

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 777**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 1/20</b>	(2006.01) <b>C12P 7/54</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/04</b>	(2006.01) <b>C12P 7/56</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/06</b>	(2006.01) <b>C12P 7/58</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/16</b>	(2006.01) <b>C12P 7/64</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/18</b>	(2006.01) <b>C12P 5/02</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/20</b>	(2006.01) <b>C07H 3/00</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/40</b>	(2006.01) <b>C07H 3/02</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/42</b>	(2006.01) <b>C07H 3/04</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/46</b>	(2006.01) <b>C12P 19/02</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/52</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2009 E 09739618 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2279256**

54 Título: **Procesamiento de biomasa**

30 Prioridad:

**30.04.2008 US 49407 P**  
**03.04.2009 US 417840**

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

**06.04.2016**

73 Titular/es:

**XYLECO, INC. (100.0%)**  
**360 Audubon Road**  
**Wakefield, MA 01880-6248, US**

72 Inventor/es:

**MEDOFF, MARSHALL y**  
**MASTERMAN, THOMAS, CRAIG**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 565 777 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

Procesamiento de biomasa

**Campo técnico**

La invención se refiere a un método para producir un combustible.

**5 Antecedentes**

Diferentes hidratos de carbono, tales como materiales celulósicos y lignocelulósicos, p. ej., en forma fibrosa, se producen, procesan y usan en grandes cantidades en una serie de aplicaciones. A menudo dichos materiales se usan una vez y después se descartan como residuos, o simplemente se consideran materiales de desecho, p. ej., aguas residuales, bagazo, serrín y rastrojos.

10 Se han descrito diferentes materiales celulósicos y lignocelulósicos, sus usos y aplicaciones en las patentes de EE.UU. nº 7.307.108, 7.074.918, 6.448.307, 6.258.876, 6.207.729, 5.973.035 y 5.952.105; y diferentes solicitudes de patente, incluyendo "FIBROUS MATERIALS AND COMPOSITES," PCT/US2006/010648, presentada el 23 de marzo, 2006, y "FIBROUS MATERIALS AND COMPOSITES," publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2007/0045456.

15 Debido a que los materiales celulósicos y lignocelulósicos están disponibles de forma tan amplia, y los materiales celulósicos y lignocelulósicos de desecho deben ser eliminados, sería ventajoso darles un buen uso a dichos materiales. Se ha considerado el uso de los materiales celulósicos y lignocelulósicos para hacer biocombustibles tales como etanol, pero todavía no se ha implementado comercialmente a gran escala.

20 Van Zyl et al. (*Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 2007, 108:205-235) describe el bioprocesamiento consolidado para la producción de bioetanol usando *Saccharomyces cerevisiae*.

El documento US 4.769.082 describe que la eficacia de la sacarificación enzimática y la fermentación de celulosa en una fuente de celulosa residual se pueden aumentar mediante un tratamiento preliminar con radiación ionizante.

25 Mohagheghi et al. (*Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 98-100, 1 Abril 2002, pág. 885-898) describen la cofermentación de glucosa, xilosa y arabinosa por la cepa de *Zymomonas mobilis* AX101 fermentadora de xilosa/arabinosa integrado en el ADN genómico.

Fujita et al. (*Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no.-2, 1 de febrero de 2004, pág. 1207-1212) describe la sacarificación sinérgica y fermentación directa en etanol de celulosa amorfa usando una cepa de levadura modificada genéticamente que presenta simultáneamente tres tipos de enzimas celulolíticas.

**Resumen**

30 El objeto de la invención se presenta en las reivindicaciones adjuntas.

En algunos casos, la biomasa funcionalizada es más soluble y es usada más fácilmente por microorganismos en comparación con biomasa que no se ha funcionalizado. Además, muchos materiales funcionalizados descritos en la presente memoria tienen menos tendencia a la oxidación y pueden tener estabilidad a largo plazo potenciada (p. ej., oxidación al aire en condiciones ambientales). Muchos de los productos obtenidos, tales como etanol o n-butanol, se pueden usar como un combustible para alimentar coches, camiones, tractores, barcos o trenes; p. ej., como combustible de combustión interna o como materia prima para pila de combustible. Muchos de los productos obtenidos también se pueden usar para alimentación de aeronaves, tales como aviones, p. ej., los que tienen motores a reacción o helicópteros. Además, los productos descritos en la presente memoria se pueden usar para la generación de energía eléctrica, p. ej., en una instalación de generación de vapor convencional o en una instalación de pila de combustible.

35 40

La invención deriva de la comprensión de que la adición de biomasa, que es un material celulósico o lignocelulósico funcionalizado, a una mezcla que incluye un azúcar de bajo peso molecular, puede facilitar la conversión del azúcar de bajo peso molecular en un combustible tal como etanol. Los autores de la invención han encontrado que incluyendo la biomasa en una mezcla con un azúcar de bajo peso molecular, un disolvente o sistema disolvente y un microorganismo, mejora significativamente el rendimiento de un producto obtenido por conversión del azúcar, por ejemplo un alcohol tal como etanol, sin conversión o reducción drástica de la propia biomasa. La inclusión de la biomasa también puede prevenir la conversión de producto incompleta, lenta o "bloqueada", p. ej., por fermentación.

45

La propia biomasa no se convierte en sí misma en el producto (tal como etanol), junto con el azúcar de bajo peso molecular.

50 En algunos casos, la biomasa puede ser remanentes de un material celulósico o lignocelulósico que se ha sacarificado, p. ej., lignina y/u otros materiales que quedan después de convertir la celulosa en azúcar.

