enzimas de sacarificación comprende una o más enzimas seleccionadas principalmente, pero no exclusivamente, entre el grupo de las "glicosidasas" que hidrolizan los enlaces éter de di-, oligo- y polisacáridos, y se encuentran en la clasificación de enzimas EC 3.2.1.x (Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego, CA con Suplemento 1 (1993), Suplemento 2 (1994), Suplemento 3 (1995), Suplemento 4 (1997) y Suplemento 5 [en Eur. J. Biochem (1994) 223:1 a 5, Eur. J. Biochem. (1995) 232:1 a 6, Eur. J. Biochem. (1996) 237:1 a 5, Eur. J. Biochem. (1997) 250:1 a 6, y Eur. J. Biochem. (1999) 264:610 a 650, respectivamente]) del grupo general de las "hidrolasas" (EC 3.). Las glicosidasas útiles en el presente método se pueden categorizar por medio del componente de la biomasa que hidrolizan. Las glicosidasas útiles para el presente método incluyen glicosidasas de celulosa de hidrolización (por ejemplo, celulasas, endoglucanasas, exoglucanasas, celobiohidrolasas, β-glucosidasas), glicosidasas de hemicelulosa de hidrolización (por ejemplo, xilanasas, endoxilanasas, exoxilanasas, β-xilosidasas, arabinoxilanasas, mannasas, galactasas, pectinasas, glucuronidasas), y glicosidasas de almidón de hidrolización (por ejemplo, amilasas, α-amilasas, β-amilasas, glucoamilasas, α-glucosidasas, isoamilasas). Además, puede ser útil añadir otras actividades para el consorcio de enzimas de sacarificación, tales como peptidasas (EC 3.4.x.y), lipasas (EC 3.1.1.x y 3.1.4.x), ligninasas (EC 1.11.1.x), y feruloil esterasas (CE 3.1.1.73) para ayudar a liberar los polisacáridos de otros componentes de la biomasa. Es muy conocido en la técnica que los microorganismos que producen enzimas de hidrolización de polisacáridos a menudo presentan una actividad, tal como la degradación de la celulosa, que es catalizada por varias enzimas o un grupo de enzimas que tienen diferentes especificidades de sustrato. Por lo tanto, una "celulasa" de un microorganismo puede comprender un grupo de enzimas, todos los cuales pueden contribuir a la actividad de degradación de la celulosa. Las preparaciones enzimáticas comerciales o no comerciales, tales como las celulasas, pueden comprender numerosas enzimas en función del esquema de purificación utilizado para obtener la enzima. Por lo tanto, el consorcio de enzimas de sacarificación del presente método puede comprender una actividad de enzimas, tal como "celulasa", sin embargo, se reconoce que esta actividad puede ser catalizada por más de una enzima.

Las enzimas de sacarificación se pueden obtener comercialmente, tal como la celulasa Spezyme[®] CP (Genencor International, Rochester, NY) y xilanasas Multifect[®] (Genencor). Además, las enzimas de sacarificación se pueden producir biológicamente, que incluye el uso de microorganismos recombinantes.

Aquéllos con experiencia en la técnica sabrán cómo determinar la cantidad eficaz de enzimas para utilizar en el consorcio y ajustar las condiciones para la actividad óptima de enzimas. Aquéllos con experiencia en la técnica también sabrán cómo optimizar las clases de actividades enzimáticas requeridas dentro del consorcio para obtener una sacarificación óptima de un producto de tratamiento previo dado bajo las condiciones seleccionadas.

Preferiblemente, la reacción de sacarificación se lleva a cabo en o cerca de la temperatura y pH óptimos para las enzimas de sacarificación. La temperatura óptima que se utiliza con el consorcio de enzimas de sacarificación en el presente método varía de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 100 °C. En otra realización, la temperatura óptima oscila entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 80 °C. El pH óptimo puede variar de aproximadamente 2 a aproximadamente 11. En otra realización, el pH óptimo utilizado con el consorcio de enzimas de sacarificación en el presente método varía de aproximadamente 4 a aproximadamente 10.

La sacarificación se puede llevar a cabo durante un tiempo de aproximadamente varios minutos a aproximadamente 120 horas, y preferiblemente de aproximadamente varios minutos a aproximadamente 48 horas. El tiempo para la reacción dependerá de la concentración de enzima y la actividad específica, así como del sustrato utilizado y de las

condiciones ambientales, tales como la temperatura y el pH. Aquellos con experiencia en la técnica pueden determinar con facilidad las condiciones óptimas de temperatura, pH y tiempo para utilizarse con un sustrato particular y el consorcio de enzimas de sacarificación.

5 La sacarificación se puede llevar a cabo por lotes o como un proceso continuo. La sacarificación también se puede llevar a cabo en un solo paso, o en un número de pasos. Por ejemplo, diferentes enzimas requeridas para la sacarificación pueden exhibir diferentes pH o temperaturas óptimas. Un tratamiento primario se puede llevar a cabo con las enzimas a una temperatura y pH, seguido por tratamientos secundarios o terciarios (o más) con diferentes enzimas a diferentes temperaturas y/o pH. Además, el tratamiento con diferentes enzimas en pasos secuenciales puede ser con el mismo pH y/o temperatura, o diferentes valores de pH y temperaturas, tales como el uso de hemicelulasas estables y más activas a mayores valores de pH y temperaturas, seguido por celulasas que son activas a valores de pH y temperaturas más bajas.

10 El grado de solubilización de azúcares de la biomasa luego de la sacarificación se puede monitorizar por medio de la medición de la liberación de monosacáridos y oligosacáridos. Los métodos para medir los monosacáridos y oligosacáridos son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, la concentración de azúcares reductores se puede determinar por el uso del ensayo de ácido 1,3-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, G.L., Anal. Chem. (1959) 31:426 a 428). En forma alternativa, los azúcares se pueden medir por medio de HPLC por el uso de una columna apropiada de acuerdo con lo descrito en la presente memoria en la sección Métodos Generales.

