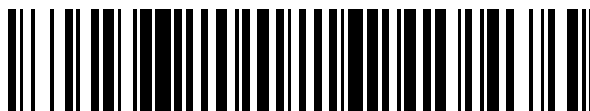


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 023**

51 Int. Cl.:

C13K 1/02 (2006.01)

C08H 8/00 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2008** **E 08836743 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014** **EP 2190883**

54 Título: **Método de tratamiento de la biomasa**

30 Prioridad:

22.08.2007 US 843142

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.02.2015

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:

**FRIEND, JULIE;
ELANDER, RICHARD, T.;
TUCKER III, MELVIN, P. y
LYONS, ROBERT, C.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 528 023 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

Método de tratamiento de la biomasa

Campo de la invención

- 5 Se proporciona un método de tratamiento de la biomasa que incluye un aparato especificado. El método que utiliza el aparato mueve la biomasa hacia y a través de un reactor en un estado no compactado, donde se lleva a cabo un método de tratamiento para impregnar y hacer reaccionar la biomasa con amoníaco acuoso diluido a temperatura y presión moderadas.

Antecedentes

- 10 Materias primas celulósicas y lignocelulósicas y desechos, tales como residuos agrícolas, madera, desechos forestales, pulpa de fabricación de papel y desechos sólidos municipales e industriales, proporcionan una materia prima renovable potencialmente importante para la producción de productos valiosos tales como combustibles y otros químicos. Materias primas y desechos celulósicos y lignocelulósicos, compuestos de polímeros de carbohidrato que comprenden celulosa, hemicelulosa, glucanos y lignina son tratados generalmente con una variedad de medios químicos, mecánicos y enzimáticos para liberar principalmente azúcares de hexosa y pentosa, que después pueden fermentarse para obtener productos útiles.

- 15 Primero, las materias primas de biomasa son tratadas para hacer que los polímeros de carbohidrato de materiales celulósicos y lignocelulósicos estén más fácilmente disponibles para enzimas de sacarificación, lo que a menudo se denomina pretratamiento. La biomasa pretratada se hidroliza entonces adicionalmente en 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 biomasa pretratada típicamente incluyen una o más glucosidasas, tales como glucosidasas que hidrolizan celulosa, glucosidasas que hidrolizan hemicelulosa y glucosidasas que hidrolizan almidón, así como peptidasas, lipasas, ligninasas y/o feruloil esterases. Enzimas de sacarificación y métodos para el tratamiento de la biomasa se reseñan en Lynd, L. R., et al. (Microbiol. Mol. Biol. Rev. (2002) 66:506- 577).

- 25 Es deseable tener un sistema y/o método para tratar la biomasa que sea efectivo y económico para su uso a gran escala. El tratamiento de biomasa como un material concentrado de alto peso seco es necesario para producir las altas concentraciones de azúcares fermentables necesarias para la fermentación a productos económicamente. Por lo tanto, el movimiento de material que incluye una fracción de alto peso seco de biomasa a través de un reactor mientras se mantiene la capacidad de químicos de tratamiento de penetrar y preparar óptimamente la biomasa para la sacarificación, además de utilizar una cantidad mínima de energía y químicos, es un desafío para los procesos de tratamiento de la biomasa. También se desea un método que incluya equipos de bajo costo de capital. Métodos que incluyen reactores sin ningún requisito de agitación o rotación de reactor pueden reducir los costos de capital por concepto de equipos y el consumo de energía.

- 35 Se han descrito sistemas que no requieren agitación o rotación del reactor y especifican medios para mover la biomasa a través de un reactor. El documento US4186658 divulga un aparato para transportar material particulado, tal como virutas de madera, paja, bagazo y otro material fibroso, que compacta el material para dejarlo en un estado sólido tipo "tapón". Un transportador helicoidal pre-compacta el material, con compactación adicional mediante un pistón alternativo. El tapón compactado es tan denso que es capaz de prevenir de manera efectiva un resoplado en el sistema. El tapón puede entonces ser alimentado a un medio para procesar el material. Un tapón denso de material de biomasa no sería accesible de manera óptima mediante reactivos de pretratamiento.

- 40 De manera similar, el documento US 6.416.621 divulga un aparato y proceso para el tratamiento de sólidos con gases líquidos presurizados que incluye utilizar un dispositivo de compactación para compactar el sólido relleno en un reactor de presión y expandir el sólido compactado con una expansión similar a una explosión en un tanque de expansión. El documento US 5.171.592 divulga tratar la biomasa utilizando tecnología de Explosión de fibra con amoníaco mejorada que también comprime la biomasa e incluye un paso para reducir rápidamente la presión de la biomasa para hacer explotar la biomasa.

- 45 El documento US4136207 divulga un proceso para preparar material celulósico con digestibilidad mejorada por rumiantes que comienza con compactar mecánicamente el material. Después se somete a una presión de vapor alta en ausencia de reactivos químicos y se compacta adicionalmente para formar un tapón sólido de biomasa que evita el escape de vapor a través de la entrada. Después se descargan pequeñas porciones del material, sometiéndolo a una rápida reducción de la presión. La compactación de biomasa en un tapón no permitiría una accesibilidad óptima por reactivos químicos utilizados en el pretratamiento.

- 50 El documento US6176176 divulga un aparato para tratar materiales celulósicos que utiliza un tornillo giratorio montado en un barril de un extrusor. Se alimenta amoníaco líquido bajo presión en el barril y se mezcla con material lignocelulósico en el barril, luego el material lignocelulósico que contiene el amoníaco se expande de manera explosiva por cambio de amoníaco líquido a un gas mientras sale del barril a través de un troquel calentado. El uso de un extrusor en un proceso comercial a gran escala sería muy costoso y de este modo no proporcionaría un

proceso económico.

Un método para tratar la biomasa para producir azúcares fermentables que utiliza amoníaco acuoso de baja fuerza para pretratar la biomasa de alta concentración se divulga en la solicitud de patente publicada de los Estados Unidos 2007/0031918.

- 5 Sigue existiendo la necesidad de un sistema y/o método para tratar la biomasa que mueva alto peso seco de biomasa a través de un reactor de bajo costo y que a la vez permita una máxima accesibilidad de reactivos químicos para preparar la biomasa para sacarificación.

Compendio de la invención

- 10 La presente invención proporciona métodos para tratar la biomasa antes de la sacarificación, biomasa pretratada producida mediante el presente método, así como hidrolizado que contiene azúcares fermentables producidos mediante sacarificación posterior de la biomasa pretratada. El método para tratar la biomasa comprende:

a) proporcionar:

(i) biomasa o

- 15 (ii) una mezcla de biomasa y una solución acuosa que comprende amoníaco, en donde el peso seco de la biomasa es al menos 15 por ciento en peso con respecto al peso total de la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso, y el amoníaco acuoso está en una cantidad que es menor que 12 por ciento en peso con respecto al peso seco de la biomasa;

b) cargar la biomasa de (a)(i) o una mezcla de (a)(ii) utilizando un alimentador de no compactación en un aparato que comprende;

- 20 i) un barril cilíndrico que tiene un primer extremo equipado con un pistón y un segundo extremo equipado con una válvula de descarga;

ii) opcionalmente, un desvío unido en un extremo desviado al barril cilíndrico cerca del primer extremo del barril cilíndrico, y que tiene una válvula sellable en el extremo desviado no unido;

iii) al menos 2 puertos sellables en el barril cilíndrico o en el desvío;

- 25 iv) opcionalmente, una válvula en el barril cilíndrico que divide el barril en una primera y segunda cámaras separadas, teniendo dicha primera cámara el primer extremo del barril equipado con dicho pistón, y teniendo dicha segunda cámara el segundo extremo del barril con la válvula de descarga; y

v) un tanque de venteo unido a la válvula de descarga en el segundo extremo del barril;

- 30 en donde dicha biomasa de (a)(i) se carga en el barril cilíndrico u opcionalmente en dicho desvío unido a dicho barril cilíndrico, o la válvula está presente en dicho barril cilíndrico y dicha biomasa de (a)(ii) se carga en dicha primera cámara u opcionalmente en dicho desvío unido a dicho barril cilíndrico.

c) cerrar dicho barril cilíndrico y desvío, si están presentes.

d) opcionalmente aplicar vacío a través de al menos un puerto en el barril cilíndrico;

- 35 e) agregar a través de dicho al menos un puerto en el barril cilíndrico o desvío, si estuviese presente, a la biomasa de (a)(i) una solución acuosa que comprende amoníaco en una cantidad que es menor que 12 por ciento en peso con respecto al peso seco de la biomasa en el barril, creando una mezcla de biomasa y amoníaco acuoso, y en donde además el peso seco de la biomasa está en una concentración de sólidos alta de al menos 15 por ciento en peso con respecto al peso de la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso, y agregar a esta mezcla o la mezcla cargada de (a)(ii) vapor a través de al menos un puerto en el barril cilíndrico o desvío, si estuviese presente, para 40 alcanzar una temperatura dentro del barril que se encuentra entre 85°C y 180°C;

f) cerrar los puertos en el barril cilíndrico o primera cámara y desvío, si están presentes, para proporcionar una cámara impermeable;

g) mantener la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso en la cámara impermeable a una temperatura adecuada durante un tiempo que es de entre 30 segundos y 4 horas;

- 45 h) opcionalmente mover la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso a una segunda cámara en el barril cilíndrico, si estuviese presente, mediante el desplazamiento a través de una válvula abierta con dicho pistón en donde la biomasa no está compactada y, opcionalmente, cerrar la válvula abierta para formar una segunda cámara impermeable y mantener la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso durante un tiempo que es de entre 2 minutos y 4 horas; e

i) mover la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso con dicho pistón a través del barril cilíndrico impermeable de (g) o (h) a través de la válvula de descarga sin compactarse en el tanque de venteo;

en donde la biomasa no está compactada y se produce la biomasa tratada.

- 5 Biomasa se refiere a cualquier material celulósico y/o lignocelulósico que puede incluir cultivos de bioenergía, residuos agrícolas, desechos sólidos municipales, desechos sólidos industriales, desechos de jardín, madera, desechos forestales o combinaciones de los mismos. Puede aplicarse energía a la biomasa antes de (a) para reducir el tamaño, aumentar el área de superficie expuesta y/o aumentar la accesibilidad de celulosa, hemicelulosa y/u oligosacáridos presentes en la biomasa.

Breve descripción de los dibujos

- 10 La Figura 1 es un dibujo esquemático de una realización de un aparato para su uso en la presente invención.
- La Figura 2 es un dibujo esquemático de una segunda realización de un aparato para su uso en la presente invención.
- La Figura 3 es un dibujo esquemático de una realización de un venturi de expansión gradual utilizado como una válvula de descarga, con la válvula cerrada.
- 15 La Figura 4 es un dibujo esquemático de la realización del venturi de expansión gradual de la Figura 3, con la válvula abierta.
- La Figura 5 es un dibujo esquemático de una realización de un venturi de expansión gradual de válvula de puerto V.
- La Figura 6 es un dibujo esquemático de una realización de un venturi de expansión gradual de válvula de retención de clapeta, con la válvula cerrada en A y abierta en B.

20 Descripción detallada

- Cuando una cantidad, concentración u otro valor o parámetro se proporciona ya sea como un rango, rango preferido o una lista de valores preferibles superiores y valores preferibles inferiores, debe comprenderse que se divulgan específicamente todos los rangos formados de cualquier par de cualquier límite de rango superior o valor preferido y cualquier límite de rango inferior o valor preferido, independientemente de si los rangos se divulgan separadamente.
- 25 Cuando se establece en la presente un rango de valores numéricos, a menos que se indique lo contrario, el rango pretende incluir los parámetros del mismo y todos los números enteros y fracciones dentro del rango. No se pretende que el alcance de la invención esté limitado a los valores específicos establecidos cuando se define un rango.
- La presente invención proporciona métodos para el tratamiento de biomasa para prepararla para someterla a sacarificación para producir azúcares fermentables. Los azúcares pueden estar fermentados para producir productos valiosos tales como combustibles y otros químicos. A través de los pasos de pretratamiento, sacarificación y fermentación, la biomasa renovable, incluyendo biomasa de desechos, puede utilizarse para producir químicos valiosos que pueden disminuir la necesidad de aceite.
- 30

Definiciones:

En la presente divulgación se utilizan diferentes términos. Se proporcionan las siguientes definiciones:

- 35 "Biomasa" se refiere a cualquier material celulósico o lignocelulósico e incluye materiales que comprenden celulosa y opcionalmente que comprenden, además, hemicelulosa, lignina, almidón, oligosacáridos y/o monosacáridos. La biomasa puede comprender, además, componentes adicionales, tales como proteína y/o lípido. De acuerdo con la invención, la biomasa puede derivar de una única fuente o la biomasa puede comprender una mezcla derivada de más de una fuente; por ejemplo, la biomasa puede comprender una mezcla de mazorcas de maíz y forraje de maíz o
- 40 fibra, o una mezcla de pasto y hojas. La biomasa incluye, a modo no taxativo, cultivos de bioenergía, residuos agrícolas, desechos sólidos municipales, desechos sólidos industriales, pulpa de fabricación de papel, desechos de jardín, madera y desechos forestales. Ejemplos de biomasa incluyen, a modo no taxativo, grano de maíz, mazorcas de maíz, residuos de maíz tales como chalas de maíz, forraje de maíz, fibra de maíz, céspedes, trigo, paja de trigo, heno, paja de arroz, pasto varilla, papel de desecho, bagazo de caña de azúcar, tallos de sorgo, cáscaras de soja,
- 45 componentes obtenidos de la molienda de granos, árboles, ramas, raíces, hojas, virutas de madera, aserrín, arbustos, vegetales, frutas, flores y abono de animal rumiante. En una realización, la biomasa que es útil para la invención incluye la biomasa que tiene un valor de carbohidrato relativamente alto, es relativamente densa y/o relativamente fácil de recoger, transportar, almacenar y/o manipular. En una realización de la invención, la biomasa que es útil incluye mazorcas de maíz, forraje de maíz, fibra de maíz y bagazo de caña de azúcar.
- 50 La expresión "azúcar fermentable" o "azúcares" se refiere a oligosacáridos y monosacáridos que pueden fermentarse fácilmente y convertirse en químicos objetivo.

El término "lignocelulósico" se refiere al material que comprende lignina y celulosa. El material lignocelulósico

también puede comprender hemicelulosa.

El término "celulósico" se refiere a material que comprende celulosa.

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

"Peso seco" de biomasa significa el peso de la biomasa de la que se ha retirado toda o esencialmente toda el agua.

5 El peso seco se mide típicamente de acuerdo con el estándar E1756-01 (Método de ensayo estándar para la determinación de sólidos totales en biomasa) de la Sociedad Estadounidense para Ensayos y Materiales (ASTM) o el estándar T-412 om-02 (Humedad en pulpa, papel y cartón) de la Asociación Técnica de la Industria de la Pasta y el Papel (TAPPI).

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

El término "tratamiento" se refiere a un proceso de un reactivo que actúa sobre un material en donde las propiedades físicas y/o químicas del material están alteradas.