5 Por lo tanto, en un aspecto, la invención presenta un método que incluye convertir un azúcar de bajo peso molecular, o un material que incluye un azúcar de bajo peso molecular, en una mezcla que comprende una biomasa que se ha irradiado antes de mezclar, un microorganismo, y un disolvente o un sistema disolvente, p. ej., agua o una mezcla de agua y un disolvente orgánico, en un producto, por ejemplo, distinto de azúcar. Los ejemplos de disolventes o sistemas disolventes incluyen agua, hexano, hexadecano, glicerol, cloroformo, tolueno, acetato de etilo, éter de petróleo, gas licuado del petróleo (GLP), líquidos iónicos y mezclas de los mismos. El disolvente o sistema disolvente puede estar en forma de una sola fase o dos o más fases. La biomasa puede estar, p. ej., en forma fibrosa.

10 En algunos casos, el tener presente un material de biomasa tratado por irradiación durante la producción de un producto, tal como etanol, puede potenciar la tasa de producción del producto. Sin querer estar ligados por ninguna teoría particular, se cree que tener un sólido presente, tal como un sólido de superficie específica alta y/o porosidad alta, puede aumentar las tasas de reacción aumentando la concentración eficaz de los solutos y proporcionando un sustrato sobre el que producirse las reacciones.

15 Por ejemplo, se puede añadir un material de biomasa irradiado, p. ej., una fibra de papel, a un procedimiento de fermentación, tal como durante una fermentación de maíz-etanol o una fermentación de extracto de caña de azúcar, para aumentar la tasa de producción en 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100 por ciento o más, p. ej., 150 por ciento. El material de biomasa puede tener una superficie específica alta, alta porosidad, y/o baja densidad aparente. En algunas realizaciones, la biomasa está presente en la mezcla de aproximadamente 0,5 por ciento a aproximadamente 50 por ciento en peso, tal como entre aproximadamente 1 por ciento en peso y aproximadamente 25 por ciento en peso, o entre aproximadamente 2 por ciento en peso y aproximadamente 12,5 por ciento en peso. En otras realizaciones, la biomasa está presente en cantidades mayores de aproximadamente 0,5 por ciento en peso, tales como mayores de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso mayor de aproximadamente 10 por ciento en peso.

25 Debido a que el material de biomasa no es consumido él mismo durante el procedimiento de conversión, el material de biomasa se puede reutilizar en procedimientos de múltiples lotes, o se puede usar de forma continua para la producción de un volumen relativamente grande del producto.

Algunas implementaciones incluyen una o más de las siguientes características.

30 La biomasa puede comprender un material fibroso. La conversión puede incluir permitir que el microorganismo convierta al menos una parte del azúcar de bajo peso molecular en etanol. La conversión comprende fermentación. Los microorganismos pueden comprender una levadura, p. ej., seleccionada del grupo que consiste en *S. cerevisiae* y *P. stipitis*, o una bacteria tal como *Zymomonas mobilis*. La conversión puede presentar un % de rendimiento de al menos 140%, en algunos casos al menos 170%.

35 El método incluye irradiar la biomasa fibrosa antes de la mezcla, con radiación ionizante, con una dosis total de al menos 5 Mrad. La irradiación se puede llevar a cabo usando un haz de partículas. La irradiación se puede llevar a cabo en condiciones seleccionadas para reducir el peso molecular de la biomasa.

La biomasa puede tener una densidad aparente de menos de aproximadamente 0,5 g/cm<sup>3</sup>. La biomasa puede tener una superficie específica BET mayor que 0,25 m<sup>2</sup>/g y/o una relación de longitud a diámetro de al menos 5. La biomasa puede tener una porosidad mayor que 50%, p. ej., mayor que 70%.

40 El método puede incluir además preparar la biomasa físicamente, p.ej., por cizalladura, o reduciendo el tamaño de la biomasa con muela abrasiva, corte o desgarrado mecánico, trituración por rectificadora, o molienda por abrasión con aire. La biomasa puede tener fibras internas, y se puede haber cizallado en una extensión tal que sus fibras internas estén sustancialmente expuestas.

45 La biomasa es o incluye un material celulósico o lignocelulósico. Por ejemplo, la biomasa se puede seleccionar del grupo que consiste en papel, productos de papel, residuos de papel, madera, tableros de partículas, serrín, residuos agrícolas, aguas residuales, ensilado, hierbas, cáscaras de arroz, bagazo, algodón, yute, cáñamo, lino, bambú, sisal, abacá, paja, mazorcas de maíz, rastrojo de maíz, mijos, alfalfa, heno, cáscaras de arroz, fibra de coco, algodón, algas marinas, algas, y mezclas de los mismos.

50 En la presente memoria se describen materiales que incluyen una pluralidad de unidades de sacáridos dispuestos en una cadena molecular, en donde aproximadamente 1 de cada 2 a aproximadamente 1 de cada 250 unidades de sacárido incluyen un grupo ácido carboxílico, o un éster o sal del mismo. En otro aspecto, los materiales incluyen una pluralidad de dichas cadenas moleculares. Por ejemplo, aproximadamente 1 de cada 8, 1 de cada 10, 1 de cada 50 o 1 de cada 100 unidades de sacárido de cada cadena puede incluir un grupo ácido carboxílico, o un éster o sal del mismo. En algunas realizaciones, las unidades de sacárido pueden incluir unidades de sacáridos de 5 o 6 carbonos. Cada cadena puede tener entre aproximadamente 100 y aproximadamente 200 unidades de sacárido, p. ej., entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 o entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50. Por ejemplo, cada cadena puede incluir hemicelulosa o celulosa. En algunas realizaciones, cada cadena también incluye unidades de sacárido que incluyen grupos nitroso, nitro o nitrilo.

En algunas realizaciones, el peso molecular medio de los materiales con respecto a los patrones de PEG pueden ser de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 1.000.000, tal como entre 1.500 y 200.000 o 2.000 y 10.000. Por ejemplo, el peso molecular medio de los materiales con respecto a los patrones de PEG puede ser menor de aproximadamente 10.000.