Fermentación

20 Los azúcares fermentables liberados a partir de biomasa pueden ser utilizados por microorganismos adecuados para producir productos químicos blanco. Después de la sacarificación, pero antes de la fermentación, la mezcla de sacarificación se puede concentrar por medio de evaporación, por ejemplo, para aumentar la concentración de azúcares fermentables. En forma opcional, el líquido en el producto de sacarificación se puede separar de los sólidos en un proceso por lotes o un método continuo. En forma opcional, el líquido o la totalidad del producto de sacarificación se pueden esterilizar antes de la fermentación. Dependiendo de los microorganismos utilizados durante la fermentación y el pH utilizado durante la sacarificación, el pH se puede ajustar al adecuado para la fermentación. En adición, la mezcla de sacarificación se puede suplementar con nutrientes adicionales necesarios para el crecimiento microbiano. Los suplementos pueden incluir, por ejemplo, extracto de levadura, aminoácidos específicos, fosfato, fuentes de nitrógeno, sales, y elementos traza. También se pueden incluir los componentes necesarios para la producción de un producto específico hecho por un biocatalizador específico, tales como un antibiótico para mantener un plásmido o un cofactor requerido en una reacción catalizada de enzimas. También se pueden incluir azúcares adicionales para aumentar la concentración de azúcares totales. La mezcla de sacarificación se puede utilizar como un componente de un caldo de fermentación, por ejemplo, que constituyen entre aproximadamente 100% y aproximadamente el 10% del medio final.

35 También se pueden ajustar la temperatura y/o el gas del espacio de cabeza, dependiendo de las condiciones útiles para los microorganismos de fermentación. La fermentación puede ser aeróbica o anaeróbica. La fermentación se puede producir después de la sacarificación, o puede ocurrir simultáneamente con la sacarificación por medio de sacarificación y fermentación simultánea (SSF). La SSF puede mantener los niveles de azúcar producidos por la sacarificación de baja, lo que reduce la inhibición del producto potencial de las enzimas de sacarificación, reduce la disponibilidad de azúcar para los microorganismos contaminantes, y mejora la conversión de biomasa pretratada a monosacáridos y/o oligosacáridos.

45 Los productos químicos blanco que se pueden producir por medio de fermentación por el uso de biocatalizadores incluyen, por ejemplo, ácidos, alcoholes, alcanos, alquenos, aromáticos, aldehídos, cetonas, biopolímeros, proteínas, péptidos, aminoácidos, vitaminas, antibióticos, y productos farmacéuticos. Los alcoholes incluyen, pero no se limitan a metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, etilenglicol, propanodiol, butanodiol, glicerol, eritritol, xilitol, y sorbitol. Los ácidos incluyen ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido butírico, ácido glucónico, ácido itacónico, ácido cítrico, ácido succínico y ácido levulínico. Los aminoácidos incluyen ácido glutámico, ácido aspártico, metionina, lisina, glicina, arginina, treonina, fenilalanina y tirosina. Los productos químicos blanco adicionales incluyen metano, etileno, acetona y enzimas industriales.

50 La fermentación de los azúcares para dirigir los productos químicos se puede llevar a cabo por medio de uno o más biocatalizadores apropiados en fermentaciones individuales o de varios pasos. Los biocatalizadores pueden ser microorganismos seleccionados de bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Los biocatalizadores pueden ser microorganismos de tipo salvaje o microorganismos recombinantes, e incluir *Escherichia*, *Zymomonas*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, y *Clostridium*. En otra realización, los biocatalizadores se pueden seleccionar del grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clostridia thermocellum*, *Thermoanaerobacterium saccharoyticum*, y *Pichia stipitis* recombinantes.

Se han descrito varios biocatalizadores utilizados en la fermentación para producir productos químicos blanco y otros pueden ser descubiertos, producidos a través de mutación, o de ingeniería a través de medios recombinantes. Cualquier biocatalizador que utiliza azúcares fermentables producidos a partir de la sacarificación de la biomasa

pretratada por el uso del presente sistema se puede utilizar para preparar los productos químicos blanco que se sabe que se producen por medio de fermentación.

Son de interés particular los biocatalizadores que producen los biocombustibles, que incluyen etanol y butanol. Por ejemplo, la fermentación de hidratos de carbono a la acetona, butanol, etanol y (fermentación ABE) por medio de *Clostridia* solventogénica es muy conocido (Jones and Woods (1986) Microbiol. Rev. 50:484 a 524). Un proceso de fermentación para la producción de altos niveles de butanol, también la producción de acetona y etanol, por el uso de una cepa mutante de *Clostridium acetobutylicum* se describe en el documento US 5.192.673. El uso de una cepa mutante de *Clostridium beijerinckii* para producir altos niveles de butanol, también productores de acetona y etanol, se describe en el documento US 6.358.717. Las solicitudes de patentes de propiedad conjunta y en tramitación WO 2007/041269 y WO 2007/050671 describen la producción de 1-butanol e isobutanol, respectivamente, en huéspedes microbianos genéticamente manipulados. Las solicitudes de patentes de propiedad conjunta y en tramitación WO 2007/130518 y WO 2007/130521 describen la producción de 2-butanol en huéspedes microbianos genéticamente manipulados. El isobutanol, 1-butanol o 2-butanol se pueden producir a partir de la fermentación de hidrolizado producido por el uso del presente sistema por medio de un huésped microbiano siguiendo los métodos descritos.

Las cepas genéticamente modificadas de *E. coli* también se han utilizado como biocatalizadores para la producción de etanol (Underwood et al., (2002) Appl. Environ. Microbiol. 68:6263 a 6272). Una cepa genéticamente modificada de *Zymomonas mobilis* que ha mejorado la producción de etanol se describe en el documento US 2003/0162271 A1. Una cepa productora de etanol manipulada en forma adicional de *Zymomonas mobilis* y su uso para la producción de etanol se describen en la solicitud de patente de propiedad conjunta y en tramitación WO 2008/051348, respectivamente. El etanol se puede producir a partir de la fermentación de hidrolizado producido por el uso del presente sistema por medio de *Zymomonas mobilis* siguiendo los métodos descritos. La sacarificación de la biomasa pretratada a la que se le retiró el licor de tratamiento previo que contiene inhibidores, en azúcares fermentables, seguido por la fermentación de los azúcares a un producto químico blanco se ejemplifica en el Ejemplo 4 en la presente memoria para la producción de etanol a partir de mazorcas de maíz pretratado por el uso de *Z. mobilis* como biocatalizador para la fermentación de azúcares en etanol.