15 El término "reactivo" se refiere a una composición que es capaz de alterar las propiedades físicas y/o químicas de un material objetivo en condiciones utilizadas en un proceso de tratamiento.

20 Un "grupo de enzimas" para la sacarificación es una combinación de enzimas que son capaces de actuar sobre una mezcla de biomasa para producir azúcares fermentables. Típicamente, un grupo de enzimas de sacarificación puede comprender una o más glucosidasas; las glucosidasas pueden seleccionarse del grupo que consiste en glucosidasas que hidrolizan celulosa, glucosidasas que hidrolizan hemicelulosa y glucosidasas que hidrolizan almidón. Otras enzimas en el grupo de enzimas de sacarificación pueden incluir peptidasas, lipasas, ligninasas y feruloil esterasas.

25 Los términos "tratar" y "pretratar" con respecto a la biomasa están relacionados de la siguiente forma. La biomasa se trata con reactivo para formar un producto de biomasa tratado, que también puede denominarse tratamiento para formar biomasa pretratada o se pretratamiento para formar biomasa pretratada. El uso de "pre" distingue el tratamiento de biomasa que es anterior a la sacarificación de biomasa.

Métodos de tratamiento de biomasa

30 Un método para tratar la biomasa para producir azúcares fermentables que incluye el uso de amoníaco acuoso de baja fuerza para pretratar la biomasa de alta concentración se divulga en la solicitud de patente de los Estados Unidos publicada 2007/0031918. Los solicitantes han desarrollado un nuevo método para tratar de manera eficiente la biomasa utilizando amoníaco acuoso de baja fuerza y condiciones de alta concentración de biomasa. Los solicitantes encontraron el presente método sorprendentemente exitoso debido al aspecto de evitar compactar la biomasa en cualquier etapa y de este modo permitir un mejor acceso de reactivos de tratamiento a la biomasa con respecto al que ocurre en un sistema que incluye la compactación de biomasa. En sistemas en los que la biomasa es compactada, la biomasa puede descompactarse para obtener una reacción mejorada con reactivos de tratamiento, pero esto requiere un alto consumo de energía y de este modo aumenta el costo del sistema. En el método de la presente invención, el paso o proceso de descompactación no es necesario.

40 Para reducir el costo para el tratamiento de biomasa a gran escala se ha desarrollado el presente método, en el cual la biomasa se agrega a un aparato estacionario sin compactación y se mueve a través del aparato sin compactación. Al mantener la biomasa en un estado no compactado, los poros y canales naturales del material de biomasa no se aplastan. Los reactivos de tratamiento utilizados en el presente método incluyen amoníaco acuoso y vapor. Estos reactivos son capaces de penetrar a través de los poros y canales de la biomasa naturales no compactados, proporcionando efectos rápidos y completos sobre el material celulósico o lignocelulósico de la biomasa. Este método de tratamiento es altamente efectivo para producir biomasa tratada que se somete a sacarificación efectiva para producir azúcares fermentables, de modo que conduce a una alta conversión de carbohidratos de biomasa a azúcares despolimerizados por dosificación de enzimas y tiempo de reacción.

45 Los presentes métodos del tratamiento de la biomasa pueden comprenderse mejor haciendo referencia a los dibujos esquemáticos en las Figuras 1 y 2, que muestran dos realizaciones de un aparato tipo pistón/barril, y la siguiente descripción del uso del aparato en los presentes métodos de tratamiento. Estos dibujos se simplifican para clarificar la ilustración, donde algunos elementos, tales como las bridas que se muestran en las Figuras 3 y 4, son omitidos. El aparato en la Figura 1 es un reactor a escala de prueba. Comprende una cámara cilíndrica horizontal (10) con un primer extremo abierto para agregar biomasa (11) que se sella entonces luego cargando la biomasa mediante la inserción de un tapón móvil (12) que se utiliza como un tipo de pistón. La cámara cilíndrica tiene un primer puerto sellable (13) para agregar la solución acuosa que comprende amoníaco, un segundo puerto sellable (14) para agregar vapor a la biomasa en la cámara cilíndrica y un tercer puerto (15) para aplicar un vacío. El vapor se inyecta para aumentar la temperatura de la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso para una reacción de tratamiento. Una camisa de aislamiento (16) cubre la cámara cilíndrica.

Luego de la carga de la biomasa, la aplicación de vacío y la adición de solución acuosa que comprende amoníaco y vapor, los puertos (13, 14 y 15) se sellan y se mantiene una temperatura deseada. Luego de un periodo de tiempo, una válvula de descarga previamente cerrada (17) se abre en el segundo extremo del cilindro (18) moviendo el eje de la válvula (19). El eje de la válvula se extiende a través de un agujero en un codo de separación interno dirigido hacia abajo (20) en un tanque de venteo (21) adyacente y a través de una prensaestopa (22) sobre el lado lejano del tanque de venteo a un accionador (23). La mezcla de biomasa y amoníaco acuoso se empuja a través de la válvula de descarga (17) moviendo el tapón en el primer extremo de barril cilíndrico hacia el segundo extremo. La biomasa pasa a través de la válvula de descarga y hacia el tanque de venteo (21) a través del codo (20). Una cubierta (24) sobre una abertura en el fondo del tanque de venteo permite el acceso a la biomasa pretratada. Un puerto (25) en la parte superior del tanque de venteo permite la salida de vapores y está conectado a través de un tubo (26) a un condensador (27).

Una descripción adicional de una realización del aparato de la Figura 1 y su uso en los presentes métodos de tratamiento en los Ejemplos en la presente invención es el siguiente. El reactor del pistón del barril consistió en un barril de acero inoxidable de 5,1 cm x 68,6 cm equipado con un pistón, orientado horizontalmente. El pistón se selló al barril con cuatro anillos O y se presurizó con nitrógeno (hasta aproximadamente 5600 kPa) en la parte posterior del pistón durante la carrera de descarga. El barril de 68,6 cm se equipó con ocho puertos de múltiples usos, 4 en cada una de la superficie superior e inferior, permitiendo la aplicación de vacío, inyección de amoníaco acuoso, inyección de vapor e inserción de termopares para la medición de temperatura dentro del barril. El barril del reactor se equipó con una camisa de vapor para un calentamiento uniforme del barril. El barril del reactor se unió directamente a un tanque de venteo de acero inoxidable de 15,2 cm x 61 cm, orientado verticalmente. El barril se aisló del tanque de venteo mediante una boquilla cónica y arreglo de válvula de corte terminal de asiento. El diámetro del troquel de corte de la válvula terminal fue 3,5 cm. La presión de retroceso en la boquilla cónica y asiento era ajustable, con la mayoría de las pruebas realizadas utilizando -138 kPa (presión manométrica) de presión de retroceso en un cilindro de aire de 10,2 cm de diámetro conectado al cono de la válvula de corte terminal. El cono de la válvula de corte terminal se podía mover hacia atrás hasta 1,6 cm para permitir la descarga de partículas en el tanque de venteo. Un codo en la salida de la válvula de corte terminal dirigió los sólidos tratados hacia el fondo del tanque de venteo donde los sólidos se retiran fácilmente destornillando una brida terminal abovedada en el fondo del tanque. Una brida abovedada superior al tanque de venteo incorporó un montaje de salida especial con ranuras mecanizadas en ángulos rectos al eje del tanque de venteo, lo que hizo que los vapores liberados se desplazaran alrededor de una ruta en una esquina a un montaje de descarga, ayudando a prevenir arrastres de partículas de biomasa atrapada y gotitas de agua hacia un condensador de ventilación. Se agregaron tres calentadores de banda eléctricos (configurados a 60°C) y aislamiento a lo largo del tanque de venteo para permitir que sólidos tratados calientes se dirijan hacia un recipiente caliente, simulando mejor un proceso a escala comercial.

En otra realización, un reactor de pistón de barril pequeño se construyó como se describió anteriormente, excepto que tenía un barril de 45,7 cm, sin camisa de vapor, tres calentadores de banda eléctricos, una placa de fibra de vidrio de 2,5 cm de espesor cubierta con una camisa de fibra de vidrio impregnada de silicona como aislamiento, y tres puertos de múltiples usos. Otras características, incluidos el tanque de venteo, la válvula de corte y el codo, fueron como se describió para el reactor de pistón de barril grande.

El aparato en la Figura 2 es un diseño de reactor a escala comercial. Comprende un barril cilíndrico horizontal equipado con un pistón (34) en el primer extremo (33) y una válvula de descarga (40) en el segundo extremo (41). El barril se aísla y tiene paredes impermeables. Un desvío (31) está unido cerca del primer extremo y una válvula (35), que es una válvula alimentadora, está ubicada en el extremo no unido del desvío. Una tolva (30) está unida al extremo de la válvula del desvío. La biomasa se agrega a través de la tolva. Puede haber medios que inducen un flujo sin compactación para controlar la adición de biomasa desde la tolva (30) al desvío (31). El desvío tiene un primer puerto sellable (36) y un segundo puerto sellable (37) para agregar amoníaco acuoso y vapor a la biomasa en el desvío mientras se mueve hacia el barril cilíndrico. Una segunda válvula (38) separa el barril en una primera cámara cilíndrica (32) y una segunda cámara cilíndrica (39). La mezcla de biomasa y amoníaco acuoso pasa a través del desvío hacia la primera cámara donde una temperatura y presión deseadas se alcanzan mediante la adición de vapor. El movimiento del pistón a través del barril impermeable empuja la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso desde la primera cámara hacia la segunda cámara, a través de la segunda válvula abierta (38) y desplazando el contenido en la segunda cámara (39) a través de la válvula de descarga abierta (40) hacia un tanque de venteo (42). El contenido de la segunda cámara es una mezcla de biomasa y amoníaco acuoso que se movió previamente hacia esta cámara y se mantiene mientras sea necesario para la reacción de tratamiento en las condiciones utilizadas. La segunda válvula (38) se cierra entonces y el pistón (34) se retrae de modo de preparar la primera cámara cilíndrica (32) para que se recargue y el ciclo de proceso se repita. En el tanque de venteo (42), la biomasa se mueve a través de un codo dirigido hacia abajo (43). Una cubierta (44) sobre una abertura en el fondo del tanque de venteo permite acceso a la biomasa pretratada. Un puerto (45) en la parte superior del tanque de venteo permite la salida de vapores de amoníaco y está conectado a través de un tubo (46) a un condensador (47).

El aparato puede construirse utilizando acero al carbono o acero inoxidable. El barril cilíndrico puede estar horizontal como se representa en las Figuras 1 y 2 o puede estar vertical. Con un barril vertical, el desvío y la tolva como se muestran en la Figura 2 se reconfigurarían para permitir la carga de biomasa en la cámara del barril, tal como a un ángulo de menos de 90 grados. Un experto en la técnica sería capaz de configurar fácilmente el aparato con un

barril vertical. Por ejemplo, el barril vertical puede estar ubicado sobre el tanque de venteo y puede estar conectado sin un codo que dirija el flujo hacia abajo, ya que el flujo a través de la válvula de descarga ya sería dirigido hacia abajo. Está también dentro de la capacidad del experto en la técnica orientar el tanque de venteo en un modo vertical u horizontal. Un tanque vertical es más adecuado en los presentes métodos con tratamiento de amoníaco para facilitar la eliminación y captura de gas de amoníaco liberado en el tanque de venteo.

Las dos realizaciones de las Figuras 1 y 2 funcionan de manera similar, ya que la biomasa se agrega y mueve a través de los reactores sin compactación.

La realización de la Figura 1, con una cámara, es un sistema de lotes para procesar una muestra de biomasa a la vez. La realización de la Figura 2, con dos cámaras que están separadas por una válvula, permite una operación semi-continua o de lote alimentado en donde múltiples cargas de biomasa se procesan simultáneamente. En esta segunda realización, cada ciclo de desplazamiento de pistón, donde cada carga sucesiva de biomasa ingresa a la segunda cámara, está acompañado por la descarga del volumen correspondiente a través del orificio de descarga una vez que la segunda cámara está completamente cargada. El número de ciclos de desplazamiento de pistón en la segunda cámara a la vez, y por lo tanto el tamaño de la segunda cámara, está relacionado con el tiempo de residencia requerido para cada muestra de biomasa. El tiempo de residencia se describe más adelante en relación con la temperatura y el tiempo para el tratamiento en los presentes métodos.

Los presentes métodos son particularmente apropiados para el tratamiento de biomasa a un peso seco alto de biomasa con respecto al peso de la mezcla de biomasa, amoníaco acuoso y vapor de la reacción de tratamiento. Es deseable tratar la biomasa en una concentración de peso seco alta para proporcionar una biomasa que producirá un hidrolizado de concentración de azúcares alta luego de la sacarificación. Las características del presente método que hacen que la biomasa no esté compactada permiten un tratamiento efectivo de una concentración de peso seco alto de biomasa. El peso seco inicial de biomasa utilizado en los presentes métodos es al menos 15% del peso total de la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso. Más típicamente, el peso seco de la biomasa es al menos 20%, y puede ser al menos 30%, 45%, 50% o más. El peso seco porcentual de biomasa puede variar y el porcentaje óptimo puede ser diferente para tipos diferentes de biomasa. Por ejemplo, una biomasa de al menos 24% es deseada cuando se utiliza mazorca de maíz para proporcionar biomasa pretratada que se sacarifica para producir azúcares fermentables suficientemente concentrados para la fermentación económica a etanol. Más adecuada es la biomasa de mazorca de maíz que es al menos 30%. El peso seco porcentual preferido de un tipo particular de biomasa para su uso en los presentes métodos para producir un hidrolizado de azúcares alto se determina fácilmente por un experto en la técnica.

La biomasa puede utilizarse directamente tal como se obtiene de una fuente o puede aplicarse energía a la biomasa para reducir el tamaño, aumentar el área superficial expuesta y/o aumentar la disponibilidad de celulosa, hemicelulosa y/u oligosacáridos presentes en la biomasa. Medios de energía útiles a estos efectos incluyen aquellos que no aplastan ni compactan la biomasa, de modo que la ultraestructura de la biomasa no se destruye. Por ejemplo, la biomasa puede desmenuzarse, cortarse o astillarse. También puede utilizarse una trituradora de mandíbula cuando se utiliza de modo que corte la biomasa sin aplastar la ultraestructura. Un refinador de disco dentado también es útil para reducir el tamaño de la biomasa antes del pretratamiento en los presentes métodos.

En los presentes métodos de tratamiento, la biomasa se mueve en un barril cilíndrico utilizando un alimentador de no compactación. En el caso más simple un alimentador de no compactación se refiere a cargar biomasa a mano en un primer extremo abierto del barril cilíndrico. Si existen dos cámaras en el barril, la carga se realiza en la primera cámara. Este método se describe en ejemplos en la presente utilizando un reactor como se establece en la Figura 1. El alimentador de no compactación ejemplificado en el reactor de la Figura 2 es una tolva. La tolva puede ser auto-descargable y/o puede estar equipada con un dispositivo de inducción de flujo que no proporciona una fuerza de compactación. Por ejemplo, pueden utilizarse varios tipos de inductores de flujo de tolva con fondo de descarga seguidos por transportadoras que miden el flujo, tales como varios tipos de cadenas de arrastre, elevadores de cangilones o hélices giratorias (tales como dispositivos Acrison®). La cantidad de biomasa cargada en la primera cámara cilíndrica está limitada de modo que se permite espacio para la expansión de la biomasa, que puede ocurrir tras la adición de amoníaco acuoso y vapor.