5 Los ejemplos de materia prima de biomasa incluyen papel, productos de papel, residuos de papel, madera, tableros de partículas, serrín, residuos agrícolas, aguas residuales, ensilado, hierbas, cáscaras de arroz, bagazo, algodón, yute, cáñamo, lino, bambú, sisal, abacá, paja, mazorcas de maíz, rastrojo de maíz, mijos, alfalfa, heno, cáscaras de arroz, fibra de coco, algodón, celulosas sintéticas, algas marinas, algas, o mezclas de los mismos. La biomasa puede ser o puede incluir un material natural o uno sintético.

10 Los ejemplos de combustibles incluyen uno o más de hidrógeno, alcoholes e hidrocarburos. Por ejemplo, los alcoholes pueden ser etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, o mezclas de estos.

La irradiación se puede llevar a cabo, p. ej., usando una radiación ionizante, tal como rayos gamma, un haz de electrones, una radiación ultravioleta C que tiene una longitud de onda de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 280 nm. La irradiación se puede realizar usando múltiples aplicaciones de radiación. La radiación ionizante puede incluir radiación de haz de electrones. Por ejemplo, la radiación se puede aplicar con una dosis total de entre aproximadamente 10 Mrad y aproximadamente 150 Mrad, tal como una dosis por unidad de tiempo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 Mrad/día, o de 1 Mrad/s a aproximadamente 10 Mrad/s. En algunas realizaciones, la irradiación incluye aplicar dos o más fuentes de radiación, tales como rayos gamma y un haz de electrones.

20 En algunas realizaciones, la biomasa incluye una primera celulosa que tiene un primer peso molecular medio numérico y el material de hidrato de carbono comprende una segunda celulosa que tiene un segundo peso molecular medio numérico menor que el primer peso molecular medio numérico. Por ejemplo, el segundo peso molecular medio numérico es menor que el primer peso molecular medio numérico en más de aproximadamente 1 vez. En algunas realizaciones, la primera celulosa tiene una primera cristalinidad, y la segunda celulosa tiene una segunda cristalinidad menor que la primera cristalinidad. Por ejemplo, la segunda cristalinidad puede ser menor que la primera cristalinidad en más de aproximadamente 10 por ciento.

En algunas realizaciones, la primera celulosa puede tener un primer nivel de oxidación y la segunda celulosa tiene un segundo nivel de oxidación mayor que el primer nivel de oxidación.

30 El material de biomasa puede incluir además un tampón, tal como bicarbonato sódico o cloruro amónico, un electrolito, tal como cloruro potásico o cloruro sódico, un factor de crecimiento, tal como biotina y/o un par de bases tal como uracilo, un tensioactivo, un mineral, o un agente quelante.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen el pretratamiento con uno o más métodos de pretratamiento además de la irradiación. Por ejemplo, los dos o más métodos de pretratamiento diferentes pueden incluir radiación y ultrasonidos, radiación y oxidación, y radiación y pirólisis. Opcionalmente, el pretratamiento de la biomasa puede incluir explosión de vapor.

35 Para ayudar más en la reducción del peso molecular de la biomasa, se puede usar una enzima, p. ej., una enzima celulolítica, o un compuesto químico, p. ej., hipoclorito sódico, un ácido, una base o un agente de hinchamiento, con cualquier método descrito en la presente memoria. El tratamiento con enzima y/o producto químico pueden producirse antes, durante o después de la irradiación u otro pretratamiento.

40 Cuando se usa un microorganismo, puede ser un microorganismo natural o un microorganismo genéticamente modificado. Por ejemplo, un microorganismo puede ser una bacteria, un hongo, p. ej., una levadura, una planta o un protista, p. ej., un alga, un protozoo o un protista de tipo hongo, p. ej., moho del fango. Cuando los organismos son compatibles, se pueden usar mezclas.

45 Los ejemplos de productos que se pueden producir usando los métodos descritos en la presente memoria incluyen alcoholes alquílicos C1-C6 mono y polifuncionales y ácidos carboxílicos mono y polifuncionales, hidrocarburos C1-C6, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos específicos de alcoholes adecuados incluyen metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, etilenglicol, propilenglicol, 1,4-butanodiol, glicerina, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos específicos de ácidos carboxílicos adecuados incluyen ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caproico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido  $\gamma$ -hidroxibutírico, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de hidrocarburos adecuados incluyen metano, etano, propano, pentano, n-hexano, y combinaciones de los mismos. Muchos de estos productos se pueden usar como combustibles. Otros productos se describen en la solicitud provisional de EE.UU. nº de serie 61/139.453. Los productos o coproductos pueden ser productos dirigidos a ser usados como producidos o los productos producidos

50 pueden ser productos intermedios para cualquier otro procedimiento descrito en la presente memoria o cualquier procedimiento descrito en cualquier solicitud descrita en la presente memoria.

55 Los ejemplos de microorganismos que se pueden usar para producir productos útiles, incluyen bacterias, levaduras

o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el microorganismo puede ser una bacteria, un hongo, p. ej., una levadura, una planta o un protista, p. ej., un alga, un protozoo o un protista de tipo hongo, p. ej., moho del fango.

En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, la radiación se puede aplicar de un dispositivo que está en una cámara aislada.

- 5 La expresión “material fibroso”, como se usa en la presente memoria”, es un material que incluye numerosas fibras sueltas, discretas y separables. Por ejemplo, un material fibroso se puede preparar a partir de una fuente de fibra de papel Kraft blanqueado por cizalladura, p. ej., con una cortadora de cuchillas rotativas.

10 El término “tamiz”, como se usa en la presente memoria, significa un elemento capaz de cribar el material según el tamaño. Los ejemplos de tamices. Los ejemplos de tamices incluyen una placa, cilindro o similar perforados, o una malla de alambre o tela.