El ácido láctico se ha producido en las fermentaciones por cepas recombinantes de *E. coli* (Zhou et al., (2003) Appl. Environ. Microbiol. 69:399 a 407), cepas naturales de *Bacillus* (US 20050250192) y *Rhizopus oryzae* (Tay and Yang (2002) Biotechnol. Bioeng. 80:1 a 12). Las cepas recombinantes de *E. coli* se han utilizado como biocatalizadores en la fermentación para producir 1,3 propanodiol (US 6.013.494, US 6.514.733), y ácido adípico (Niu et al., (2002) Biotechnol. Prog. 18:201 a 211). El ácido acético se ha llevado a cabo por medio de fermentación por el uso de *Clostridia* recombinante (Cheryan et al., (1997) Adv. Appl. Microbiol. 43:1 a 33), y las cepas de levadura identificadas recientemente (Freer (2002) Mundial J. Microbiol. Biotechnol. 18:271 a 275). La producción de ácido succínico por medio de *E. coli* recombinante y otras bacterias se describe en el documento US 6159738, y por la *E. coli* mutante recombinante en Lin et al., (2005) Metab. Eng. 7:116 a 127). El ácido pirúvico se ha producido por medio de la levadura *Torulopsis glabrata* mutante (Li et al., (2001) Appl. Microbiol. Technol. 55:680 a 685) y por la *E. coli* mutante (Yokota et al., (1994) Biosci. Biotech. Biochem. 58:2164 a 2167). Las cepas recombinantes de *E. coli* se han utilizado como biocatalizadores para la producción de ácido para-hidroxicinámico (US20030170834) y ácido quínico (US20060003429).

Un mutante de *Acidipropionici Propionibacterium* se ha utilizado en la fermentación para producir ácido propiónico (Suwannakham and Yang (2005) Biotechnol. Bioeng. 91:325 a 337), y el ácido butírico se ha llevado a cabo por medio de *Clostridium tyrobutyricum* (Wu and Yang (2003) Biotechnol. Bioeng. 82:93 a 102). El propionato y propanol se han llevado a cabo por medio de la fermentación a partir de treonina por la cepa 17cr1 de *Clostridium sp.* (Janssen (2004) Arch. Microbiol. 182:482-486). Una levadura *Aureobasidium pullulans* se ha utilizado para producir ácido glucónico (Anantassiadis et al., (2005) Biotechnol. Bioeng. 91:494 a 501), por medio de un mutante de *Aspergillus niger* (Singh et al., (2001) Indian J. Exp. Biol. 39:1136 a 43). El ácido 5-ceto-D-glucónico se llevó a cabo por medio de un mutante de *Gluconobacter oxydans* (Elfari et al., (2005) Appl. Microbiol. Biotech. 66:668 a 674), el ácido itacónico se produjo por medio de mutantes de *Aspergillus terreus* (Reddy and Singh (2002) Bioresour. Technol. 85:69 a 71), el ácido cítrico se produjo por medio de una cepa mutante de *Aspergillus niger* (Ikram-UI-Haq et al., (2005) Bioresour. Technol. 96:645 a 648), y el xilitol se produjo por medio de *Candida guilliermondii* FTI 20037 (Mussatto and Roberto (2003) J. Appl. Microbiol. 95:331 a 337). Los biopolíesteres que contienen 4-hidroxivalerato, también contienen cantidades significativas de ácido 3-hidroxibutírico y ácido 3-hidroxivalérico, se produjeron por medio de *Pseudomonas putida* y *Ralstonia eutropha* recombinantes (Gorenflo et al., (2001) Biomacromolecules 2:45 a 57). El L-2,3-butanodiol se llevó a cabo por medio de *E. coli* recombinante (Ui et al., (2004) Lett. Appl. Microbiol. 39:533 a 537).

La producción de aminoácidos por medio de fermentación se ha logrado por el uso de cepas auxotróficas y cepas resistentes a análogos de aminoácidos de *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, y *Serratia*. Por ejemplo, la producción de histidina por el uso de una cepa resistente a un análogo de histidina se describe en la Publicación de Patente Japonesa Núm. 56008596 y el uso de una cepa recombinante se describe en el documento EP 136359. La producción de triptófano por el uso de una cepa resistente a un análogo de triptófano se describe en las Publicaciones de Patente Japonesa Núms. 47004505 y 51019037. La producción de isoleucina por el uso de una cepa resistente a un análogo de isoleucina se describe en las Publicaciones de Patente Japonesa Núms. 47038995, 51006237 y 54032070. La producción de fenilalanina por el uso de una cepa resistente a un análogo de fenilalanina

se describe en la Publicación de Patente Japonesa Núm. 56010035. Se ha descrito la producción de tirosina por el uso de una cepa que requiere fenilalanina para el crecimiento, resistente a la tirosina (Agr. Chem. Soc. Japan 50 (1) R79-R87 (1976), o una cepa recombinante (EP263515, EP332234), y la producción de arginina por el uso de una cepa resistente a un análogo de L-arginina (Agr. Biol. Chem. (1972) 36:1675 a 1684, las Publicaciones de Patente Japonesa Núms. 54037235 y 57150381). La fenilalanina también se ha producido por medio de la fermentación en cepas de *Escherichia coli* ATCC 31882, 31883, y 31884. La producción de ácido glutámico en una bacteria corineforme recombinante se describe en el documento US 6.962.805. La producción de treonina por medio de una cepa mutante de *E. coli* se describe en Okamoto e Ikeda (2000) J. Biosci. Bioeng. 89:87 a 79. La metionina se produjo por medio de una cepa mutante de *Corynebacterium lilium* (Kumar et al, (2005) Bioresour. Technol. 96: 287 a 294).

Los péptidos, enzimas y otras proteínas útiles también se han llevado a cabo por medio de biocatalizadores (por ejemplo, en los documentos US 6861237, US 6777207 y US 6228630).

El método de la presente invención también se puede utilizar en la producción de 1,3-propanodiol a partir de biomasa. Las cepas recombinantes de *E. coli* se han utilizado como biocatalizadores en la fermentación para producir 1,3-propanodiol (los documentos US 6013494, US 6514733). La biomasa pretratada por el uso del presente sistema se puede sacarificar; luego de la sacarificación, la *E. coli* se utiliza para producir 1,3-propanodiol de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 10 de la solicitud de los Estados Unidos de propiedad conjunta y en tramitación 2007/0031919.