Puede aplicarse vacío al barril cilíndrico que contiene biomasa. Si hay dos cámaras en el barril, el vacío se aplica a la primera cámara que contiene biomasa. Típicamente, si se aplica, el vacío reduce la presión a menos de 20 kPa. Una solución acuosa que comprende amoníaco se agrega a través de uno o más puertos en el barril cilíndrico, o su desvío, en una cantidad de modo que el amoníaco es menor que 12 por ciento en peso con respecto al peso seco de la biomasa en la cámara. Es más adecuado utilizar más de un puerto, estando los puertos distribuidos de modo que el contacto de la solución de amoníaco se distribuye básicamente de manera uniforme a la biomasa. Si hay dos cámaras en el barril, la solución de amoníaco se agrega a la primera cámara que contiene biomasa. También es más adecuado que el amoníaco esté en una cantidad que sea de entre 4% y 6% con respecto al peso seco de la biomasa en la cámara. La solución de amoníaco puede precalentarse, lo que contribuirá a aumentar la temperatura de la biomasa. En una realización alternativa, la solución de amoníaco acuoso se mezcla con la biomasa antes de cargarla en la primera cámara cilíndrica. La biomasa y el amoníaco acuoso pueden mezclarse en un recipiente que se alimenta en la primera cámara cilíndrica. Por ejemplo, el amoníaco acuoso puede bombearse a través de un calentador en línea y en un mezclador de paletas que contiene biomasa. La mezcla de biomasa y amoníaco acuoso

se alimentan entonces en la primera cámara cilíndrica, donde se inyecta vapor después de cerrar la cámara. Alternativamente, la biomasa, el amoníaco y el vapor pueden premezclarse y agregarse a la primera cámara cilíndrica. A las temperaturas y presiones descritas a continuación, la mayoría del amoníaco acuoso se evaporará y convertirá en vapor que penetra la biomasa que está siendo pretratada. Además, el vapor de amoníaco húmedo reciclado que se recoge del tanque de venteo puede inyectarse para formar parte del amoníaco agregado total.

En el presente método, la solución acuosa que comprende amoníaco puede comprender opcionalmente al menos una base adicional, tal como hidróxido de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de potasio y carbonato de potasio. Al menos una base adicional puede agregarse a hasta 10 por ciento en peso con respecto al peso seco de la biomasa. Una base adicional puede utilizarse, por ejemplo, para neutralizar ácidos en la biomasa, para proporcionar iones metálicos para las enzimas de sacarificación o para proporcionar iones metálicos para el medio de crecimiento de fermentación.

Dado que la biomasa no está compactada en el presente método, no puede bloquear el pasaje de vapor como ocurre en los sistemas con biomasa compactada. Por lo tanto, la cámara a la cual se agrega vapor se cierra antes de la inyección de vapor. Los puertos, menos uno o más a través de los cuales se agrega el vapor, se sellan. El pistón terminal, o tapón que sirve como un pistón, del primer barril se coloca en su lugar y las válvulas se cierran. Las válvulas utilizadas pueden ser cualquier tipo abierto o cerrado de válvula, tal como válvulas de elevación o válvulas de guillotina giratorias.

El vapor se agrega a través de uno o más puertos en el barril cilíndrico, o el desvío, en una cantidad que es necesaria para aumentar la temperatura de la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso al punto deseado. Si hay dos cámaras en el barril, el vapor se agrega a la primera cámara que contiene biomasa. Es más adecuado utilizar más de un puerto, estando los puertos separados de modo que el contacto de vapor se distribuya sobre la biomasa. El vapor se agrega para aumentar la temperatura de la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso a entre 85°C y 180°C. Puede agregarse vapor adicional a través de un puerto en la segunda cámara cilíndrica cuando está presente, si se necesita para mantener la temperatura deseada. El aparato puede incluir una camisa de calentamiento, camisa de vapor, calentadores de banda o camisa de aislamiento para contribuir a aumentar y/o mantener la temperatura. Las camisas de calentamiento o vapor son particularmente adecuadas para reactores a pequeña escala, mientras que las camisas de aislamiento son adecuadas para reactores a gran escala. El calentamiento puede ocurrir en diferentes etapas, incluyendo el precalentar el barril antes del tratamiento o pretratamiento.

A temperaturas por debajo de 85°C, el tiempo requerido para el tratamiento con amoníaco acuoso de baja fuerza sería prohibitivamente largo. El tiempo necesario para el tratamiento disminuye a medida que la temperatura aumenta. Por ejemplo, el tratamiento a 85°C puede ser para entre dos y cuatro horas, mientras que el tratamiento a 180°C puede ser sólo un par de minutos. La función del ciclo de alimentación por lotes como se utiliza en el reactor de la Figura 2 requiere un tiempo adecuado para múltiples cargas. Es por lo tanto deseable elegir una combinación de tiempo y temperatura que tenga un tiempo limitado, que sea lo suficientemente largo como para la función de la realización de reactor utilizada, pero a la vez una temperatura moderada para proporcionar un proceso económico. Con temperaturas moderadas puede utilizarse vapor a menor presión, que tiene un menor costo. Condiciones más adecuadas son el tratamiento a entre 120°C y 160°C durante entre 60 minutos y 5 minutos, disminuyendo el tiempo a medida que la temperatura aumenta. Condiciones particularmente adecuadas son el tratamiento a entre 140°C y 150°C durante entre 30 minutos y 10 minutos, disminuyendo el tiempo a medida que la temperatura aumenta. El tipo de biomasa que está siendo pretratada también puede afectar el tiempo y la temperatura óptimos para el tratamiento en el presente método, como puede evaluar fácilmente un experto en la técnica.

El tiempo que la biomasa se mantiene a la temperatura deseada dentro de la cámara del reactor es el tiempo de residencia. Cuando se utiliza un reactor con sólo una primera cámara, el tiempo de residencia ocurre en la primera cámara. Cuando se utiliza un reactor con una primera cámara y una segunda cámara, el tiempo en la primera cámara puede ser sólo lo suficientemente prolongado como para combinar la biomasa con reactivos antes de mover la mezcla a la segunda cámara, habiendo un tiempo de residencia en la segunda cámara. En este caso, el tiempo en la primera cámara puede ser de apenas 30 segundos y el tiempo en la segunda cámara puede ser de entre 2 minutos y 4 horas.

Llevar la biomasa a las temperaturas descritas utilizando vapor en los presentes métodos resulta en presiones dentro de la cámara del reactor que son de entre 60 kPa y 750 kPa. Más típicamente, la presión es de entre 300 kPa y 600 kPa. Estas son presiones relativamente bajas con respecto a otros métodos de pretratamiento conocidos, tales como el método AFEX descrito en el documento US 5037663, donde se utilizan presiones de 1150 kPa a 4250 kPa, o métodos que utilizan una pistola de vapor como se describe en el documento US 4461648, donde presiones de 1800 kPa a 5600 kPa se presentan en la Figura 1 en el mismo. El funcionamiento de los presentes métodos a las presiones más moderadas proporciona un sistema de menor costo, ya que puede utilizarse vapor a presión más baja.

En los presentes métodos, la biomasa se mueve a través de la primera cámara y, si está presente, la segunda cámara, sin compactación. Esto puede lograrse utilizando un pistón y una cámara de cilindro impermeable. A los efectos de la presente divulgación, un pistón puede incluir cualquier artículo que puede utilizarse como un pistón, tal como un tapón que se empuja en la cámara, así como cualquier tipo de pistón estándar. El tapón de un tipo de

reactor como se ejemplifica en la Figura 1 puede empujarse hacia la cámara utilizando cualquier método que aplica presión adecuada para mover la biomasa. Un método particularmente adecuado consiste en proporcionar un cierre estático en el extremo de la cámara después de insertar el tapón, tal como una cabeza de cilindro atornillada, luego introducir nitrógeno entre el cierre y el tapón para acumular presión y mover el tapón. El tapón puede moverse por otros medios, tal como utilizando una varilla de empuje conectada a un neumático hidráulico, o accionador eléctrico.

El barril del aparato es impenetrable (con todos los puertos y válvulas cerrados) ya que no hay penetraciones de pared no selladas, de modo que el líquido no sale del barril. La retención de líquido permite al pistón mover la biomasa sin compactarla. El líquido en los presentes métodos de tratamiento es limitado y el que hay puede servir para lubricar las paredes de la cámara para permitir un flujo de no compactación en respuesta a la presión del pistón. De hecho, la presión del pistón puede apretar levemente la biomasa temporalmente, como con una esponja, sin ser apretada lo suficiente como para que los poros de la biomasa y los canales colapsen. Tras retirar la presión del pistón, la biomasa puede reabsorber el líquido en los poros y canales que no se han aplastado. Para ayudar al flujo de biomasa, un líquido de lubricación, tal como jabón de aceite vegetal, puede introducirse en la cámara. El flujo puede mejorarse mediante el estriado de la pared de la cámara interna, en donde agregar discontinuidades tales como surcos en ángulo puede reducir la fricción, reduciendo así el estrés de rendimiento y mejorando el flujo de biomasa. El movimiento de la biomasa sin compactación mantiene los poros rellenos de líquido hinchados generados por el tratamiento, lo que mejora la posterior sacarificación.

En los presentes métodos, luego del tratamiento durante el tiempo deseado a una temperatura deseada, la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso se mueve a través de una válvula de descarga en el extremo del barril cilíndrico hacia un tanque de venteo. La válvula de descarga se cierra durante la reacción de la biomasa con amoníaco acuoso a la temperatura deseada, luego se abre para el pasaje de la biomasa. En un reactor de doble cámara, como se ejemplifica en la Figura 2, la válvula de descarga se abre en sincronía con la apertura de la válvula entre la primera y la segunda cámara, después de que el pistón ha acumulado presión en la primera cámara para desplazar la totalidad del contenido de la segunda cámara por el volumen del contenido de la primera cámara.

Las válvulas de descarga que pueden utilizarse se ejemplifican mediante válvulas de puerto V giratorias, válvulas de retención de clapeta y válvulas de descarga de elevación. Particularmente útil en un reactor de menor escala, como se ejemplifica en la Figura 1, es una válvula de descarga tipo de elevación operada por pistón, donde el lado corriente arriba cementado del asiento de la válvula es el orificio de descarga y el lado corriente abajo más blando del asiento de la válvula se sella contra un émbolo de válvula cementada, con el área de flujo aumentando continuamente más allá del asiento de válvula cuando el émbolo de válvula se retrae para abrirse.

De manera más adecuada, la válvula de descarga tipo de elevación incorporaría un venturi de expansión gradual. Una realización de una válvula de elevación de venturi de expansión gradual, que es adecuada para un reactor a pequeña escala como se ejemplifica en la Figura 1, se diagrama en la Figura 3. Esta válvula incorpora una boquilla cónica y un arreglo de válvula de corte terminal de asiento. Para evitar la obstrucción, el venturi de expansión gradual como se ejemplifica en la Figura 3 (posición cerrada) y la Figura 4 (posición abierta) se diseñó para acelerar los sólidos a través de una brecha, aumentando de forma constante entre el cono externo estacionario del venturi (50) y el cono interno móvil del venturi (51) que se monta sobre el extremo de un eje de válvula (52). El cono externo del venturi es una forma similar a un venturi generalmente toroidal sujeta entre una brida (53) en la salida de la cámara del reactor (54; equivalente a 10 en la Figura 1) y una brida de entrada del tanque de venteo (55). El cono interno del venturi (51) es la nariz en el extremo del eje de válvula de salida del reactor (52). El cono dentro del venturi y el eje de la válvula se encuentran en el codo de descarga (56; equivalente a 20 en la Figura 1) que se encuentra dentro del tanque de venteo (57; equivalente a 21 en la Figura 1). El eje de la válvula está unido a un accionador (58) para el control del movimiento. El accionador puede ser cualquier dispositivo que sea capaz de mover el eje de la válvula hacia atrás y hacia adelante en un movimiento horizontal, tal como un motor eléctrico, neumático o hidráulico, accionador de válvula neumático o pistón hidráulico. Cuando el eje de la válvula se encuentra en su posición más hacia la izquierda, el borde externo del cono interno se apoya sobre el borde interno del cono externo para sellar el extremo de descarga del reactor durante el tratamiento. Cuando es tiempo de descargar el reactor, el eje de válvula se mueve a la derecha para proporcionar el tamaño de abertura que se desea para el venturi de evaporación súbita.

Este diseño proporciona una zona de evaporación súbita de una longitud que se expande sin problemas en la dirección del flujo. En este diseño, los sólidos de biomasa se aceleran bajo el eje del cono anular de abertura gradual, lo que evita permitir una expansión radial repentina que conduce a una obstrucción.

Otra realización de un venturi de expansión gradual, que es adecuado para una válvula de descarga particularmente en un reactor a gran escala como se ejemplifica en la Figura 2, se diagrama en la Figura 5. Esta es una realización de una llave de paso de puerto V donde la expansión del venturi de evaporación súbita se mecaniza en el cuerpo de la válvula. Dentro del cuerpo estacionario del venturi de evaporación súbita (70) existe un estrechamiento (71) desde el extremo de salida de la cámara de reacción (72) y una expansión (73) a la entrada al tanque de venteo (74). En el núcleo giratorio (75) de la llave de paso se encuentra una abertura en ángulo (76) que se alinea con el estrechamiento de la cámara del reactor (71) y la expansión al tanque de venteo (73) cuando está en la posición abierta. El núcleo giratorio (75) se gira la mitad de una rotación completa para bloquear la alineación de la llave de paso que cierra la válvula.

Una realización adicional de un venturi de expansión gradual que es adecuado para una válvula de descarga, particularmente en un reactor a gran escala como se ejemplifica en la Figura 2, se diagrama en la Figura 6. Esta es una realización de una válvula de retención de clapeta que tiene un cono (80) que se ajusta en la junta estrecha (81) entre la cámara del reactor (72) y la entrada al tanque de venteo (74) (Figura 6A). El cono se encuentra en un brazo (82) que está unido a un eje (83) que se extiende a través de una prensaestopa a un accionador de válvula giratoria. El eje se rota en la dirección de la flecha punteada para mover el brazo en el sentido contrario de las agujas del reloj para abrir la junta, formando un venturi de expansión gradual (Figura 6B). En otra realización de una válvula de retención de clapeta utilizada para un venturi de expansión gradual, el cono puede ser de varios pies de diámetro, con la distancia movida en el sentido contrario de las agujas del reloj para abrir la válvula siendo de sólo unas pocas pulgadas, lo que es menos de 8 cm.