El término “pirólisis”, como se usa en la presente memoria, significa romper enlaces en un material mediante la aplicación de energía térmica. La pirólisis se puede producir mientras el material objeto está bajo vacío, o sumergido en un material gaseoso, tal como un gas oxidante, p. ej., aire u oxígeno, o un gas reductor, tal como hidrógeno.

15 El contenido de oxígeno se mide por análisis elemental mediante pirólisis de una muestra en un horno que trabaja a 1300°C o superior.

20 El término “biomasa” incluye cualquier materia orgánica, no fosilizada, es decir, renovable. Los diferentes tipos de biomasa incluyen biomasa vegetal (definido más adelante), biomasa microbiana, biomasa animal (cualquier subproducto animal, desechos animales, etc.) y biomasa de residuos municipales (basura residencial y comercial con materiales reciclables como el metal y el vidrio retirados). El término biomasa incluye también materiales celulósicos vírgenes o de postconsumo, tales como trapos y toallas fabricados de algodón o una mezcla de algodón.

25 La expresión “biomasa vegetal” o “biomasa lignocelulósica” se refiere a prácticamente cualquier materia orgánica derivada de plantas (leñosa o no leñosa). La biomasa vegetal puede incluir, pero no está limitado a cultivos agrícolas o alimentarios (p. ej., caña de azúcar, remolachas azucareras o granos de maíz) o un extracto de los mismos (p. ej., azúcar de la caña de azúcar y almidón de maíz del maíz), cultivos agrícolas y residuos de cultivos agrícolas y residuos tales como rastrojo de maíz, paja de trigo, paja de arroz, bagazo de caña de azúcar, algodón y similares. La biomasa vegetal incluye además, pero no se limita a árboles, cultivos leñosos para energía, restos madereros y residuos tales como sacas de bosques de coníferas, restos de cortezas, serrín, papel y corrientes residuales de la industrial de la pasta papelera, fibra de madera, y similares. Además, cultivos de hierbas como el mijo y similares tienen potencial para ser producidos a gran escala como otra fuente de biomasa vegetal. Para zonas urbanas, la mejor potencial materia prima de biomasa vegetal incluye restos de jardines (p. ej., corte de césped, hojas, podas de árboles y arbustos) y restos de procesamiento de verduras.

30 La “materia prima lignocelulósica” es cualquier tipo de biomasa vegetal tal como, pero no limitado a biomasa vegetal no leñosa, cultivos cultivados tales como, pero no limitado a hierbas, por ejemplo, pero no limitado a hierbas C4, tales como mijo, espartina, raigrás, miscanthus, hierba cinta, o una combinación de los mismos, o restos del procesado del azúcar, tales como bagazo, o pulpa de remolacha, restos agrícolas, por ejemplo, rastrojo de soja, rastrojo de maíz, paja de arroz, cáscaras de arroz, rastrojo de cebada, mazorcas de maíz, paja de trigo, paja de canola, paja de arroz, paja de avena, cáscaras de avena, fibra de maíz, fibra de pasta de madera reciclada, serrín, madera dura, por ejemplo, madera y serrín de álamo, madera blanda, o una combinación de los mismos. Además, la materia prima lignocelulósica puede incluir material residual celulósico tal como, pero no limitado a papel de periódico, carbón, serrín y similares.

35 La materia prima lignocelulósica puede incluir una especie de fibra o alternativamente, la materia prima lignocelulósica puede incluir una mezcla de fibras que proceden de diferentes materias primas lignocelulósicas. Además, la materia prima lignocelulósica puede comprender materia prima lignocelulósica reciente, materia prima lignocelulósica parcialmente secada, materia prima lignocelulósica totalmente secada o una combinación de los mismos.

40 Para los fines de esta descripción, los hidratos de carbono son materiales que están compuestos enteramente de una o más unidades de sacárido, o que incluyen una o más unidades de sacárido. Las unidades de sacárido pueden estar funcionalizadas en el anillo con uno o más grupos funcionales, tales como grupos ácido carboxílico, grupos amino, grupos nitro, grupos nitroso o grupos nitrilo, y todavía se consideran hidratos de carbono. Los hidratos de carbono pueden ser poliméricos (p. ej., con un número de unidades monómeras igual o mayor que 10, 100, 1.000, 10.000 o 100.000), oligómeros (p. ej., con un número de unidades monómeras igual o mayor que 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10), trímeras, dímeras o monómeras). Cuando los hidratos de carbono están formados de más de una sola unidad que se repite, cada unidad que se repite puede ser igual o diferente.

45 Los ejemplos de hidratos de carbono polímeros incluyen celulosa, xilano, pectina y almidón, mientras que la celobiosa y lactosa son ejemplos de hidratos de carbono dímeros. Los ejemplos de hidratos carbono monómeros incluyen glucosa y xilosa.

Los hidratos de carbono pueden ser parte de una estructura supramolecular, p. ej., unidos covalentemente en la estructura. Los ejemplos de dichos materiales incluyen materiales lignocelulósicos, tales como los encontrados en la madera.

5 Un material amiláceo es uno que es o incluye cantidades significativas de almidón o un derivado de almidón, tal como más de aproximadamente 5 por ciento en peso de almidón o derivado de almidón. Para los fines de esta descripción, un almidón es un material que es o incluye una amilosa, una amilopectina, o una mezcla física y/o química de los mismos, p. ej., una mezcla de 20:80 o 30:70 por ciento en peso de amilosa a amilopectina. Los derivados de almidón incluyen, p. ej., maltodextrina, almidón modificado con ácido, almidón modificado con base, almidón blanqueado, almidón oxidado, almidón acetilado, almidón acetilado y oxidado, almidón modificado con fosfato, almidón genéticamente modificado, y almidón que es resistente a la digestión.