Los productos químicos blanco producidos en la fermentación por medio de biocatalizadores se pueden recuperar por el uso de varios métodos conocidos en la técnica. Los productos se pueden separados de otros componentes de fermentación por medio de centrifugación, filtración, microfiltración, y nanofiltración. Los productos se pueden extraer por medio de intercambio iónico, extracción con disolvente, o electrodiálisis. Los agentes floculantes se pueden utilizar para ayudar en la separación del producto. Como un ejemplo específico, el 1-butanol bioproducido se puede aislar del medio de fermentación por el uso de métodos conocidos en la técnica para las fermentaciones ABE (véase, por ejemplo, Durre, Appl. Microbiol. Biotechnol. 49:639 a 648 (1998), de Groot et al., Process. Biochem. 27:61 a 75 (1992), y las referencias en el mismo). Por ejemplo, los sólidos se pueden eliminar del medio de fermentación por medio de centrifugación, filtración, decantación, o similares. Luego, el 1-butanol se puede aislar del medio de fermentación por el uso de métodos tales como la destilación, destilación azeotrópica, extracción de líquido-líquido, adsorción, corriente de gas, evaporación de membrana, o pervaporación. La purificación de 1,3-propanodiol a partir de los medios de fermentación se puede llevar a cabo, por ejemplo, por medio del sometimiento de la mezcla de reacción a una extracción con un disolvente orgánico, destilación y cromatografía en columna (el documento U.S. 5.356.812). Un disolvente orgánico bueno en particular para este proceso es el ciclohexano (el documento U.S. 5.008.473). Los aminoácidos se pueden recoger del medio de fermentación por métodos tales como intercambio de iones, adsorción de resina y/o cristalización.

Ejemplos

Métodos generales y materiales

Se utilizan las siguientes abreviaturas:

"HPLC" es Cromatografía Líquida de Alta Eficacia, "C" es centígrados, "kPa" es kiloPascal, "m" es metro, "mm" es milímetro, "kW" es kilowatt, "µm" es micrómetro, "µL" es microlitro, "ml" es mililitro, "L" es litro, "min" es minuto, "mm" es milimolar, "cm" es centímetro, "g" es gramo, "kg" es kilogramo, "wt" es peso, "hr" es hora, "temp" o "T" es temperatura, "teór." es teórico, "pretratamiento" es tratamiento previo, "DWB" es el peso en seco de la biomasa, "ASME" es la Sociedad Americana de Ingenieros Mecánicos, "s.s." de acero inoxidable.

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

Reactor Jaygo

El reactor Jaygo es un reactor de 130 litros (aproximadamente 51 cm de diámetro x 91 cm de longitud), de tipo de paleta horizontal (Jaygo Manufacturing, Inc., Mahwah, NJ) fabricado a partir de una aleación C-22 de Hastelloy[®]. El reactor está equipado con una camisa de vapor capaz de calentar a aproximadamente 177 °C (862 kPa). También se utiliza la inyección de vapor directo para llevar rápidamente la biomasa hasta la temperatura de tratamiento previo. La presión del vapor se ajusta y se controla para mantener la temperatura de tratamiento previa deseada. Numerosos puertos permiten la inyección de otros disolventes y líquidos calientes.

Reactor de Pistón de Barril Grande

Se construyó un reactor de pistón de barril grande (código ASME estampado), que consistía en un barril de acero inoxidable de 5,1 cm x 68,6 cm equipado con un pistón, orientado en forma horizontal. El pistón se selló al barril con cuatro juntas tóricas y se presurizó con nitrógeno en la parte trasera del pistón durante la carrera de descarga. El barril de 68,6 cm estaba equipado con ocho puertos de uso múltiple, 4 cada uno a lo largo de las superficies superior

e inferior, para permitir la aplicación de vacío, la inyección de amoníaco acuoso, la inyección de vapor, y la inserción de los termopares para la medición de la temperatura en el interior del barril. El reactor de barril estaba equipado con una camisa de vapor para el calentamiento uniforme del barril. El reactor de barril estaba directamente adjunto a un tanque de expansión de acero inoxidable de 15,2 cm x 61 cm, orientado en forma vertical. El barril se aisló del tanque de expansión por medio de una disposición de boquilla cónica y válvula de cizallamiento de extremo de asiento. El diámetro de la boquilla de válvula de cizallamiento de extremo fue de 3,5 cm. La contrapresión en la boquilla cónica y el asiento era ajustable, la mayoría de los ensayos se llevaron a cabo por el uso de ~138 kPa (presión manométrica) de contrapresión en un cilindro de aire de 10,2 cm de diámetro conectado al cono de la válvula de cizallamiento de extremo. El cono de la válvula de cizallamiento de extremo podría retroceder hasta 1,6 cm para permitir la descarga de partículas en el tanque de expansión. Un codo en la salida de la válvula de cizallamiento de extremo dirigía los sólidos pretratados hacia abajo en la parte inferior del tanque de expansión donde los sólidos se separaban con facilidad por medio del desempernado de una pestaña de extremo en forma de cúpula en la parte inferior del tanque. Una brida superior en forma de cúpula para el tanque de expansión incorporó un montaje de salida especial con ranuras mecanizadas en ángulos rectos con el eje del tanque de expansión, que provocó vapores liberados para viajar alrededor de una trayectoria de esquina hasta un montaje de salida, para ayudar a prevenir el arrastre de las partículas de biomasa arrastradas y las gotas de agua en un condensador de ventilación. Tres calentadores de banda eléctricos (ajustado a 60 °C) y aislamiento se añadieron a lo largo del tanque de expansión para permitir que los sólidos pretratados calientes se expandan en un recipiente calentado, lo que mejor simula un proceso a escala comercial.