La mezcla de biomasa y amoníaco que se mueve a través de la válvula de descarga ingresa a un tanque de venteo que es capaz de mantener un vacío. En el tanque de venteo se libera amoníaco de la biomasa tratada y la biomasa se enfría en preparación para la sacarificación. Puede utilizarse cualquier tanque de venteo típico, teniendo una entrada tangencial o de voluta que proporciona la función de un codo separador más adecuado. Es particularmente adecuado imponer evaporaciones súbitas varias veces en secuencia a diferentes presiones para liberar amoníaco de la biomasa pretratada. Por ejemplo, una primera evaporación súbita hasta una presión cercana a la atmosférica típicamente elimina la mayoría del amoníaco libre y enfría el material hasta aproximadamente 100°C. Una segunda evaporación súbita hasta una presión menor que 20 kPa elimina el amoníaco libre restante y enfría el material hasta una temperatura de aproximadamente 50°C, lo cual es deseable para la sacarificación.

El vapor de amoníaco, liberado en el tanque de venteo a partir de la mezcla de biomasa y amoníaco pasada a través de la válvula de descarga, puede recuperarse del tanque de venteo y puede reciclarse. El vapor de las evaporaciones súbitas de presión más baja puede reciclarse utilizando un aparato de recompresión de vapor estándar (tal como una turbina o una bomba de chorro de vapor) sin intercambiador de temperatura. Por lo tanto, el vapor de amoníaco puede reciclarse directamente para el tratamiento sin condensación o puede condensarse antes de su reutilización. En el último caso, se alimenta vapor recogido a un condensador como en la Figura 1.

Reducir el amoníaco en la biomasa tratada disminuirá el pH y reducirá la cantidad de ácido necesaria para alcanzar un pH que sea satisfactorio para la actividad de enzimas de sacarificación. Esto es deseable, ya que la adición de ácido en grandes cantidades puede resultar en la formación de sales a concentraciones que son inhibitorias de las enzimas de sacarificación o el crecimiento microbiano. Por otro lado, el amoníaco que se deja en la biomasa puede servir como una fuente de nitrógeno para soportar el crecimiento de microorganismos durante la fermentación. Por lo tanto, el amoníaco restante puede reducir o eliminar la necesidad de complementar el medio de crecimiento utilizado durante la fermentación con una fuente de nitrógeno. Típicamente se retira al menos una porción del amoníaco, lo que reduce el pH pero deja un poco de nitrógeno que proporciona este nutriente para su uso en la fermentación posterior.

Mientras se acumula en el fondo del tanque de venteo, la biomasa pretratada puede agitarse mediante un mezclador de paletas que puede estar unido al fondo del tanque de venteo. La biomasa pretratada se retira del fondo del tanque de venteo, típicamente al abrir una cubierta en el fondo del tanque. Un medio mecánico con fondo de descarga para extraer la biomasa pretratada de manera continua es particularmente adecuado. Para procesar múltiples lotes de biomasa en el presente aparato, un lote de biomasa y amoníaco puede estar en la cámara del barril, mientras otro lote está en el tanque de venteo. En el aparato de dos cámaras, los lotes pueden estar simultáneamente en ambas cámaras y en el tanque de venteo. Además, múltiples lotes de biomasa pretratada pueden recogerse en el tanque de venteo antes de su retiro.

Luego del tratamiento, el producto típicamente comprende una mezcla de amoníaco, biomasa parcialmente degradada y algunos azúcares fermentables. La biomasa pretratada entera que comprende las fracciones soluble e insoluble puede retirarse del tanque de venteo y utilizarse en una reacción de sacarificación. Alternativamente, un poco de líquido puede drenarse de la mezcla de biomasa pretratada antes de la sacarificación de modo que el peso seco de la biomasa permanece alto en la reacción de sacarificación. El líquido en exceso puede estar presente luego del tratamiento, particularmente cuando grandes cantidades de vapor se requieren para aumentar y mantener la temperatura de la biomasa para su tratamiento.

En otra alternativa, los sólidos de biomasa pueden reciclarse a través del tratamiento en el presente método.

Sacarificación

La biomasa tratada en los presentes métodos se hidroliza adicionalmente en presencia de las enzimas de sacarificación, que pueden denominarse un grupo de enzimas de sacarificación, para liberar los oligosacáridos y/o monosacáridos en un hidrolizado. Las enzimas de sacarificación y métodos para el tratamiento de la biomasa se reseñan en Lynd, L. R., *et al.* (Microbiol. Mol. Biol. Rev. (2002) 66:506-577).

Antes de la sacarificación, la biomasa pretratada puede tratarse para alterar el pH, la composición o la temperatura de modo que las enzimas del grupo de enzimas de sacarificación se activen. El pH puede alterarse a través de la adición de ácido en forma sólida o líquida. Alternativamente, el dióxido de carbono (CO₂), que puede recuperarse de

la fermentación, puede utilizarse para disminuir el pH. Por ejemplo, el CO₂ puede recogerse de un fermentador y alimentarse en el espacio libre del producto del pretratamiento en el tanque de venteo o en burbujas a través de la biomasa pretratada si hay líquido adecuado presente mientras se monitorea el pH, hasta que se alcanza el pH deseado. La temperatura puede llevarse a una temperatura que sea compatible con la actividad de las enzimas de sacarificación, como se observa a continuación. Puede agregarse cualquier cofactor requerido para la actividad de enzimas utilizadas en la sacarificación.

El grupo de enzimas de sacarificación comprende una o más enzimas seleccionadas principalmente, pero no exclusivamente, del grupo "glucosidasas" que hidroliza 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 Complemento 1 (1993), Complemento 2 (1994), Complemento 3 (1995), Complemento 4 (1997) y Complemento 5 [en Eur. J. Biochem. (1994) 223:1- 5, Eur. J. Biochem. (1995) 232:1-6, Eur. J. Biochem. (1996) 237:1-5, Eur. J. Biochem. (1997) 250:1-6 y Eur. J. Biochem. (1999) 264:610-650, respectivamente]) del grupo general de "hidrolasas" (EC 3.). Las glucosidasas útiles en el presente método pueden categorizarse según el componente de biomasa que hidrolizan. Glucosidasas útiles para el presente método incluyen glucosidasas que hidrolizan celulosa (por ejemplo, celulasas, endoglucanasas, exoglucanasas, celobiohidrolasas, β-glucosidasas), glucosidasas que hidrolizan hemicelulosa (por ejemplo, xilanasas, endoxilanasas, exoxilanasas, β-xilosidasas, arabinoxilanasas, manasas, galactasas, pectinasas, glucuronidasas) y glucosidasas que hidrolizan almidón (por ejemplo, amilasas, α-amilasas, β-amilasas, glucoamilasas, α-glucosidasas, isoamilasas). Además, puede ser útil para agregar otras actividades al grupo 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 (EC 3.1.1.73) para ayudar a liberar los polisacáridos de otros componentes de la biomasa. Se conoce bien en la técnica que los microorganismos que producen enzimas que hidrolizan polisacáridos a menudo exhiben una actividad, tal como degradación de celulosa, que se cataliza mediante 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, las cuales pueden contribuir a la actividad que degrada celulosa. Las preparaciones de enzimas comerciales y no comerciales, tales como celulasa, pueden comprender numerosas enzimas dependiendo del esquema de purificación utilizado para obtener la enzima. Por lo tanto, el grupo de enzimas de sacarificación del presente método puede comprender actividad enzimática, tales como "celulasa". Sin embargo se reconoce que esta actividad puede ser catalizada por más de una enzima.

Pueden obtenerse comercialmente enzimas de sacarificación, tales como celulasa Spezyme® CP (Genencor International, Rochester, NY) y xilanasas Multifect® (Genencor). Además, las enzimas de sacarificación pueden producirse biológicamente, lo que incluye la utilización de microorganismos recombinantes.

Un experto en la técnica sabrá cómo determinar la cantidad efectiva de enzimas para utilizar en el grupo y ajustar condiciones para una actividad enzimática óptima. Un experto en la técnica también sabrá cómo optimizar las clases de actividades de enzimas requeridas en el grupo para obtener una sacarificación óptima de un producto de pretratamiento dado en las condiciones seleccionadas.

Preferiblemente, la reacción de sacarificación se realiza a o cerca de la temperatura y pH óptimos para las enzimas de sacarificación. La temperatura óptima utilizada con el grupo de enzimas de sacarificación en el presente método está en el rango de 15°C a 100°C. En otra realización, la temperatura óptima está en el rango de 20°C a 80°C. El pH óptimo puede estar en el rango de 2 a 11. En otra realización, el pH óptimo utilizado con el grupo de enzimas de sacarificación en el presente método está en el rango de 4 a 10.

La sacarificación puede realizarse durante un tiempo de varios minutos a 120 hr, y preferiblemente de varios minutos a 48 hr. El tiempo para la reacción dependerá de la concentración y actividad enzimática específica, así como el sustrato utilizado y las condiciones medioambientales, tales como temperatura y pH. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente las condiciones óptimas de temperatura, pH y tiempo a utilizar con un sustrato y grupo de enzimas de sacarificación particular.

La sacarificación puede realizarse en lotes o como un proceso continuo. La sacarificación también puede realizarse en un paso o en varios pasos. Por ejemplo, diferentes enzimas requeridas para la sacarificación pueden exhibir diferente pH y temperatura óptimos. Un tratamiento primario puede realizarse con enzimas a una temperatura y pH, seguido por tratamiento secundario o terciario (o más) con diferentes enzimas a diferentes temperaturas y/o pH. Además, el tratamiento con diferentes enzimas en pasos secuenciales puede estar en el mismo pH y/o temperatura, o diferentes pH y temperaturas, tales como utilizando hemicelulasas estables y más activas a pH y temperaturas más altos seguido por celulasas que se activan a pH y temperaturas más bajos.

El grado de solubilización de azúcares de la biomasa seguido por la sacarificación puede monitorearse midiendo la liberación de monosacáridos y oligosacáridos. Los métodos para medir los monosacáridos y oligosacáridos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la concentración de azúcares reductores puede determinarse utilizando el ensayo de ácido 1,3-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, G. L., Anal. Chem. (1959) 31:426-428). Alternativamente, los azúcares pueden medirse por HPLC utilizando una columna apropiada como se describe en la sección de Métodos generales.

Fermentación

- Azúcares fermentables liberados de la biomasa pueden ser utilizados por microorganismos adecuados para producir químicos objetivo. Luego de la sacarificación, pero antes de la fermentación, la mezcla de sacarificación puede concentrarse mediante evaporación, por ejemplo, para aumentar la concentración de azúcares fermentables. Opcionalmente, el líquido en el producto de sacarificación puede separarse de sólidos en un método por lotes o continuo. Opcionalmente, el líquido o el producto de sacarificación entero puede esterilizarse antes de la fermentación. Dependiendo del microorganismo utilizado durante la fermentación y el pH utilizado durante la sacarificación, el pH puede ajustarse al adecuado para la fermentación. Además, la mezcla de sacarificación puede complementarse con nutrientes adicionales requeridos para el crecimiento microbiano. Complementos pueden incluir, por ejemplo, extracto de levadura, aminoácidos específicos, fosfato, fuentes de nitrógeno, sales y elementos traza.
- También pueden incluirse componentes requeridos para la producción de un producto específico hecho por un biocatalizador específico, tal como un antibiótico para mantener un plásmido o un cofactor requerido en una reacción catalizada por enzimas. También pueden incluirse azúcares adicionales para aumentar la concentración de azúcar total. La mezcla de sacarificación puede utilizarse como un componente de un caldo de fermentación, por ejemplo, formando entre 100% y 10% del medio final.
- También pueden ajustarse la temperatura y/o espacio libre de gas, dependiendo de las condiciones útiles para el microorganismo de fermentación. La fermentación puede ser aeróbica o anaeróbica. La fermentación puede ocurrir posterior a la sacarificación o puede ocurrir simultáneamente con la sacarificación por sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). La SSF puede mantener niveles bajos de azúcar producida por la sacarificación, reduciendo así una posible inhibición del producto de las enzimas de sacarificación, reduciendo la disponibilidad del azúcar para contraminar microorganismos y mejorando la conversión de biomasa pretratada en monosacáridos y/u oligosacáridos.
- Químicos objetivo que pueden producirse mediante fermentación incluyen, por ejemplo, ácidos, alcoholes, alcanos, alquenos, aromáticos, aldehídos, cetonas, biopolímeros, proteínas, péptidos, aminoácidos, vitaminas, antibióticos y productos farmacéuticos. Alcoholes incluyen, a modo no taxativo, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, etilenglicol, propanodiol, butanodiol, glicerol, eritritol, xilitol y sorbitol. Ácidos incluyen ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido butírico, ácido glucónico, ácido itacónico, ácido cítrico, ácido succínico y ácido levulínico. Aminoácidos incluyen ácido glutámico, ácido aspártico, metionina, lisina, glicina, arginina, treonina, fenilalanina y tirosina. Químicos objetivo adicionales incluyen, metano, etileno, acetona y enzimas industriales.
- La fermentación de azúcares para su conversión en químicos objetivo puede llevarse a cabo por uno o más biocatalizadores apropiados en fermentaciones únicas o de múltiples pasos. Los biocatalizadores pueden ser organismos seleccionados de bacterias, hongos filamentosos y levadura. Biocatalizadores pueden ser microorganismos de tipo salvaje o microorganismos recombinantes e incluyen *Escherichia*, *Zymomonas*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Clostridium*. En otra realización, los biocatalizadores pueden seleccionarse del grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clostridia thermocellum*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* y *Pichia stipitis* recombinantes.
- Se han descrito muchos biocatalizadores utilizados en la fermentación para producir químicos objetivo y otros pueden descubrirse, producirse a través de mutación o manipularse a través de medios recombinantes. Cualquier biocatalizador que utiliza azúcares fermentables producidos a partir de sacarificación de biomasa tratada utilizando los presentes métodos puede utilizarse para preparar los químicos objetivo que se conocen se producen mediante fermentación.
- De particular interés son los biocatalizadores que producen biocombustibles, incluidos etanol y butanol. Por ejemplo, es bien conocida la fermentación de carbohidratos para obtener acetona, butanol y etanol (fermentación ABE) mediante *Clostridia* solventogénica (Jones y Woods (1986) Microbiol. Rev. 50:484- 524). Un proceso de fermentación para producir altos niveles de butanol, también producir acetona y etanol, utilizando una cepa mutante de *Clostridium acetobutylicum* se describe en el documento US 5192673. El uso de una cepa mutante de *Clostridium beijerinckii* para producir niveles altos de butanol, y también producir acetona y etanol, se describe en el documento US 6358717. Los documentos WO 2007/041269 y WO 2007/050671, divulgan la producción de 1-butanol e isobutanol, respectivamente, en huéspedes microbianos genéticamente manipulados. Las solicitudes de patente de los Estados Unidos publicadas 2007/0259410 y 2007/0292927 divulgan la producción de 2-butanol en huéspedes microbianos genéticamente manipulados. Isobutanol, 1-butanol o 2-butanol pueden producirse a partir de fermentación de hidrolizado producido utilizando los presentes métodos por un huésped microbiano siguiendo los métodos divulgados.
- También se han utilizado cepas genéticamente modificadas de *E. coli* como biocatalizadores para la producción de etanol (Underwood et al., (2002) Appl. Environ. Microbiol. 68:6263-6272). Una cepa genéticamente modificada de *Zymomonas mobilis* que tiene una producción mejorada de etanol se describe en US 2003/0162271 A1. El etanol puede producirse a partir de la fermentación de hidrolizado producido utilizando los presentes métodos por *Zymomonas mobilis* siguiendo los métodos divulgados.
- El ácido láctico se ha producido en fermentaciones mediante cepas recombinantes de *E. coli* (Zhou et al., (2003)