10 Para los fines de esta descripción, un azúcar de bajo peso molecular es un hidrato de carbono o un derivado del mismo que tiene un peso fórmula (excluyendo humedad), que es menor que aproximadamente 2.000, p. ej., menos que aproximadamente 1.800, 1.600, menor que aproximadamente 1.000, menor que aproximadamente 500, menor que aproximadamente 350 o menor que aproximadamente 250. Por ejemplo, el azúcar de peso molecular bajo puede ser un monosacárido, p. ej., glucosa o xilosa, un disacárido, p. ej., celobiosa o sacarosa, o un trisacárido.

15 Un combustible es un material capaz de arder en presencia de oxígeno. Los ejemplos de combustibles incluyen etanol, n-propanol, n-butanol, hidrógeno y mezclas de cualesquiera dos o más de estos.

20 Los agentes de hinchamiento como se usa en la presente memoria, son materiales que producen un hinchamiento discernible, p. ej., un aumento de 2,5 por ciento del volumen respecto al estado no hinchado de los materiales celulósicos y/o lignocelulósicos, cuando se aplican a dichos materiales como una solución, p. ej., una solución en agua. Los ejemplos incluyen sustancias alcalinas, tales como hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido de litio e hidróxido amónico, agentes acidificantes, tales como ácidos minerales (p. ej., ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y ácido fosfórico), sales tales como cloruro de cinc, carbonato de calcio, carbonato sódico, sulfato de benciltrimetilamonio, y aminas orgánicas básicas, tales como etilendiamina.

25 Un "material cizallado", como se usa en la presente memoria, es un material que incluye fibras discretas en las que al menos aproximadamente 50% de las fibras discretas tienen una relación de longitud/diámetro (L/D) de al menos aproximadamente 5, y que tiene una densidad aparente no comprimida menor que aproximadamente 0,6 g/cm<sup>3</sup>. Un material cizallado es, por lo tanto, diferente de un material que se ha cortado, picado o triturado.

30 Cambiar una estructura molecular de una materia prima de biomasa, como se usa en la presente memoria, significa cambiar la disposición de enlaces químicos, tal como el tipo y cantidad de grupos funcionales o la conformación de la estructura. Por ejemplo, el cambio en la estructura molecular puede incluir cambiar la estructura supramolecular del material, oxidación del material, cambiar un peso molecular medio, cambiar una cristalinidad media, cambiar una superficie específica, cambiar un grado de polimerización, cambiar una porosidad, cambiar un grado de ramificación, injerto en otros materiales, cambiar un tamaño del dominio cristalino, o un cambiar el tamaño de dominio global.

35 Salvo que se define de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva incluyendo definiciones. Además, los materiales, métodos y  
40 ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y de las reivindicaciones.

### Descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama de bloques que ilustra la conversión de biomasa en productos y coproductos.

45 La figura 2 es un diagrama de bloques que ilustra la conversión de una fuente de fibra en un primer y segundo material fibroso.

La figura 3 es una vista de corte transversal de una cortadora de cuchillas rotativas.

La figura 4 es un diagrama de bloques que ilustra la conversión de una fuente de fibra en un primer, segundo y tercer material fibroso.

50 La figura 5 es un diagrama de bloques que ilustra la densificación de un material.

La figura 6 es una vista en perspectiva de un molino de pelets.

La figura 7A es un material fibroso densificado en forma de pelets.

- La figura 7B es un corte transversal de un pelet hueco en el que un centro del hueco está alineado con un centro del pelet.
- La figura 7C es un corte transversal de un pelet hueco en el que un centro del hueco no está alineado con un centro del pelet.
- 5 La figura 7D es un corte transversal de un pelet trilobular.
- La figura 8 es un diagrama de bloques que ilustra una secuencia de tratamiento para el procesamiento de la materia prima.
- La figura 9 es una vista en corte, en perspectiva, de un dispositivo de irradiación gamma albergado en una cámara de cemento.
- 10 La figura 10 es una vista en perspectiva aumentada de la región R de la figura 9.
- La figura 11A es un diagrama de bloques que ilustra una secuencia de pretratamiento de materia prima por irradiación con haz de electrones.
- La figura 11B es una representación esquemática de biomasa que es ionizada, y después oxidada o inactivada.
- 15 La figura 12 es una vista esquemática de un sistema para el tratamiento por ultrasonidos de una corriente del procedimiento del material celulósico en un medio líquido.
- La figura 13 es una vista esquemática de un dispositivo de ultrasonidos que tiene dos transductores acoplados a un solo sonotrodo.
- La figura 14 es un diagrama de bloques que ilustra un sistema de pretratamiento pirólítico de la materia prima.
- La figura 15 es una vista lateral de corte transversal de una cámara de pirólisis.
- 20 La figura 16 es una vista lateral de corte transversal de una cámara de pirólisis.
- La figura 17 es una vista lateral de corte transversal de un pirolizador que incluye un filamento calentado.
- La figura 18 es una vista lateral esquemática del corte transversal de un pirolizador Curie-Point.
- La figura 19 es una vista lateral esquemática del corte transversal de un pirolizador de horno.
- La figura 20 es una vista superior esquemática del corte transversal de un aparato de pirólisis por láser.
- 25 La figura 21 es una vista superior esquemática del corte transversal de un pirolizador flash de filamento de tungsteno.
- La figura 22 es un diagrama de bloques que ilustra un sistema de pretratamiento oxidativo de la materia prima.
- La figura 23 es un diagrama de bloques que ilustra una visión general del procedimiento de conversión de una fuente de fibra en un producto, p. ej., etanol.
- 30 La figura 24 es una vista de corte transversal de un aparato de explosión de vapor.
- La figura 25 es una vista lateral esquemática del corte transversal de un dispositivo híbrido de haz de electrones/ultrasonidos.
- 35 La figura 26 es una micrografía electrónica de barrido de un material fibroso producido a partir de papel polirrevestido con 25X aumentos. El material fibroso se produjo en una cortadora de cuchillas rotativas usando un tamiz con aberturas de 3,17 mm (1/8 pulgadas).
- La figura 27 es una micrografía electrónica de barrido de un material fibroso producido a partir de cartón Kraft con 25X aumentos. El material fibroso se produjo en una cortadora de cuchillas rotativas usando un tamiz con aberturas de 3,17 mm (1/8 pulgadas).
- 40 La figura 28 es una micrografía electrónica de barrido de un material fibroso producido a partir de cartón Kraft blanqueado con 25X aumentos. El material fibroso se cizalló dos veces en una cortadora de cuchillas rotativas usando un tamiz con aberturas de 1,59 mm (1/16 pulgadas) durante cada cizalladura.
- 45 La figura 29 es una micrografía electrónica de barrido de un material fibroso producido a partir de cartón Kraft blanqueado con 25X aumentos. El material fibroso se cizalló tres veces en una cortadora de cuchillas rotativas. Durante la primera cizalladura, se usó un tamiz de 3,17 mm (1/8 pulgadas); durante la segunda cizalladura se usó un tamiz de 1,59 mm (1/16 pulgadas), y durante la tercera cizalladura se usó un tamiz de 0,79 mm (1/32 pulgadas).