20 Reactor de sacarificación de lotes alimentados

El reactor de sacarificación de lotes alimentados es un fermentador de 15 L (B. Braun Biotech International, Allentown, PA) controlado por una unidad de control de datos BioStat ED y un módulo de control asociado que contiene una bomba de circulación, bombas de ácido y base, válvulas solenoides, intercambiadores de calor para el control de la temperatura, suministro de vapor, agua de proceso, válvulas de control del suministro de aire y filtración, y las válvulas de control de la contrapresión y filtros de escape. El fermentador estaba equipado con dos impulsores de 11,4 cm de diámetro y tres palas de alta eficiencia Lightnin A-310. El impulsor inferior se encontraba 7,6 cm desde la parte inferior del reactor (que no se podía ubicar más cerca debido a la presencia de una disposición de sello grande cerca de la parte inferior del eje para el eje de penetración inferior de la unidad) y el impulsor superior estaba ubicado 22,9 cm desde la parte inferior del reactor. El recipiente fermentador tiene un diámetro de 19,0 cm y una altura máxima de 55,9 cm. Se instalaron cuatro deflectores desmontables, cada uno de los cuales tiene una anchura de 1,6 cm y una longitud de 48,3 cm y se extienden desde la parte inferior del recipiente hasta dentro de ~ 7,6 cm de la parte superior. Sondeado en los puertos superiores e inferiores sobre el sistema fermentador se encontraba un bucle con bomba alrededor que consistía en una bomba de lóbulo APV (modelo M1/028/06), mangueras flexibles de 1 y 1/2 pulgadas (3,81 cm) y un indicador de flujo de vista de teflón. El bucle con bomba alrededor se aisló del recipiente de fermentación con Valmicro de 1 y 1/2 pulgadas (3,81 cm) y válvulas de esfera de paso completo SVF con cuerpos CF8M, esferas de 316 s.s. y asientos de PTFE. Además, una válvula de cizallamiento de puerto en V (Triac Controls) se hallaba corriente abajo de la bomba de lóbulo, antes de la válvula de esferas para el aislamiento de la bomba desde el puerto superior del fermentador. Durante los ciclos de recirculación, esta válvula se cerró en forma gradual hasta 60 °C para proporcionar un mayor cizallamiento de los sólidos pretratados de recirculación.

Métodos analíticos

Cuantificación de glucosa y xilosa en sólidos

La cantidad de glucosa y xilosa en cada muestra de biomasa de inicio se determinó por el uso de métodos muy conocidos en la técnica, tales como la norma ASTM E1758-01 "Método estándar para la determinación de hidratos de carbono por medio de HPLC".

Medición del contenido de azúcar soluble, acetamida, ácido láctico y ácido acético

Los azúcares solubles (glucosa, celobiosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa), ácido acético y etanol en el licor de sacarificación o el caldo de fermentación se midieron por medio de HPLC (Modelo Agilent 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) por el uso de columnas Bio-Rad HPX-87P y Bio-Rad HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) con columnas de guardia apropiadas. El pH de la muestra se midió y se ajustó a 5 a 6 con ácido sulfúrico, si era necesario. La muestra se pasó a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm directamente hacia un vial de HPLC. Las condiciones de ejecución de HPLC estuvieron de acuerdo con lo presentado a continuación:

HPX-87P (para los hidratos de carbono):

Volumen de inyección: 10 a 50 µL, dependiendo de los límites de concentración y del detector

55 Fase móvil: agua de grado HPLC, de 0,2 µm filtrada y desgasificada

Velocidad de flujo: 0,6 ml/minuto

Temperatura de la columna: 80 a 85 °C, temperatura de la columna de guardia < 60 °C

Temperatura del detector: lo más cercano a la temperatura de la columna principal como fuera posible

Detector: índice de refracción

5 Tiempo de ejecución: 35 minutos de recolección de datos más 15 minutos después de la ejecución (con un posible ajuste para los compuestos de elución tardía)

BioRad Aminex HPX-87H (para los carbohidratos, ácido acético y etanol)

Volumen de inyección: 5 a 10 µL, dependiendo de los límites de concentración y del detector

Fase móvil: 0,01 N de ácido sulfúrico, de 0,2 µm filtrada y desgasificada

Velocidad de flujo: 0,6 ml/minuto

10 Temperatura de la columna: 55 °C

Temperatura del detector: lo más cercano a la temperatura de la columna como fuera posible

Detector: índice de refracción

Tiempo de ejecución: 25 a 75 minutos de recolección de datos

15 Después de la ejecución, las concentraciones en la muestra se determinaron a partir de curvas estándar para cada uno de los compuestos.

Ejemplo 1

Baja solubilización de azúcares tras el tratamiento previo a baja temperatura

20 Mazorcas de maíz enteras o fracturadas (aproximadamente 13 kg, peso en seco) se cargaron en el reactor Jaygo. Las mazorcas se fracturaron pasando a través del refinador de disco (Métodos Generales) equipado con placas C-2975. Las mazorcas fracturadas resultantes se pasaron a través de una pantalla de 1,27 cm. Las piezas retenidas se pasaron a través del refinador de disco de nuevo con una brecha de 0,5 cm menor. Se aplicó un vacío al reactor, y se inyectó una solución de hidróxido de amonio diluido para dar la concentración final deseada de amoníaco (2% o 6% en peso de biomasa seca NH₃/wt) y la concentración de la biomasa seca (30% o 40% en peso de biomasa seca/wt peso total de la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso). En el caso de las mazorcas enteras, la concentración inicial de amoníaco fue del 6% (peso/peso en seco de la biomasa) y la concentración de biomasa seca fue de 40%. En el caso de las mazorcas fracturadas, la concentración inicial de amoníaco fue de 2% (peso/peso en seco de la biomasa) y la concentración de biomasa seca fue de 30%. El vacío se alivió y se aplicó vapor a la camisa para calentar las mazorcas mientras se empapaba a una temperatura de 93 °C durante toda la muestra de la mazorca y 85 °C para las muestras de mazorca fracturadas. Se aplicaron breves períodos de aumento de la velocidad del agitador (hasta 96 rpm) en un esfuerzo para aumentar la velocidad de calentamiento. Las mazorcas empapadas se llevaron a cabo a temperatura durante 8 hs para las mazorcas enteras y 4 hs para las mazorcas fracturadas con una mezcla constante a 32 rpm, después se dejó enfriar durante la noche con una mezcla continuo. Antes de retirar la biomasa pretratada del reactor, el reactor se puso bajo vacío a 90 °C para despojar el amoníaco de la biomasa pretratada.