Appl. Environ. Microbiol. 69:399- 407), cepas naturales de *Bacillus* (US20050250192) y *Rhizopus oryzae* (Tay y Yang (2002) Biotechnol. Bioeng. 80:1-12). Se han utilizado cepas recombinantes de *E. coli* como biocatalizadores en la fermentación para producir 1,3-propanodiol (US 6013494, US 6514733) y ácido adipico (Niu et al., (2002) Biotechnol. Prog. 18:201-211). Se ha preparado ácido acético mediante fermentación utilizando *Clostridia* recombinante (Cheryan et al., (1997) Adv. Appl. Microbiol. 43:1-33) y cepas de levadura identificadas recientemente (Freer (2002) World J. Microbiol. Biotechnol. 18:271-275). La producción de ácido succínico mediante *E. coli* recombinante y otras bacterias se divulga en el documento US 6159738, y mediante *E. coli* recombinante mutante en Lin et al., (2005) Metab. Eng. 7:116-127). Se ha producido ácido pirúvico mediante levadura de *Torulopsis glabrata* mutante (Li et al., (2001) Appl. Microbiol. Technol. 55:680-685) y mediante *E. coli* mutante (Yokota et al., (1994) Biosci. Biotech. Biochem. 58:2164-2167). 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 *Propionibacterium acidipropionici* se ha utilizado en la fermentación para producir ácido propiónico (Suwannakham y Yang (2005) Biotechnol. Bioeng. 91:325-337) y se ha preparado ácido butírico por *Clostridium tyrobutyricum* (Wu y Yang (2003) Biotechnol. Bioeng. 82:93-102). Se han preparado propionato y propanol mediante fermentación a partir de treonina mediante la cepa 17cr1 de *Clostridium sp.* (Janssen (2004) Arch. Microbiol. 182:482-486). *Aureobasidium pullulans* similar a levadura se ha utilizado para preparar ácido glucónico (Anantassiadis et al., (2005) Biotechnol. Bioeng. 91:494-501), por un mutante de *Aspergillus niger* (Singh et al., (2001) Indian J. Exp. Biol. 39:1136-43). Ácido 5-ceto-D-glucónico se preparó mediante un mutante de *Gluconobacter oxydans* (Elfari et al., (2005) Appl Microbiol. Biotech. 66:668-674), ácido itacónico se produjo mediante mutantes de *Aspergillus terreus* (Reddy y Singh (2002) Bioresour. Technol. 85:69- 71), ácido cítrico se produjo por una cepa de *Aspergillus niger* mutante (Ikram- Ul-Haq et al., (2005) Bioresour. Technol. 96:645-648) y xilitol se produjo mediante FTI 20037 de *Candida guilliermondii* (Mussatto y Roberto (2003) J. Appl Microbiol. 95:331-337). Biopoliésteres que contienen 4-hidroxivalerato, que también contienen cantidades significativas de ácido 3-hidroxibutírico, ácido 3-hidroxivalérico, se produjeron mediante *Pseudomonas putida* y *Ralstonia eutropha* recombinantes (Gorenflo et al., (2001) Biomacromolecules 2:45-57). L-2,3-butanediol se preparó mediante *E. coli* recombinante (Ui et al., (2004) Lett. Appl. Microbiol. 39:533-537).

La producción de aminoácidos mediante fermentación se ha logrado utilizando cepas auxótrofas y cepas resistentes a análogos de aminoácidos de *Corynebacterium*, *Brevibacterium* y *Serratia*. Por ejemplo, la producción de histidina utilizando una cepa resistente a un análogo de histidina se describe en la publicación de patente japonesa No. 56008596 y utilizando una cepa recombinante se describe en EP 136359. La producción de triptófano utilizando una cepa resistente a un análogo de triptófano se describe en las Publicaciones de Patente Japonesa Nos. 47004505 y 51019037. La producción de isoleucina utilizando una cepa resistente a un análogo de isoleucina se describe en las Publicaciones de Patente Japonesa Nos. 47038995, 51006237, 54032070. La producción de fenilalanina utilizando una cepa resistente a un análogo de fenilalanina se describe en la Publicación de Patente Japonesa No. 56010035. Se han descrito la producción de tirosina utilizando una cepa que requiere fenilalanina para el crecimiento, resistente a tirosina (Agr. Chem. Soc. Japan 50 (1) R79-R87 (1976), o una cepa recombinante (EP263515, EP332234), y la producción de arginina utilizando una cepa resistente a un análogo de C-arginina (Agr. Biol. Chem. (1972) 36:1675-1684, Publicaciones de Patente Japonesa Nos. 54037235 y 57150381). La fenilalanina se produjo también mediante fermentación en cepas de *Eschericia coli* ATCC 31882, 31883 y 31884. La producción de ácido glutámico en una bacteria corineforme recombinante se describe en el documento US 6962805. La producción de treonina mediante una cepa mutante de *E. coli* se describe en Okamoto e Ikeda (2000) J. Biosci Bioeng. 89:87-79. La metionina se produjo mediante una cepa mutante de *Corynebacterium lilium* (Kumar et al, (2005) Bioresour. Techno. 96: 287-294).

Péptidos, enzimas y otras proteínas útiles también se han preparado mediante biocatalizadores (por ejemplo, en los documentos US6861237, US6777207, US6228630).

El pretratamiento y la sacarificación de biomasa para obtener azúcares fermentables, seguidos por fermentación de los azúcares para obtener un químico objetivo, se ejemplifican en el Ejemplo 5 en la presente para la producción de etanol a partir de mazorcas de maíz pretratadas utilizando *Z. mobilis* como biocatalizador para la fermentación de azúcares para obtener etanol. El método de la presente invención también puede utilizarse para la producción de 1,3-propanodiol a partir de biomasa. La biomasa tratada utilizando los presentes métodos puede sacarificarse; luego de la sacarificación se utiliza *E. coli* para producir 1,3-propanodiol como se describió en el Ejemplo 10 de la solicitud de patente de los Estados Unidos publicada 2007/0031919.

Los químicos objetivo producidos en la fermentación por biocatalizadores pueden recuperarse utilizando varios métodos conocidos en la técnica. Los productos pueden separarse de otros componentes de fermentación mediante centrifugación, filtración, microfiltración y nanofiltración. Los productos pueden extraerse por intercambio iónico, extracción de disolventes o eletrodialisis. Agentes de floculación pueden utilizarse para ayudar en la separación de productos. Como un ejemplo específico, el 1-butanol bioproducido puede aislarse del medio de fermentación utilizando métodos conocidos en la técnica para fermentaciones ABE (ver por ejemplo, Durre, Appl. Microbiol. Biotechnol. 49:639-648 (1998), Groot et al., Process. Biochem. 27:61-75 (1992) y sus referencias). Por ejemplo, pueden retirarse sólidos del medio de fermentación mediante centrifugación, filtración, decantación o similares. Luego, el 1-butanol puede aislarse del medio de fermentación utilizando métodos tales como destilación, destilación

azeotrópica, extracción líquido-líquido, adsorción, despojamiento de gas, evaporación de membrana o pervaporación. La purificación de 1,3-propanodiol de un medio de fermentación puede lograrse, por ejemplo, sometiendo la mezcla de reacción a extracción con un disolvente orgánico, destilación y cromatografía en columna (U.S. 5.356.812). Un disolvente orgánico particularmente bueno para este proceso es el ciclohexano (U.S. 5.008.473). Los aminoácidos pueden recogerse del medio de fermentación mediante métodos tales como adsorción de resina de intercambio iónico y/o cristalización.

Ejemplos

Métodos generales y materiales

Se utilizan las siguientes abreviaciones:

10 "HPLC" es Cromatografía líquida de alto rendimiento, "C" es Centígrado, "kPa" es kilopascal, "m" es metro, "mm" es milímetro, "kW" es kilovatio, "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, "p" es peso, "hr" es hora, "temp" o "T" es temperatura, "teór" es teórico, "pretrat" is pretratamiento, "DWB" es peso seco de biomasa, "ASME" es la Sociedad Estadounidense de Ingenieros Mecánicos, "a.i." es acero inoxidable, "pulg." o "''' es pulgada.

15 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). El tratamiento se denomina pretratamiento en los Ejemplos.

Reactor de pistón de barril pequeño

20 Se construyó un reactor de pistón de barril pequeño (reactor de pistón/barril) que consistió en un barril de acero inoxidable de 5,1 cm x 45,7 cm equipado con un pistón, orientado horizontalmente. El pistón se selló al barril con cuatro anillos O y se presurizó con nitrógeno en la parte posterior del pistón durante la carrera de descarga. El barril de 45,7 cm se equipó con tres puertos de múltiples usos permitiendo la aplicación de vacío, inyección de amoníaco acuoso, inyección de vapor e inserción de termopares para la medición de temperatura dentro del barril. Para evitar la condensación de vapor en exceso tras la inyección de vapor, el exterior del barril se calentó con tres calentadores de banda y se aisló con una capa de fibra de vidrio de 2,5 cm de espesor cubierta con una camisa de fibra de vidrio impregnada con silicona.

30 El barril del reactor se unió directamente a un tanque de venteo de acero inoxidable de 15,2 cm x 61 cm, orientado verticalmente. El barril se aisló del tanque de venteo mediante una boquilla cónica y arreglo de válvula de corte terminal de asiento. El diámetro del troquel de la válvula de corte terminal fue de 3,5 cm. La presión de retroceso en la boquilla cónica y el asiento se ajustó a aproximadamente 138 kPa (presión manométrica) de presión de retroceso en un cilindro de aire de 10,2 cm de diámetro conectado al cono de la válvula de corte terminal. El cono de la válvula de corte terminal se podía mover hacia atrás hasta 1,6 cm para permitir la descarga de partículas en el tanque de venteo. Un codo en la salida de la válvula de corte terminal dirigió los sólidos pretratados hacia el fondo del tanque de venteo donde los sólidos se retiraron fácilmente destornillando una brida terminal abovedada en el fondo del tanque. Una brida abovedada superior al tanque de venteo incorporó un montaje de salida especial con ranuras mecanizadas en ángulos rectos al eje del tanque de venteo, lo que hizo que los vapores liberados se desplazaran alrededor de una ruta en una esquina a un montaje de descarga, ayudando a prevenir arrastres de partículas de biomasa atrapada y gotitas de agua hacia un condensador de ventilación.

Reactor de pistón de barril grande

40 Un segundo barril para el reactor de pistón (código ASME estampado) se fabricó con el mismo diámetro de 5,1 cm, pero una longitud más larga de 68,6 cm para contener un volumen de biomasa adicional. El pistón se selló al barril con cuatro anillos O y se presurizó con nitrógeno en la parte posterior del pistón durante la carrera de descarga. El barril de 68,6 cm se equipó con ocho puertos de múltiples usos, 4 a lo largo de cada una de la superficie superior e inferior, permitiendo la aplicación de vacío, inyección de amoníaco acuoso, inyección de vapor e inserción de termopares para la medición de temperatura dentro del barril. El barril del reactor se equipó con una camisa de vapor para un calentamiento uniforme del barril. El barril del reactor se unió directamente a un tanque de venteo de acero inoxidable de 15,2 cm x 61 cm, orientado verticalmente. El barril se aisló del tanque de venteo mediante una boquilla cónica y arreglo de válvula de corte terminal de asiento. El diámetro del troquel de corte de la válvula terminal fue 3,5 cm. La presión de retroceso en la boquilla cónica y asiento era ajustable y en la mayoría de las pruebas realizadas se utilizó ~ 138 kPa (presión manométrica) de presión de retroceso en un cilindro de aire de 10,2 cm de diámetro conectado al cono de la válvula de corte terminal. El cono de la válvula de corte terminal se podía mover hacia atrás hasta 1,6 cm para permitir la descarga de partículas en el tanque de venteo. Un codo en la salida de la válvula de corte terminal dirigió los sólidos pretratados hacia el fondo del tanque de venteo donde los sólidos se retiran fácilmente destornillando una brida terminal abovedada en el fondo del tanque. Una brida abovedada superior al tanque de venteo incorporó un montaje de salida especial con ranuras mecanizadas en ángulos rectos al eje del tanque de venteo, lo que hizo que los vapores liberados se desplazaran alrededor de una ruta en una esquina a un montaje de descarga, ayudando a prevenir arrastres de partículas de biomasa atrapada y gotitas de agua hacia un condensador de ventilación. Se agregaron tres calentadores de banda eléctricos (configurados a 60°C) y aislamiento

a lo largo del tanque de venteo para permitir que sólidos pretratados calientes se dirijan a un recipiente caliente, simulando mejor un proceso a escala comercial.

Sistema de digestión por lotes de reactor de pistola de vapor

El reactor con pistola de vapor de 4 litros (Autoclave Engineers, Erie, PA) es un reactor con camisa de vapor que consiste en un tubo de 102 mm de longitud, calibre 80, Hastelloy® cerrado por dos válvulas esféricas. Se colocaron calentadores eléctricos adicionales en todas las superficies expuestas sin camisa del reactor y se controlaron a la temperatura de referencia del pretratamiento. También se utilizó inyección de vapor directa para llevar rápidamente la biomasa a la temperatura de pretratamiento. La presión de vapor se ajustó y controló para mantener la temperatura de pretratamiento deseada. El fondo del reactor tenía un cuello hacia abajo de 51 mm. Todo el material pretratado salió a través de un troquel reemplazable en el fondo del reactor y se recogió en una bolsa de nylon (Hotfill®) de 0,21 m³ sostenido en un tanque de venteo de paredes gruesas, con camisa y enfriado.

Pretratamiento y reactor de hidrólisis enzimática (PEHReactor)

El PEHReactor de 9L (construido en NREL, Golden, CO; ver solicitud de patente de los Estados Unidos 2007/0029252) tiene un recipiente de reacción de acero inoxidable de aproximadamente 15 cm x 51 cm y el PEHReactor de 3,2 L tiene un recipiente de reacción de acero inoxidable de 15 cm x 18 cm. Cada recipiente tiene una lanza de inyección que se extiende a través del centro longitudinal del recipiente de reacción para la introducción de reactivos de procesamiento. La lanza de inyección se conecta utilizando una junta giratoria a un puerto en una cubierta en un extremo del recipiente, que tiene un puerto adicional para el acceso al recipiente. Cuatro deflectores recorren la longitud de la pared del recipiente y están unidos perpendicularmente a la pared. Los deflectores y cilindros de medio de abrasión de cerámica de 3,2 cm X 3,2 cm (E.R. Advanced Ceramics, East Palestine, OH), que flotan libres en el recipiente, aplican una mezcla mecánica de biomasa y reactivo mientras el recipiente se rota, promoviendo la asimilación del reactivo en la biomasa. Se utilizan siete cilindros en el pequeño reactor y veintidós en el reactor grande. El PEHReactor se coloca en un aparato de rodillo para producción celular Belco (Belco Technology, Vineland, NJ) que proporciona un mecanismo para la rotación y el reactor con aparato de rodillo se almacena en una cámara de temperatura controlada que proporciona calor. Pueden aplicarse vacío y presión al recipiente de reacción acoplado las fuentes externas al puerto conectado a la lanza en la cubierta.