Las figuras 29A-29F son espectros Raman 3-D de la superficie de las fibras de las muestras P132, P132-10, P132-100, P-1e, P-30e, y P-100e, respectivamente.

La figura 30 es una vista lateral esquemática de un aparato de ultrasonidos, mientras que la figura 31 es una vista del corte transversal a través de la celda de procesamiento de la figura 30.

- 5 La figura 32 es una micrografía electrónica de barrido con 1000 X aumentos de un material fibroso producido por cizallado de mijo de en una cortadora de cuchillas rotativas, y después pasando el material cizallado a través de un tamiz de 0,79 mm (1/32 pulgadas).

Las figuras 33 y 34 son micrografías de barrido electrónico del material fibroso de la figura 32 después de irradiación con rayos gamma de 10 Mrad y 100 Mrad, respectivamente, con 1000 X aumentos.

- 10 La figura 35 es una micrografía electrónica de barrido del material fibroso de la figura 32 después de irradiación con 10 Mrad y tratamiento con ultrasonidos con 1000 X aumentos.

La figura 36 es una micrografía electrónica de barrido del material fibroso de la figura 32 después de irradiación con 100 Mrad y tratamiento con ultrasonidos con 1000 X aumentos.

La figura 37 es un espectro de infrarrojos de cartón Kraft cizallado en una cortadora de cuchillas rotativas.

- 15 La figura 38 es un espectro de infrarrojos del papel Kraft de la figura 37 después de irradiación con 100 Mrad de radiación gamma.

Las figuras 38A-38I son espectros de RMN de <sup>1</sup>H de las muestras P132, P132-10, P132-100, P-1e, P-5e, P-10e, P-30e, P-70e, y P-100e del ejemplo 23. La figura 38J es una comparación del protón intercambiable a ~16 ppm de las figuras 38A-38I. La figura 38K es un RMN de <sup>13</sup>C de la muestra P-100e. Las figuras 38L-38M son RMN de <sup>13</sup>C de la muestra P-100e con un tiempo de retardo de 10 segundos. La figura 38N es un RMN de <sup>1</sup>H con una concentración de 10% en p/p de la muestra P-100e.

- 20

La figura 39 es una vista esquemática de un procedimiento para la conversión de biomasa.

La figura 40 es una vista esquemática de otro procedimiento para la conversión de biomasa.

### Descripción detallada

- 25 Azúcares de bajo peso molecular se pueden procesar para producir combustibles, p. ej., combustibles para motores de combustión interna, motores a reacción o materias primas para pilas de combustible. Además, los materiales funcionalizados que tienen los tipos y cantidades deseadas de grupos funcionales, tales como grupos ácido carboxílico, grupos enol, grupos aldehído, grupos cetona, grupos nitrilo, grupos nitro o grupos nitroso, se pueden preparar usando los métodos descritos en la presente memoria. Dichos materiales funcionalizados pueden ser, p. ej., más solubles, más fáciles de usar por diferentes microorganismos o pueden ser más estables a largo plazo, p. ej., menos propensos a la oxidación.

- 30

#### Tipos de biomasa

El material de biomasa puede ser materiales celulósicos o lignocelulósicos, materiales amiláceos.