35 La composición de las fases sólida y líquida de la mezcla de biomasa pretratada y mazorca entera se analizó de acuerdo con lo descrito en los Métodos Generales y los resultados se presentan en la Tabla 1. Las cantidades se presentan como % de las cantidades teóricas en la biomasa de inicio, con ácido acético y acetamida juntos correspondiente al acetilo en la biomasa. La glucosa y la xilosa permanecieron en gran medida en los sólidos (en celulosa y hemicelulosa, respectivamente), con sólo pequeñas cantidades de oligómeros solubles medidos en el líquido. Todo el acetilo de materia prima se halló en la fase líquida, ya sea como ácido acético o acetamida.

Tabla 1. Particionamiento de los diferentes componentes de materia prima para la fase sólida o líquida después de un tratamiento previo a baja temperatura de mazorcas enteras.

Componente	Fase sólida: % del valor de la materia prima teórica	Fase líquida: % del valor de la materia prima teórica			
		Azúcares monómeros	Azúcares oligómeros	Ácido acético	Acetamida
Glucosa	99	0	1	-	-
Xilosa	83	0	7 * 1	-	-
Acetilo	0	-	-	56	44

* Los totales pueden no ser 100 debido al nivel de sensibilidad del ensayo

Se analizó la composición de las fases sólida y líquida de la mezcla de biomasa pretratada y mazorca fracturada tal de acuerdo con lo descrito en los Métodos Generales y los resultados se presentan en la Tabla 2. Las cantidades se presentan como % de las cantidades teóricas en la biomasa de inicio, con ácido acético y acetamida juntos correspondiente al acetilo en la biomasa. Al igual que con la biomasa pretratada y mazorca entera, la glucosa y la xilosa permanecieron en gran medida en los sólidos (en celulosa y la hemicelulosa, respectivamente), con sólo pequeñas cantidades de oligómeros solubles medidos en el líquido. También, todo el acetilo de materia prima se halló en la fase líquida, ya sea como ácido acético o acetamida.

Tabla 2. Particionamiento de los diferentes componentes de materia prima para la fase sólida o líquida después de un tratamiento previo a baja temperatura de mazorcas fracturadas.

Componente	Fase sólida: % del valor de la materia prima teórica	Fase líquida: % del valor de la materia prima teórica			
		Azúcares monómeros	Azúcares oligómeros	Ácido acético	Acetamida
Glucosa	97	2	2 *	-	
Xilosa	92		1 *	-	
Acetilo	0	-	-	81	9 *

* Los totales pueden no ser 100 debido al nivel de sensibilidad del ensayo

Ejemplo 2

Baja solubilización de azúcares tras el tratamiento previo a alta temperatura

Se cargaron mazorcas de maíz fracturadas (13 kg, en base seca), preparadas de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 1, en el reactor Jaygo. Después de crear un vacío en el reactor, se bombeó una solución de hidróxido de amonio de la fuerza adecuada para dar 2% de amoníaco (peso/peso en seco de la biomasa) y 30% de peso en seco de la concentración de biomasa en el reactor con una mezcla de 32 rpm a temperatura ambiente. El contenido del reactor luego se calentó a 95 °C por el uso de una camisa de vapor a baja presión. Una vez que el reactor alcanzó 95 °C, se utilizó la inyección directa de vapor para calentar el contenido del reactor a 145 °C. Cuando el reactor alcanzó 145 °C, los contenidos del reactor se mantuvieron a esa temperatura durante 20 minutos por el uso de una camisa de vapor y algo de inyección directa de vapor. Después de 20 minutos, un vacío se arrojó sobre la ventilación en el reactor y el motor de la trituradora se encendió durante 5 minutos. Después de 1 h, se encendió el agua de refrigeración para la camisa. Los contenidos del reactor Jaygo se enfriaron a entre 33 °C y 37 °C; a continuación, se utilizó CO₂ para presurizar el reactor a 138 kPa. La atmósfera de CO₂ presurizado se mantuvo durante 30 min. La temperatura final de los contenidos del reactor fue de entre 27 °C a 31 °C. El pH de la biomasa empapada/pretratada fue de aproximadamente 7,5.

Se analizó la composición de las fases sólida y líquida de la mezcla de la biomasa pretratada de acuerdo con lo descrito en los Métodos Generales y los resultados se presentan en la Tabla 3. Las cantidades se presentan como % de las cantidades teóricas en la biomasa de inicio, con ácido acético y acetamida juntos correspondiente al acetilo en la biomasa. Al igual que con la biomasa pretratada a baja temperatura en el Ejemplo 1, la glucosa y la xilosa permanecieron en gran medida en los sólidos (en celulosa y hemicelulosa, respectivamente), con sólo pequeñas cantidades de oligómeros solubles medidos en el líquido. También, todo el acetilo de materia prima se halló en la fase líquida, ya sea como ácido acético o acetamida.

Tabla 3. Particionamiento de diferentes componentes de materia prima para la fase sólida o líquida después del tratamiento previo a alta temperatura de las mazorcas fracturadas.

Componente	Fase sólida: % del valor de la materia prima teórica	Fase líquida: % del valor de la materia prima teórica			
		Azúcares monómeros	Azúcares oligómeros	Ácido acético	Acetamida
Glucosa	100	0	2 *	-	-
Xilosa	93	0	2 *	-	-
Acetilo	0	-	-	90	9 *