Reactor de sacarificación por lote alimentado

El reactor de sacarificación por lote alimentado es un fermentador de 15 L (B. Braun Biotech International, Allentown, PA) controlado por una unidad de control de datos BioStat ED y módulo de control asociado que contiene una bomba de circulación, bombas de ácido y base, válvulas solenoides, intercambiadores de calor para el control de temperatura, suministro de vapor, agua de procesamiento, válvulas de control de suministro de aire y filtración y válvulas de control de presión de retroceso y filtros de escape. El fermentador se equipó con dos impulsores Ligntrin A-310 de alta eficiencia con tres hojas de 11,4 cm de diámetro. El impulsor de fondo se colocó a 7,6 cm del fondo del reactor (no podía colocarse más cerca debido a la presencia de un arreglo de sello grande cerca del fondo del eje para la penetración del eje conductor inferior) y el impulsor superior se colocó 22,9 cm del fondo del reactor. El recipiente del fermentador tiene un diámetro de 19,0 cm y una altura máxima de 55,9 cm. Se instalaron cuatro deflectores extraíbles, cada uno de los cuales tiene un ancho de 1,6 cm y una longitud de 48,3 cm y se extendieron desde el fondo del recipiente hasta una distancia de ~ 7,6 cm desde la parte superior. Conectado en los puertos superior e inferior en el sistema del fermentador había un circuito alrededor de la bomba que consistía en una bomba de lóbulo APV (modelo M1/028/06), mangueras flexibles de 1-1/2-pulg (3,81 cm) y un indicador de flujo visible Teflon. El circuito alrededor de la bomba se aisló del recipiente de fermentación con válvulas de bolas con puerto completo Valmicro y SVF de 1-1/2 pulg. (3,81 cm) con cuerpos CF8M, bolas 316 a.i. y asientos de PTFE. Adicionalmente, una válvula de corte de puerto V (Triac Controls) se colocó corriente abajo de la bomba de lóbulo, antes de que la válvula de bola aisle la bomba del puerto superior del fermentador. Durante los ciclos de recirculación, esta válvula se cerró gradualmente hasta 60°C para proporcionar un mejor corte de los sólidos pretratados de recirculación.

Métodos analíticos

Cuantificación de celulosa

La cantidad de celulosa en cada muestra de biomasa de partida se determinó utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tales como ASTM E1758-01 "Método estándar para la determinación de carbohidratos por HPLC".

Medición de contenido de azúcar, acetamida, ácido láctico y ácido acético.

Azúcares solubles (glucosa, celobiosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa), ácido acético y etanol en licor de sacarificación o caldo de fermentación se midieron por HPLC (Modelo Agilent 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) utilizando columnas Bio-Rad HPX-87P y Bio-Rad HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) con columnas de guarda apropiadas. La muestra de pH se midió y ajustó a 5-6 con ácido sulfúrico si fue necesario. La muestra se pasó entonces a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm directamente a un vial de HPLC. Las condiciones de ejecución de la HPLC fueron las siguientes:

HPX-87P (para carbohidratos):

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

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

Tasa de flujo: 0,6 mL / minuto

Temperatura de columna: 80 - 85°C, temperatura de columna de guarda <60°C

- 5 Temperatura del detector: tan cercana a la temperatura de la columna principal como sea posible

Detector: índice refractivo

Tiempo de ejecución: recolección de datos de 35 minutos más post ejecución de 15 minutos (con posible ajuste para compuestos posteriormente eludidos)

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

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

Fase móvil: ácido sulfúrico 0,01 N, 0,2 µm filtrado y desgasificado

Tasa de flujo: 0,6 mL / minuto

Temperatura de columna: 55°C

Temperatura del detector: tan cercana a la temperatura de la columna como sea posible

- 15 Detector: índice refractivo

Tiempo de ejecución: recolección de datos de 25 - 75 minutos.

Después de la ejecución, las muestras se determinaron a partir de curvas estándar para cada uno de los compuestos.

Ejemplo 1

- 20 Pretratamiento de mazorca en el reactor de pistón de barril pequeño

Se procesaron mazorcas de maíz completas con una trituradora de mandíbula (motor de 2,2 kW) con una separación de mandíbula de aproximadamente 0,95 cm, seguido por un desaglomerador (motor de 1,5 kW, Franklin Miller Inc., Livingston, NJ), seguido por cribado con una criba Sweco equipada con una criba estándar de Estados Unidos de 1,9 cm para fracturar las mazorcas enteras en pedazos más pequeños. El reactor de pistón de barril pequeño (descrito en los Métodos Generales) se cargó con 115 g (en base al peso seco) de mazorca fracturada, colocando a mano 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 para llevar la presión del reactor a < 10 kPa (0,1 bar), y se inyectó una solución de hidróxido de amonio diluido para proporcionar una concentración de amoníaco de 4 g o 6 g por 100 g de peso seco de biomasa (como se proporciona en la Tabla 1) y un peso seco de concentración de biomasa de 50 g por 100 g de mezcla de biomasa-amoníaco acuoso total. Después que se cargó la solución de amoníaco, el vapor se inyectó para llevar la temperatura a 145°C dentro del reactor. La biomasa se mantuvo a temperatura durante 20 minutos y luego se descargó en el tanque de venteo activando el pistón. Durante el pretratamiento de 20 minutos, la temperatura se monitoreó y el vapor se agregó según fuera necesario para mantener la temperatura. Las mazorcas pretratadas se cosecharon a través del fondo del tanque de venteo. El líquido libre en exceso se retiró y los sólidos restantes se utilizaron en la sacarificación.

Para la sacarificación se agregaron aproximadamente 470 g de biomasa pretratada al reactor PEHR de 3,2 L descrito en los Métodos Generales. El pH de el contenido se ajustó a aproximadamente 5,5 mediante la inyección de de solución amortiguadora de ácido cítrico 1 M a pH 4,8 más la adición de monohidrato de ácido cítrico. Una vez que se alcanzó el pH deseado, se cargaron en el reactor 12,9 mg/g de celulosa o 25,8 mg/g de celulosa de celulosa Spezyme® CP (Genencor International, Rochester, NY) y 4,2 mg de proteína activa/g de celulosa o 8,4 mg de proteína activa/g de celulosa del grupo de enzimas de hemicelulasas (Diversa; San Diego, CA) que consistía en β-glucosidasa, xilanasa, β-xilosidasa y arabinofuranosidasa. La solución amortiguadora, enzimas y agua se agregaron de modo que la mezcla final en el reactor consistió en una mezcla del grupo de enzimas de sacarificación de 23 g de biomasa seca/100 g de biomasa pretratada. El reactor permaneció en una incubadora a 50°C girando a 19 rpm durante 72 hr. Los rendimientos proporcionados en la Tabla 1 a continuación son la liberación como porcentaje de rendimiento teórico.

Tabla 1: Rendimientos luego de la sacarificación de mazorca pretratada en un reactor de pistón de barril pequeño.

Amoníaco (g/100 DWB)	g	Spezyme® CP (mg/g celulosa)	Grupo de enzimas (Diversa) (mg/g celulosa)	Liberación de monómero glucosa (%) teór.)	Liberación de glucosa total (% teór.)	Liberación de monómero xilosa (%) teór.)	Liberación de xilosa total (% teór.)
4		25,8	8,4	78	90	50	80
6		12,9	4,2	65	77	48	72

Ejemplo 2

Pretratamiento en el reactor de pistón de barril grande a diferentes tiempos

Se agregó vapor a la camisa del barril para precalentar el barril del reactor de pistón de barril grande (descrito en los Métodos Generales) hasta ~ 130°C. El receptor de evaporación súbita se precalentó a ~ 60°C con calentadores de banda. Se prepararon mazorcas fracturadas como se describe en el Ejemplo 1. Estas mazorcas (175 g, en base al peso seco) se cargaron en el reactor de barril grande, colocando a mano 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 evaporación súbita para reducir la presión a < 10 kPa y se inyectó una solución de hidróxido de amonio diluido en el reactor para proporcionar una concentración de amoníaco de 6 g/100 g en peso seco de biomasa y un peso seco de concentración de biomasa de 45 g/100 g de mezcla de biomasa-amoníaco acuoso total. Una vez que se cargó el amoníaco, el vapor se inyectó en el reactor para llevar la temperatura a 145°C. La mezcla se mantuvo a esta temperatura durante 10 o 20 minutos monitoreando la temperatura y agregando vapor según fuese necesario y luego se descargó en el tanque de venteo precalentado activando el pistón. El vacío se colocó en el tanque de venteo hasta que el receptor de evaporación súbita alcanzó ~ 59°C. Se llevaron a cabo tres pretratamientos de 10 minutos y seis pretratamientos de 20 minutos y se agrupó al final todo el material pretratado durante la misma cantidad de tiempo. Tras la cosecha del receptor de evaporación súbita, el líquido libre se separó de los sólidos pretratados y no se volvieron a agregar para la sacarificación. Una muestra de la mazorca pretratada se sacarió posteriormente como se describe en el Ejemplo 1 en el PEHReactor pequeño. Todas las sacarificaciones se realizaron con 12,9 mg/g de celulosa de celulosa Spezyme® CP y 4,2 mg de proteína activa/g celulosa del grupo de enzimas de hemicelulasas (Diversa) que contenía xilanasa, β -xilosidasa, arabinofuranosidasa y β -glucosidasa a 50°C y pH 5,5 durante 72 hr. Los rendimientos proporcionados en la Tabla 2 a continuación son la liberación como porcentaje de rendimiento teórico.

Tabla 2: Rendimientos luego de la sacarificación de mazorca pretratada en un reactor de pistón de barril grande.

Tiempo de pretratamiento (min)	Liberación de monómero glucosa (% teór.)	Liberación de glucosa total (% teór.)	Liberación de monómero xilosa (%) teór.)	Liberación de xilosa total (%) teór.)
10	68,2	79,5	32,1	77,0
20	68,0	83,2	39,1	84,3

Ejemplo 3

Pretratamiento en un reactor de pistón de barril grande en comparación con una pistola de vapor

Se prepararon mazorcas con tamaño reducido como se describe en el Ejemplo 1. El pretratamiento en el reactor de pistón de barril grande se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 2. Para el pretratamiento en la pistola de vapor, las mazorcas se cargaron primero en un PEHReactor de 9 L. El reactor se enfrió hasta 4°C mediante rotación en contacto con hielo sobre la superficie externa. Se aplicó un vacío al recipiente y se inyectó solución de hidróxido de amonio diluido que se pre-enfrió en una habitación fría a 4°C y se pasó a través de un tubo inmerso en un baño de agua helada para proporcionar una concentración de amoníaco de 6 g/100 g en peso seco de biomasa y un peso seco de concentración de biomasa de 45 g/100 g de mezcla de biomasa-amoníaco acuoso total. El PEHReactor cargado con amoníaco y mazorca se enfrió hasta 4°C aplicando hielo a la superficie del recipiente del reactor en rotación y se hizo rotar a 4°C durante 30 min. En este momento, el contenido se transfirió al reactor de pistola de vapor que se describe en los Métodos Generales. Una vez que el reactor de pistola de vapor se cargó con la mezcla amoníaco-mazorca, la temperatura se aumentó a 145°C mediante inyección directa de vapor. La mezcla de mazorca-amoníaco se mantuvo a esta temperatura durante 20 min y luego la mezcla se descargó en un tanque de venteo.

Las muestras de mazorca pretratada se retiraron del reactor de pistón del barril grande y el reactor de pistola de vapor y se sacarió como se describió en el Ejemplo 1. Las sacarificaciones se llevaron a cabo con 12,9 mg/g de celulosa de celulosa Spezyme® CP (Genencor) y 4,2 mg de proteína activa/g celulosa del grupo de enzimas de

hemicelulasas (Diversa) que consistía en β -glucosidasa, xilanasa, β -xilosidasa y arabinofuranosidasa. El reactor permaneció en la incubadora a 50°C y 19 rpm durante 72 hr. Los rendimientos de glucosa resultantes para el pretratamiento en cada reactor se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Rendimientos luego de la sacarificación de mazorca pretratada, ya sea en un reactor de pistón de barril grande o pistola de vapor.

Reactor de pretratamiento	Concentración de DWB en el reactor	Tiempo de pretratamiento (min)	Temperatura de pretratamiento (°C)	Liberación de monómero glucosa (% teor.)	Liberación de glucosa total (% teor.)	Liberación de monómero xilosa (% teor.)	Liberación de xilosa total (% teor.)
Reactor de pistón	50%	20	145	68,0	83,2	39,1	84,3
Pistola de vapor	60%	40	150	65	77	48	82

Ejemplo 4

Pretratamiento de combinaciones de mazorca de maíz y fibra en el reactor de pistón del barril grande

Se prepararon mazorcas de maíz fracturadas como se describe en el Ejemplo 1. Mazorcas fracturadas solas y mazorcas fracturadas combinadas con Salvado Cargill 80 (Cargill, Minnetonka, MN) se pretrataron en el reactor de pistón del barril grande. Las mazorcas fracturadas y la fibra de maíz de Salvado Cargill 80 se combinaron de modo que la fibra fue aproximadamente 33% de la biomasa seca total de la muestra mezclada. En cada caso se agregaron 175 g (en base al peso seco) de materia prima al reactor. El pretratamiento se llevó a cabo esencialmente como se describe en el Ejemplo 2. Sin embargo, en estos experimentos, después de la adición de solución de amoníaco, el contenido del reactor se mantuvo durante 10 min antes de inyectar el vapor para llevar la temperatura a 145°C. Después de la inyección de vapor, la temperatura se mantuvo durante 10 min a 145°C agregando vapor si fuese necesario. Luego del pretratamiento, la muestra se descargó en un tanque de venteo con activación del pistón.

Las muestras de la mazorca pretratada y la combinación de mazorca-fibra fueron retiradas del tanque de venteo del reactor de pistón del barril grande y se sacarificaron en PEHReactores pequeños como se describe en el Ejemplo 1. La biomasa se agregó de modo que se llenó el 20% del volumen del reactor. Las sacarificaciones se llevaron a cabo con 12,9 mg/g de celulosa de celulosa Spezyme® CP (Genencor) y 15 mg/g de celulosa de xilanasa Multifect (Genencor). Los PEHReactores permanecieron en la incubadora a 50°C y 19 rpm durante 72 hr. Los rendimientos de glucosa y xilosa resultantes para el pretratamiento se muestran en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4: Rendimientos luego de la sacarificación de muestras de mazorca y mazorca/salvado pretratadas en un reactor de pistón de barril grande.