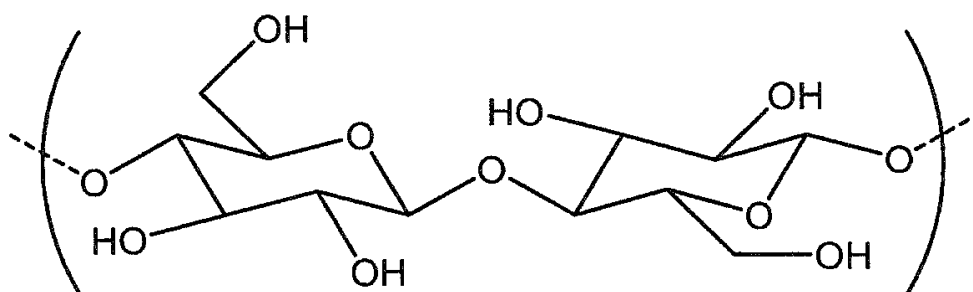
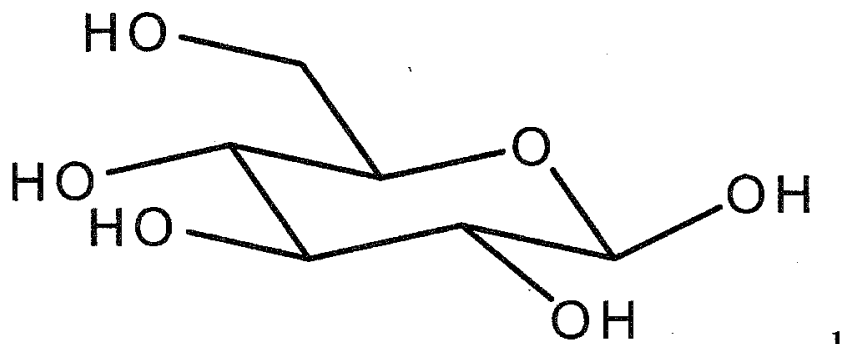
- 35 Por ejemplo, dichos materiales pueden incluir papel, productos de papel, madera, materiales relacionados con la madera, tableros de partículas, hierbas, cáscaras de arroz, bagazo, algodón, yute, cáñamo, lino, bambú, sisal, abacá, paja, mazorcas de maíz, cáscaras de arroz, fibra de coco, algas, algas marinas, algodón, celulosas sintéticas, o mezclas de cualquiera de estos. Los materiales adecuados incluyen los listados en la sección de Resumen, anterior.

- 40 La fuentes de fibras incluyen fuentes de fibras celulósicas, incluyendo papel y productos de papel (p. ej., papel polirrevestido y papel Kraft), y fuentes de fibras lingocelulósicas, incluyendo madera y materiales relacionados con la madera, p. ej., tableros de partículas. Otras fuentes de fibras adecuadas incluyen fuentes de fibras naturales, p. ej., hierbas, cáscaras de arroz, bagazo, algodón, yute, cáñamo, lino, bambú, sisal, abacá, paja, mazorcas de maíz, cáscaras de arroz, fibra de coco; fuentes de fibras con alto contenido en  $\alpha$ -celulosa, p. ej., algodón; y fuentes de fibras sintéticas, p. ej., hilo extruido (hilo orientado o hilo no orientado). Las fuentes de fibras naturales o sintéticas se pueden obtener de materiales textiles en trozos vírgenes, p. ej., remanentes o pueden ser residuos postconsumo, p. ej., trapos. Cuando se usan productos de papel como fuentes de fibra, pueden ser materiales vírgenes, p. ej., materiales vírgenes en trozos, o pueden ser residuos postconsumo. A parte de los materiales brutos vírgenes, también se pueden usar residuos postconsumo, industriales (p. ej., despojos), y residuos de procesamiento (p. ej., efluente del procesado del papel) como fuentes de fibras. Además, la fuente de fibra se puede obtener o derivar de
- 45
- 50 residuos humanos (p. ej., aguas residuales), animales o vegetales. Se han descrito fuentes de fibras adicionales en las patentes de EE.UU. n° 6.448.307, 6.258.876, 6.207.729, 5.973.035 y 5.952.105.

En algunas realizaciones, el hidrato de carbono es o incluye un material que tiene uno o más enlaces  $\beta$ -1,4 y que



tiene un peso molecular medio numérico entre aproximadamente 3.000 y aproximadamente 50.000. Dicho hidrato de carbono es o incluye celulosa (I), que se obtiene de la ( $\beta$ -glucosa 1) por condensación de enlaces glucosídicos  $\beta(1\rightarrow4)$ . El enlace contrasta con los enlaces glucosídicos  $\alpha(1\rightarrow4)$  presentes en el almidón y otros hidratos de carbono.