* Los totales pueden no ser 100 debido al nivel de sensibilidad del ensayo

Ejemplo 3

Licores de tratamiento previo contienen inhibidores de la fermentación

5 Se llevó a cabo una serie de tratamientos previos en el reactor de pistón de barril grande (que se describe en los Métodos Generales) de acuerdo con lo presentado a continuación. Se añadió vapor a la camisa del barril para precalentar el barril del reactor de pistón de barril grande (que se describe en los Métodos Generales) a ~130 °C. El receptor de expansión se precalentó a ~ 60 °C con calentadores de banda. Las mazorcas de maíz enteras se procesaron con una trituradora de mandíbulas (motor de 2,2 kW) con una separación de mandíbula de aproximadamente 0,95 cm, seguido por un Delumper[®] (motor de 1,5 kW, Franklin Miller Inc., Livingston, NJ),
 10 seguido por el cribado con una pantalla Sweco equipada con una pantalla de 1,9 cm estándar de EE.UU. para fracturar las mazorcas enteras en trozos más pequeños. Estas mazorcas fracturadas (175 g, peso en seco) se cargaron en el reactor de barril grande por medio de la colocación a mano de las mazorcas en el extremo del reactor con el pistón retirado. El pistón se reemplazó para tapar el extremo. Se aplicó un vacío al recipiente del reactor y al receptor de expansión para llevar la presión a < 10 kPa, y se inyectó una solución diluida de hidróxido de amonio en el reactor para dar una concentración de amoníaco de 6 g/100 g de peso en seco de la biomasa y un peso en seco de concentración de biomasa de 45 g/100 g de mezcla de biomasa total y amoníaco acuoso. Una vez que se cargó el amoníaco, se inyectó vapor en el reactor para llevar la temperatura a 145 °C. La mezcla se mantuvo a esta temperatura durante 10 minutos por medio del control de la temperatura y la adición de vapor según fuera necesario y luego se descargó en el tanque de expansión precalentado por medio de la activación del pistón. Se arrojó un vacío sobre el tanque de expansión hasta que el receptor del expansión alcanzara ~ 59 °C. Para la serie A, se llevaron a cabo 12 de estos tratamientos previos y para la serie B, se llevaron a cabo 13 de estos tratamientos previos. Los sólidos se recogieron por medio de la eliminación de la parte inferior del tanque de expansión. Todo exceso de líquido se drenó de los sólidos, y todo el líquido recolectado de cada serie de tratamiento previo se agruparon juntos. Este líquido se analizó por el contenido de azúcar, ácido acético y acetamida de acuerdo con lo descrito en los Métodos Generales. El líquido era muy bajo en azúcares mientras que contenía más ácido acético y acetamida, de acuerdo con lo mostrado en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4. Azúcar retirado en los licores de tratamiento previo.

Serie de tratamiento previo	Glucosa de Monómero: % del valor teórico	Glucosa Total: % del valor teórico	Xilosa de Monómero: % del valor teórico	Xilosa Total: % del valor teórico
A	0,02%	0,15%	0	0,12%
B	0	0,13%	0	0,11%

Tabla 5. Ácido acético y acetamida eliminado en los licores de tratamiento previo.

Serie de tratamiento previo	% teórico de Ácido acético	% teórico de Acetamida
A	6,2%	1,8%
B	10,2%	2,7%

30

Ejemplo 4

Producción de etanol por el uso de hidrolizado de sacarificación a partir de biomasa pretratada con inhibidores en líquido eliminado

35 Se añadió vapor a la camisa del barril para precalentar el barril del reactor de pistón de barril grande (que se describe en los Métodos Generales) a ~ 130 °C. El receptor de expansión se precalentó a ~ 60 °C con calentadores de banda. Las mazorcas fracturadas se prepararon de acuerdo con lo presentado a continuación. Las mazorcas de maíz enteras se procesaron con una trituradora de mandíbulas (motor de 2,2 kW) con una separación de mandíbula de aproximadamente 0,95 cm, seguido por un Delumper[®] (motor de 1,5 kW, Franklin Miller Inc., Livingston, NJ),
 40 seguido por el cribado con una pantalla Sweco equipada con una pantalla de 1,9 cm estándar de EE.UU. para fracturar las mazorcas enteras en trozos más pequeños. Estas mazorcas procesadas (175 g, peso en seco) se cargaron en el reactor de pistón de barril grande por medio de la colocación a mano de las mazorcas en el extremo del reactor con el pistón retirado. El pistón se reemplazó para tapar el extremo. Se aplicó un vacío al recipiente del reactor y al receptor de expansión para llevar la presión hasta < 10 kPa, y se inyectó una solución diluida de hidróxido de amonio en el reactor para dar una concentración de amoníaco de 6 g/100 g de peso en seco de la biomasa y un peso en seco de concentración de biomasa de 45 g/100 g de la mezcla de biomasa total y amoníaco acuoso. Una vez que se cargó el amoníaco, se inyectó vapor en el reactor para llevar la temperatura a 145 °C. La

45

mezcla se mantuvo a esta temperatura durante 10 minutos por medio del control de la temperatura y la adición de vapor según fuera necesario y luego se descargó en el tanque de expansión precalentado por medio de la activación del pistón. Se arrojó un vacío sobre el tanque de expansión hasta que el receptor del expansión alcanzara ~ 59 °C. Tras la recolección del receptor de expansión, el líquido libre se separó de los sólidos pretratados y no volvió a añadir para la sacarificación. Se llevó a cabo un total de 17 de estos tratamientos previos. Las mazorcas pretratada de 4 tratamientos previos se agruparon para su sacarificación para proporcionar un hidrolizado inicial para la sacarificación de los lotes alimentados. Las mazorcas pretratadas de las 13 ejecuciones restantes se agruparon para su uso en la sacarificación de lotes alimentados.

Para iniciar la sacarificación de lotes alimentados, el reactor de sacarificación de lotes alimentados que se describió en los Métodos Generales se cargó primero con hidrolizado para llenar el volumen del reactor hasta la parte inferior del primer impulsor. Este hidrolizado se preparó por medio de la sacarificación de mazorcas previamente tratadas en matraces de agitación de 2,8 L. Estos matraces de agitación se cargaron con 465 g de sólidos pretratados, 1000 ml de agua DI, y enzimas a 28,4 mg Spezyme[®] CP/g de celulosa y 4,2 mg de proteína activa/g de consorcio de enzimas de celulosa y hemicelulasa (Diversa, San Diego, CA) que comprendía β-glucosidasa, xilanasa, β-xilosidasa y arabinofuranosidasa. Antes de la adición de enzimas, el pH se ajustó a 5 con 8,5% de H₃PO₄. Los matraces de agitación se mantuvieron a 50 °C y 150 rpm en un agitador rotatorio durante 48 hs, momento en el cual el hidrolizado se cargó en el reactor de lotes alimentados.