Materia prima de alimentación	Concentración de DWB en el reactor	Liberación de monómero glucosa (% teor.)	Liberación de glucosa total (% teor.)	Liberación de monómero xilosa (% teor.)	Liberación de xilosa total (% teor.)
Sólo mazorca	45%	40,2	67,2	29,4	83,9
Mazorca + Salvado 80	45%	37,0	65,4	21,6	77,2

Ejemplo 5

Producción de etanol a partir de mazorcas de maíz pretratadas en el reactor de pistón de barril grande

El pretratamiento de mazorcas de maíz se llevó a cabo durante 10 minutos como se describe en el Ejemplo 2. Se llevó a cabo un total de 17 de dichos pretratamientos. Las mazorcas pretratadas de 4 pretratamientos se agruparon para la sacarificación para proporcionar un hidrolizado inicial para sacarificación por lote alimentado. Las mazorcas pretratadas de los 13 pretratamientos restantes se agruparon para su uso en la sacarificación por lote alimentado.

Para comenzar la sacarificación por lote alimentado, el reactor de sacarificación por lote alimentado descrito en los Métodos Generales se cargó primero con hidrolizado para rellenar el volumen del reactor hasta el fondo del primer impulsor. Este hidrolizado se preparó mediante la sacarificación de mazorcas pretratadas en matraces oscilantes de 2,8 L. Estos matraces oscilantes se cargaron con 465 g de sólidos pretratados, 1000 ml de agua DI y enzimas a razón de 28,4 mg de Spezyme® CP/g celulosa y 4,2 mg de proteína activa/g celulosa del grupo de enzimas de hemicelulasas (Diversa) 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 oscilación se mantuvieron a 50°C y 150 rpm en un agitador giratorio durante 48 hr, momento en el cual el hidrolizado se cargó en el reactor de lote

alimentado.

Una vez que el hidrolizado inicial se cargó, la primera alícuota de la mezcla de biomasa-amoniaco pretratada (~ 700 g) se agregó al reactor. El pH se mantuvo en un punto de referencia de 5,5 mediante la adición de 8,5% de H_3PO_4 . Una vez que el pH se reajustó al punto de referencia, se agregaron 28,4 mg de Spezyme® CP/g de celulosa y 4,2 mg de proteína activa/g celulosa del grupo de enzimas de hemicelulasas (Diversa) que comprendía β -glucosidasa, xilanasa, β -xilosidasa y arabinofuranosidasa. Se agregaron alícuotas adicionales de la mezcla de biomasa-amoniaco pretratada, celulosa Spezyme® CP y grupo de enzimas de hemicelulasas a $t = 4, 8, 12, 22, 26, 30$ y 34 hr. El circuito alrededor de la bomba comenzó en general aproximadamente 1 hr después de la adición de enzima y se llevó a cabo durante aproximadamente 1 hr hasta la adición de sólidos a las 22 hr. Después de las adiciones a las 26 hr y 30 hr, la bomba se encendió aproximadamente 50 min después de la adición de enzimas y se ejecutó durante 30 minutos. Después de la adición de las 34 hr, la bomba se encendió ~ 3 hr después de la adición de enzimas y se ejecutó durante 30 minutos. La bomba también se ejecutó durante 30 minutos a $t = 29, 33, 47$ y 49 hr. El tiempo de sacarificación total fue de 120 hr. En este momento, el hidrolizado contenía ~ 60 g/L de monómero glucosa, 25 g/L de monómero xilosa y 10 g/L de ácido acético.

Este hidrolizado se utilizó para la fermentación de las cepas de *Zymomonas mobilis* ZW800 o ZW658 (ATCC No. PTA-7858). ZW658 es una cepa de *Zymomonas mobilis* que se ha manipulado para la fermentación de xilosa para obtener etanol. ZW658 se construyó integrando dos operones, $P_{gap}xylAB$ y $P_{gap}talkt$, que contienen cuatro genes que utilizan xilosa que codifican xilosa isomerasa, xiluloquinasa, transaldolasa y transcetolasa, en el genoma de ZW1 (ATCC No. 31821) a través de eventos de transposición secuencial, y seguido por la adaptación en medios selectivos que contienen xilosa. ZW800 es la cepa ZW658 con el gen que codifica glucosa-fructosa oxidorreductasa inactivado.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en fermentadores de 1 litro esterilizados (sistema BIOSTAT® B-DCU, Sartorius BBI System Inc., Bethlehem, Pensilvania, EE.UU.) con 500 ml de volumen inicial de trabajo. Se agregó inóculo al fermentador a un nivel de 10% (v/v) de modo que la $OD_{600} \sim 1$ en el caldo después de la adición. El hidrolizado estaba presente en un 80% o 40% (v/v), siendo el resto agua. Se agregó glucosa y xilosa adicional 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 de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. La fermentación se llevó a cabo durante 72 hr a $33^\circ C$, pH 5,8 con 150 rpm de agitación. Las titulaciones de etanol finales para la cepa ZW800 fueron 8 g/L en el 40% de hidrolizado y 7 g/L en el 80% de hidrolizado. Para ZW658, las titulaciones de etanol finales fueron 8 g/L en el 40% de hidrolizado y 6,5 g/L en el 80% de hidrolizado.

REIVINDICACIONES

1. Un método para tratar la biomasa que comprende:
 - a) proporcionar:
 - i) biomasa, o
 - 5 ii) una mezcla de biomasa y una solución acuosa que comprende amoníaco, en donde el peso seco de la biomasa es al menos 15 por ciento en peso con respecto al peso total de la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso, y el amoníaco acuoso está en una cantidad que es menor que 12 por ciento en peso con respecto al peso seco de la biomasa;
 - 10 b) cargar la biomasa de (a)(i) o mezcla de (a)(ii) utilizando un alimentador de no compactación en un aparato que comprende:
 - i) un barril cilíndrico que tiene un primer extremo equipado con un pistón y un segundo extremo equipado con una válvula de descarga;
 - ii) opcionalmente, un desvío unido en un extremo desviado al barril cilíndrico cerca del primer extremo del barril cilíndrico, y que tiene una válvula sellable en el extremo desviado no unido;
 - 15 iii) al menos 2 puertos sellables en el barril cilíndrico o en el desvío;
 - iv) opcionalmente, una válvula en el barril cilíndrico que divide el barril en una primera y segunda cámaras separadas, teniendo dicha primera cámara el primer extremo del barril equipado con dicho pistón, y teniendo dicha segunda cámara el segundo extremo del barril con la válvula de descarga; y
 - v) un tanque de venteo unido a la válvula de descarga en el segundo extremo del barril;
 - 20 en donde dicha biomasa de (a)(i) está cargada en el barril cilíndrico u opcionalmente en dicho desvío unido a dicho barril cilíndrico o la válvula está presente en dicho barril cilíndrico y dicha biomasa de (a)(ii) está cargado en dicha primera cámara u opcionalmente en dicho desvío unido a dicho barril cilíndrico;
 - c) cerrar dicho barril cilíndrico y desvío, si están presentes;
 - d) opcionalmente aplicar vacío a través de al menos un puerto en el barril cilíndrico;
 - 25 e) agregar a través de al menos un puerto en el barril cilíndrico o desvío, si está presente, a la biomasa de (a)(i) una solución acuosa que comprende amoníaco en una cantidad que es menor que 12 por ciento en peso con respecto al peso seco de la biomasa en el barril, creando una mezcla de biomasa y amoníaco acuoso, y además en donde el peso seco de la biomasa se encuentra en una concentración de sólidos alta de al menos aproximadamente 15 por ciento en peso con respecto al peso de la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso, y agregar a esta mezcla o la
 - 30 mezcla cargada de (a)(ii) vapor a través de al menos un puerto en el barril cilíndrico o desvío, si está presente, para alcanzar una temperatura dentro del barril que sea de entre 85°C y 180°C;
 - f) cerrar los puertos en el barril cilíndrico o primera cámara y desvío, si están presentes, para proporcionar una cámara impermeable;
 - 35 g) mantener la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso en la cámara impermeable o primera cámara a una temperatura adecuada durante un tiempo que es de entre 30 segundos y 4 horas;
 - h) opcionalmente mover la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso a una segunda cámara en el barril cilíndrico, si está presente, mediante el desplazamiento a través de una válvula abierta con dicho pistón, en donde la biomasa no está compactada y, opcionalmente, cerrar la válvula abierta para formar una segunda cámara impermeable y mantener la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso durante un tiempo que es de entre 2 minutos y 4 horas;
 - 40 i) mover la mezcla de biomasa y amoníaco acuoso con dicho pistón a través del barril cilíndrico impermeable de (g) o (h) a través de la válvula de descarga sin compactarse en el tanque de venteo;
 - en donde la biomasa no está compactada y se produce la biomasa tratada.
2. El método de la reivindicación 1, en donde uno o más de los pasos (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) y (h) se repiten al menos una vez antes de (i).
- 45 3. El método de la reivindicación 1, en donde se incluye el paso de descompactación.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el amoníaco acuoso es entre 4% y 6% con respecto al peso seco de la biomasa.

5. El método de la reivindicación 1, en donde el peso seco de la biomasa es al menos 20% con respecto al peso de crear una mezcla de biomasa y amoníaco acuoso.
6. El método de la reivindicación 5, en donde el peso seco de la biomasa es al menos 30% con respecto al peso de crear una mezcla de biomasa y amoníaco acuoso.
- 5 7. El método de la reivindicación 6, en donde el peso seco de la biomasa es al menos 50% con respecto al peso de crear una mezcla de biomasa y amoníaco acuoso.
8. El método de la reivindicación 1, en donde la temperatura adecuada es de entre 120°C y 160°C.
9. El método de la reivindicación 1, en donde el alimentador de no compactación de (b) es una tolva equipada con un inductor de flujo de no compactación.
- 10 10. El método de la reivindicación 1, en donde la primera cámara cilíndrica se cierra con al menos una válvula.
11. El método de la reivindicación 1, en donde dicha biomasa deriva de múltiples materias primas.