Una vez que se cargó el hidrolizado inicial, se añadió la primera alícuota de la mezcla de biomasa pretratada amoníaco (~ 700 g) al reactor. El pH se mantuvo a un punto de ajuste de 5,5 por medio de la adición de 8,5% de H₃PO₄. Una vez que el pH se reajustó al punto de ajuste, se añadieron 28,4 mg de Spezyme[®] CP/g de celulosa y 4,2 mg de proteína activa/g de consorcio de enzimas de celulosa y hemicelulasa (Diversa) que comprendía β-glucosidasa, xilanasa, β-xilosidasa y arabinofuranosidasa. Se añadieron alícuotas adicionales de la mezcla de biomasa pretratada y amoníaco, Spezyme[®] CP de consorcio de enzimas de celulosa y hemicelulasa en t = 4, 8, 12, 22, 26, 30 y 34 hs. El bucle con bomba alrededor del se inició por lo general alrededor de 1 hora después de la adición de la enzima y se llevó a cabo durante aproximadamente 1 hora hasta la adición de sólidos de las 22 hs. Después de las adiciones a las 26 hs y 30 hs, la bomba se inició aproximadamente 50 minutos después de la adición de la enzima y se ejecutó durante 30 minutos. Después de la adición de las 34 hs, la bomba se inició ~ 3 hs después de la adición de la enzima y se ejecutó durante 30 minutos. La bomba también se llevó a cabo durante 30 minutos a t = 29, 33, 47 y 49 hs. El tiempo total de sacarificación fue de 120 hs. En este momento, el hidrolizado contenía ~ 60 g/L de monómero de glucosa, 25 g/L de monómero de xilosa y 10 g/L de ácido acético.

Este hidrolizado se utilizó para la fermentación de las cepas ZW800 o ZW658 de *Zymomonas mobilis* (Núm. de ATCC PTA7858). ZW658 es una cepa de *Zymomonas mobilis* que se ha diseñado para la fermentación de xilosa a etanol. ZW658 se construyó por medio de la integración de dos operones, *P_{gap}xylAB* y *P_{gap}taltkt*, que contiene cuatro genes de utilización de xilosa que codifican la xilosa isomerasa, xiluloquinasa, transaldolasa y transcetolasa, en el genoma de ZW1 (Núm. de ATCC 31821) a través de eventos de transposición secuenciales, y seguido por la adaptación en medios selectivos que contienen xilosa. ZW800 es la cepa ZW658 con el gen que codifica la oxidorreductasa de glucosa-fructosa inactivada.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en fermentadores esterilizados de 1 litro (sistema BIOSTAT[®] B-DCU, Sartorius BBI System Inc., Bethlehem, Pennsylvania, EE.UU.) con 500 ml de volumen de trabajo inicial. Se añadió un inóculo al fermentador a un nivel de 10% (v/v) de manera tal que el OD₆₀₀ ~ 1 en el caldo después de la adición. EL hidrolizado estuvo presente en el 80% o 40% (v/v), y el resto como el agua. Se añadieron glucosa y xilosa adicionales para llevar las concentraciones finales en el caldo a 92 g/L y 82 g/L, respectivamente. El caldo también se complementó con sorbitol 10 mM y 1 g/l MgSO₄·7H₂O. La fermentación se llevó a cabo durante 72 hs a 33 °C, a un pH de 5,8 con 150 rpm de agitación. Las titulaciones finales de etanol para la cepa ZW800 fueron de 8 g/L en el hidrolizado de 40% y 7 g/L en el hidrolizado de 80%. Para la cepa ZW658, las titulaciones finales de etanol fueron de 8 g/l en el hidrolizado de 40% y 6,5 g/l en el hidrolizado de 80%.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de un producto de biomasa pretratada mejorado que comprende:
- a) proporcionar la biomasa;
 - b) pretratar dicha biomasa al poner en contacto dicha biomasa en condiciones adecuadas a una temperatura de 4 °C a 200 °C con una solución acuosa que comprende amoníaco para formar una mezcla de biomasa y amoníaco acuoso, en la que el amoníaco está presente en una concentración por lo menos suficiente para mantener el pH alcalino de la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso, pero en la que dicho amoníaco está presente en menos de 12 por ciento en peso con respecto al peso en seco de la biomasa, y además en la que el peso en seco de la biomasa se encuentra en una alta concentración de sólidos de por lo menos 15 por ciento en peso con respecto al peso de la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso por medio de lo cual se forma un producto de sólidos de biomasa pretratada y un licor de tratamiento previo de biomasa que comprende uno o más compuestos inhibidores; y
 - c) retirar dicho licor de tratamiento previo de biomasa;
- en el que el producto de sólidos de biomasa pretratada tiene una cantidad reducida de los compuestos inhibidores de ácido acético y acetamida y una reducción en el contenido de azúcar de no más que el 10%.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende la adición de un componente acuoso adicional en una o más de las siguientes maneras:
- i) antes del paso (b)
 - ii) como un componente adicional en el paso (b); o
 - iii) después del paso (b) como un paso de lavado.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el componente acuoso es vapor y se añade como un componente adicional en el paso (b) en el que el vapor se condensa en forma parcial durante el tratamiento previo para formar parte del licor de tratamiento previo de biomasa.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende el paso de sacarificación del producto de sólidos de biomasa pretratada para formar azúcares fermentables.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, que además comprende la fermentación de los azúcares de acuerdo con la reivindicación 5 para producir un producto químico blanco.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el pH de la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso es mayor que 8.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se aplica vacío a la biomasa antes de poner en contacto la biomasa con una solución acuosa que comprende amoníaco.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho peso en seco de la biomasa se encuentra en una alta concentración de sólidos de por lo menos 15% a 80% con respecto al peso de la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho amoníaco está presente en menos de 10 por ciento en peso con respecto al peso en seco de la biomasa.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la biomasa se deriva de múltiples materias primas.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el paso (b) se lleva a cabo durante un período de tiempo de hasta 25 horas.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 10 en el que el paso (b) se lleva a cabo durante un período de tiempo de hasta 8 horas.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 5 en el que dicho producto químico blanco se selecciona del grupo que consiste en metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, etilenglicol, propanodiol, butanodiol, glicerol, eritritol, xilitol, sorbitol, ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido butírico, ácido glucónico, ácido itacónico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido levulínico, ácido glutámico, ácido aspártico, metionina, lisina, glicina, arginina, treonina, fenilalanina, tirosina, metano, etileno, acetona, y enzimas industriales.