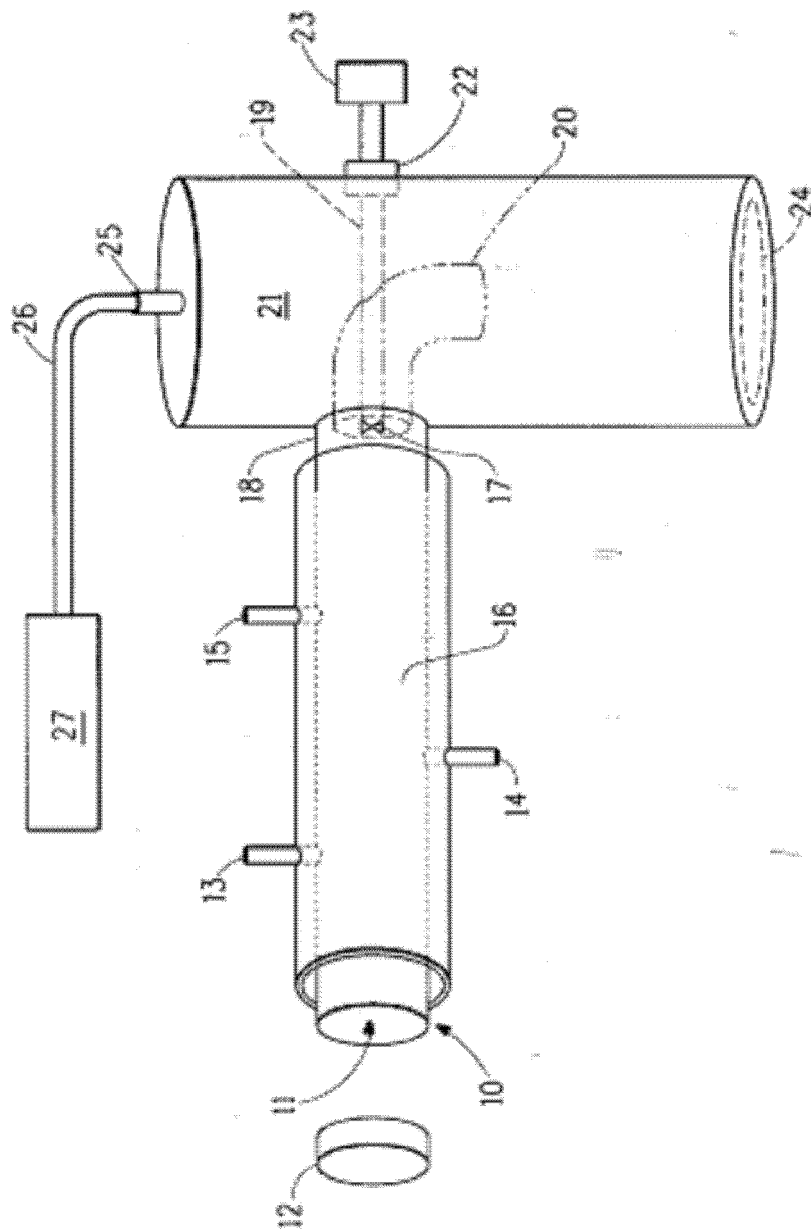


FIG. 1

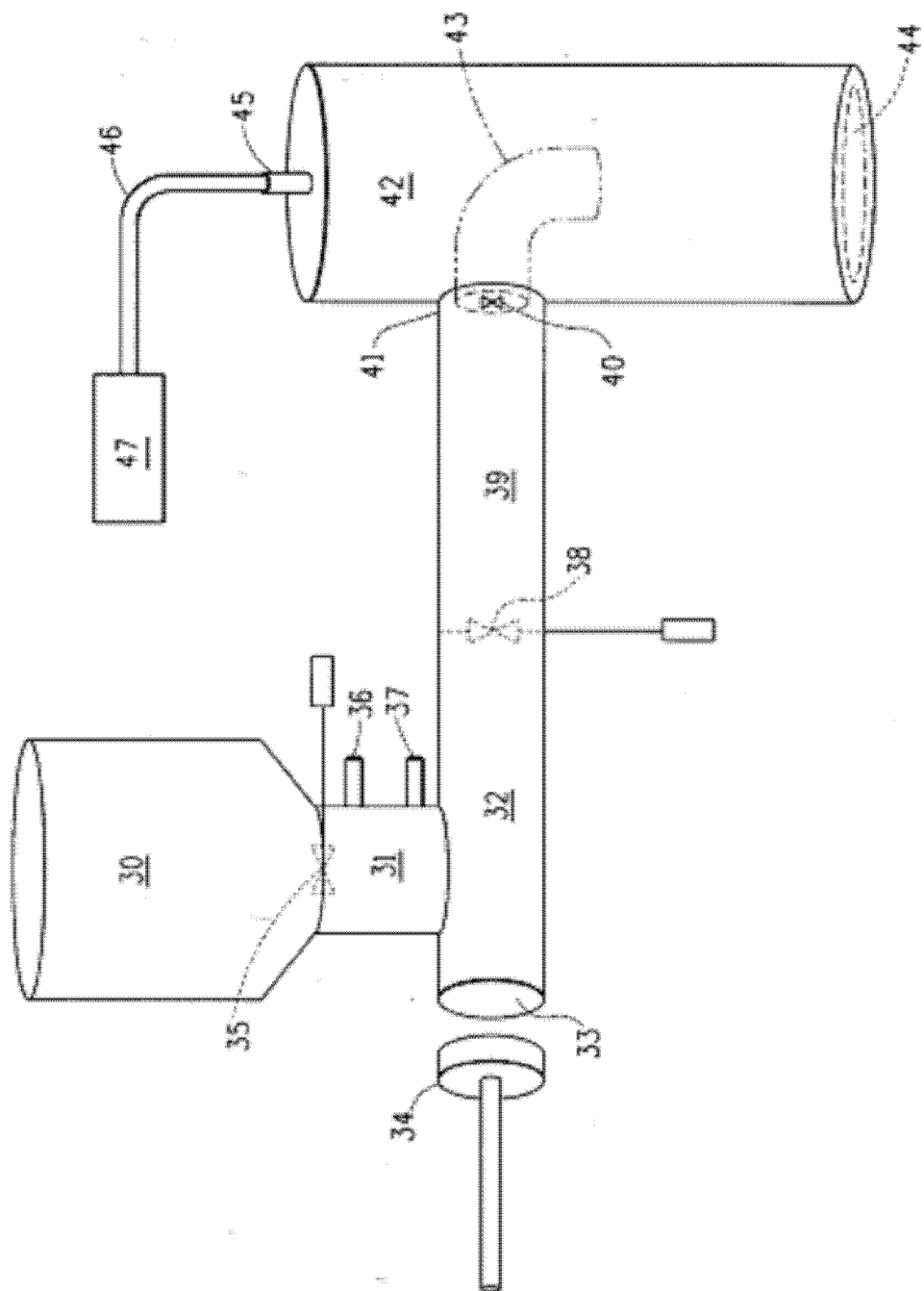


FIG. 2

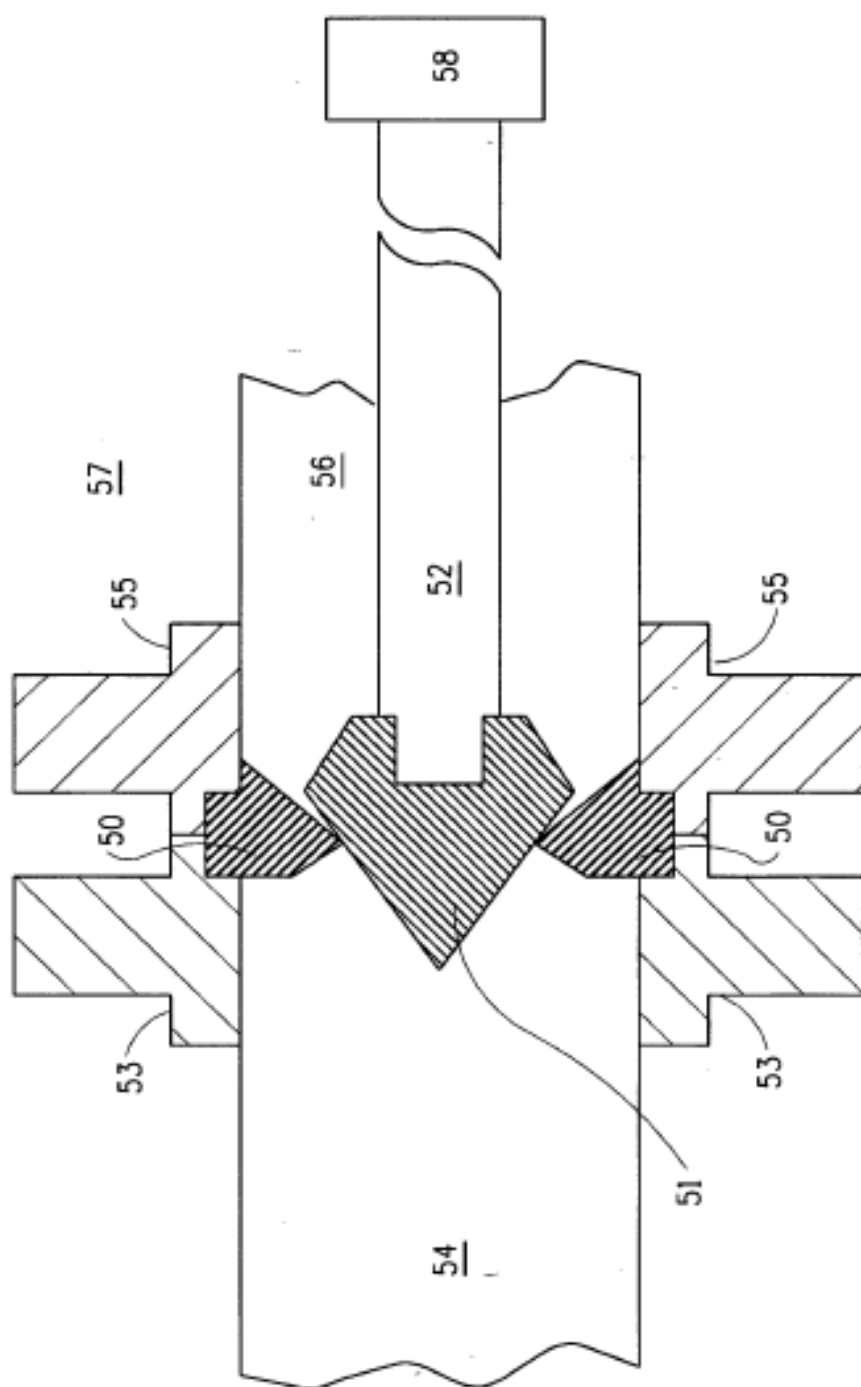


FIG. 3

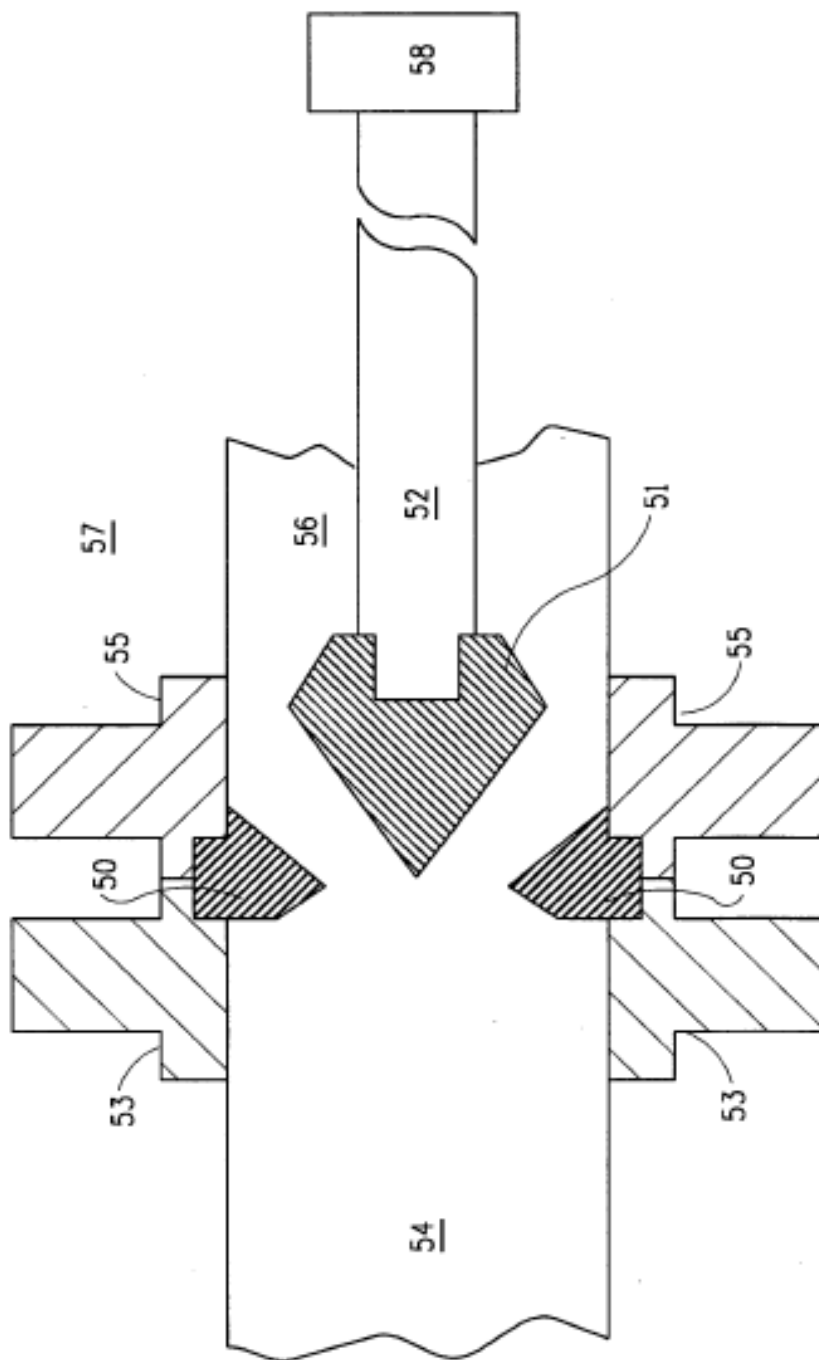


FIG. 4

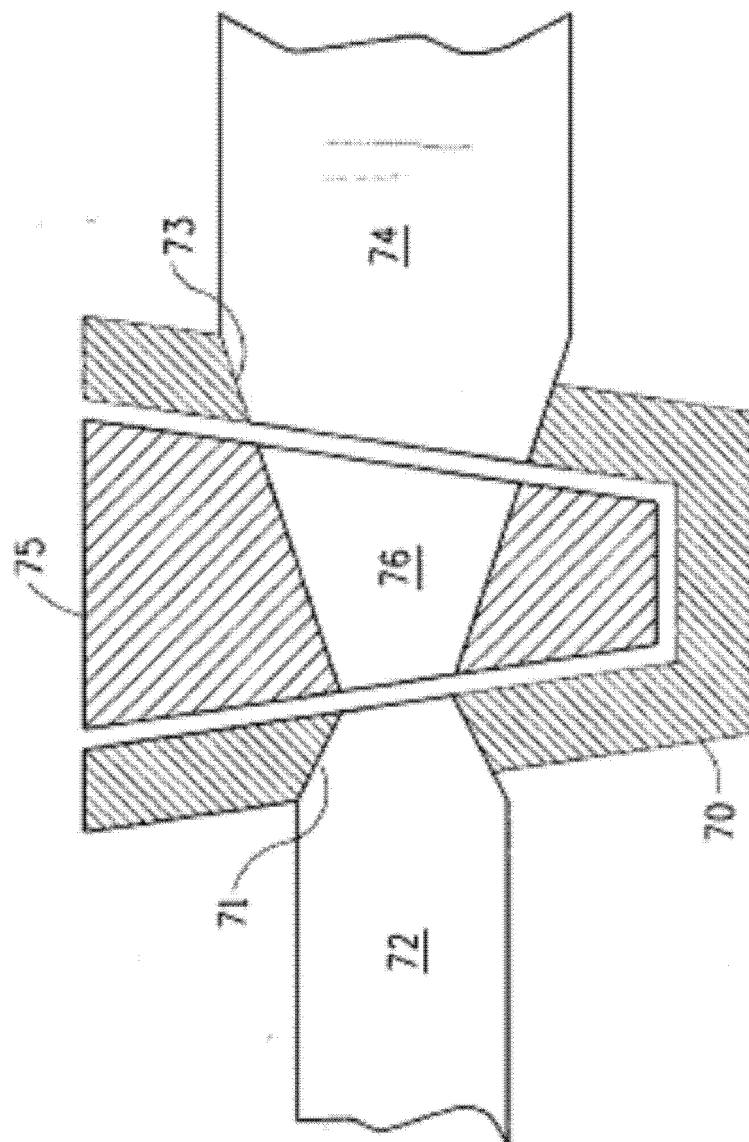


FIG. 5

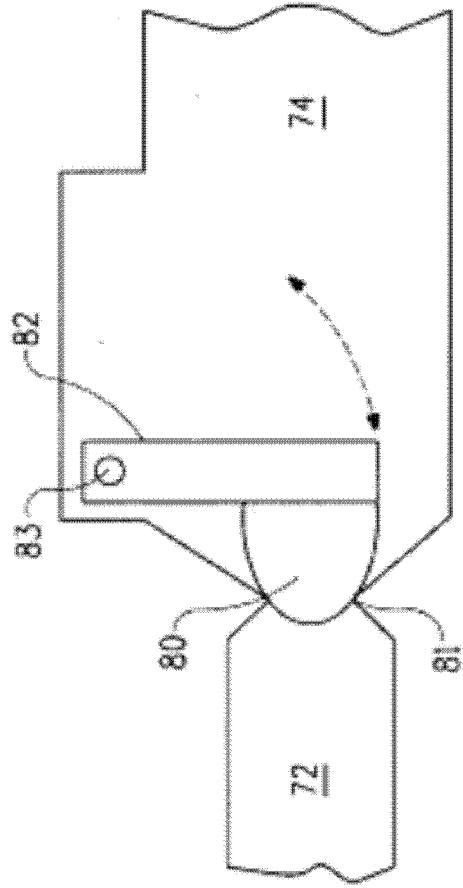


FIG. 6A

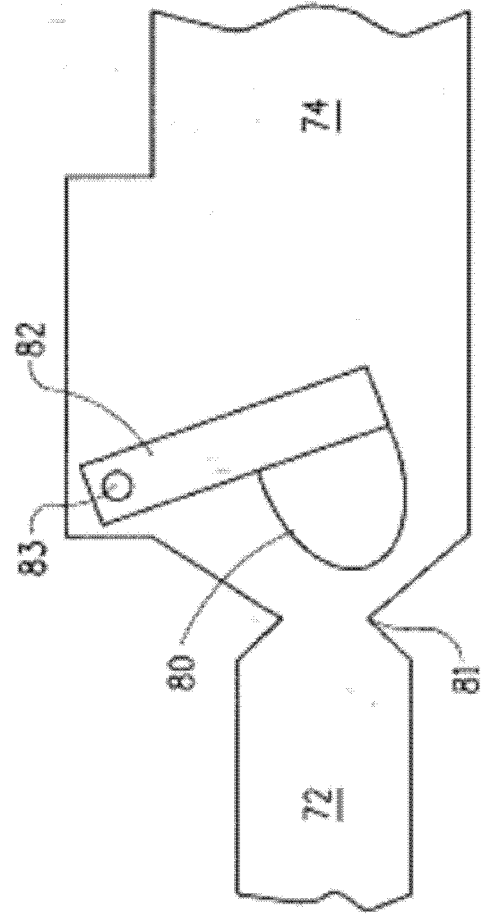


FIG. 6B