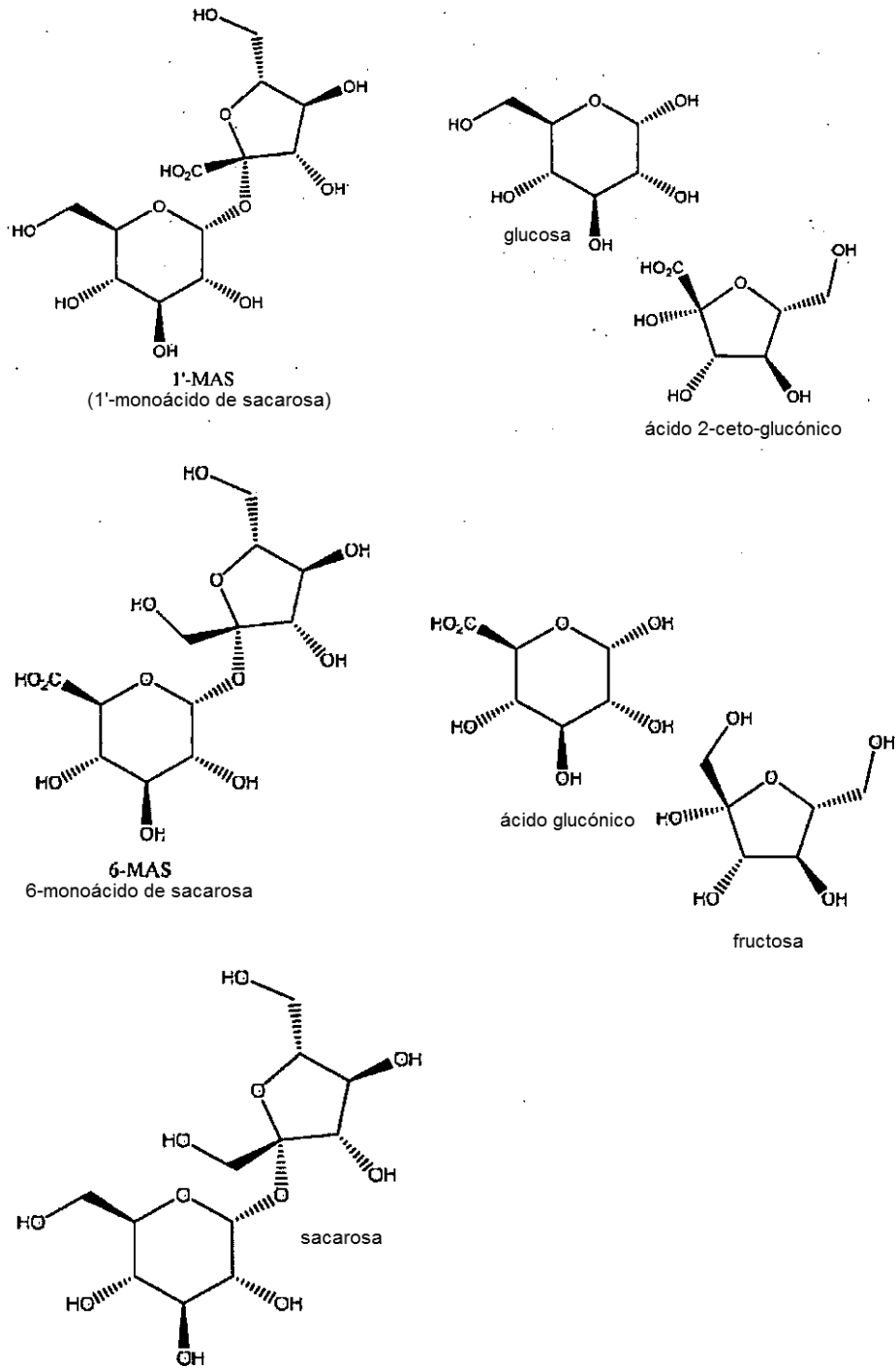
5

I

Los materiales de biomasa que incluyen azúcares de bajo peso molecular pueden incluir, p. ej., al menos aproximadamente 0,5 por ciento en peso del azúcar de bajo peso molecular, p. ej., al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12,5, 25, 35, 50, 60, 70, 80, 90 o incluso al menos aproximadamente 95 por ciento en peso del azúcar de bajo peso molecular. En algunos casos, la biomasa está compuesta sustancialmente del azúcar de bajo peso molecular, p. ej., más de 95 por ciento en peso, tal como 96, 97, 98, 99 o sustancialmente 100 por cien en peso del azúcar de bajo peso molecular.

Los materiales de biomasa que incluyen azúcares de bajo peso molecular pueden ser productos agrícolas o productos alimentarios, tales como caña de azúcar o remolacha azucarera, o un extracto de estos, p. ej., jugo de la caña de azúcar o la remolacha azucarera. Los materiales de biomasa que incluyen azúcares de bajo peso molecular pueden ser extractos sustancialmente puros, tales como azúcar bruto o de mesa cristalizado (sacarosa). Los azúcares de bajo peso molecular incluyen derivados de azúcar. Por ejemplo, los azúcares de bajo peso molecular pueden ser oligómeros (p. ej., con un número de unidades monómeras igual o mayor que 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10), trímeras, dímeras o monómeras. Cuando los hidratos de carbono están formados por más de una sola unidad que se repite, cada unidad que se repite puede ser igual o distinta.

Los ejemplos específicos de azúcares de bajo peso molecular incluyen celobiosa, lactosa, sacarosa, glucosa y xilosa, junto con derivados de los mismos. En algunos casos, los derivados de azúcar se disuelven más rápidamente en solución o son usados por microbios para proporcionar un material útil, tal como etanol o butanol. Se muestran a continuación varios de dichos azúcares y derivados de azúcar.



5 Se pueden usar mezclas de cualquiera de los materiales de biomasa descritos en la presente memoria, para hacer cualquiera de los productos descritos en la presente memoria, tales como etanol. Por ejemplo, se pueden usar mezclas de materiales celulósicos y materiales amiláceos para hacer cualquiera de los productos descrito en la presente memoria.

Sistemas para el tratamiento de la biomasa

10 La figura 1 muestra un sistema de referencia 100 para convertir biomasa, en particular biomasa con componentes celulósicos y lignocelulósicos significativos, en productos y coproductos útiles. El sistema 100 incluye un subsistema de preparación de la alimentación 110, un subsistema de pretratamiento 114, un subsistema de procedimiento primario 118 y un subsistema de postprocesado 122. El subsistema de preparación de la alimentación 110 recibe biomasa en su forma bruta, prepara físicamente la biomasa para usarla como materia prima por los procedimientos corriente abajo (p. ej., reduce el tamaño y homogeneiza la biomasa), y almacena la biomasa tanto en su forma bruta

como en forma de materia prima. La materia prima de biomasa con componentes celulósicos y lignocelulósicos significativos, puede tener un peso molecular medio y cristalinidad altos, que pueden hacer difícil el procesado de la materia prima en productos útiles (p. ej., fermentación de la materia prima para producir etanol). Por ejemplo, otros han usado ácidos, bases y enzimas para procesar materias primas celulósicas, lignocelulósicas o amiláceas. Como se describe en la presente memoria, en algunas realizaciones, dichos tratamientos no son necesarios o son necesarios solo en cantidades pequeñas o catalíticas.

El subsistema de pretratamiento 114 recibe la materia prima del subsistema de preparación de la alimentación 110 y prepara la materia prima para usarla en los procedimientos de producción primarios, por ejemplo reduciendo el peso molecular medio y la cristalinidad de la materia prima. El subsistema del procedimiento primario 118 recibe la materia prima pretratada del subsistema de pretratamiento 114 y produce productos útiles (p. ej., etanol, otros alcoholes, productos farmacéuticos y/o alimentos). En algunos casos, el producto del subsistema del procedimiento primario 118 es útil directamente pero, en otros casos, requiere el procesamiento adicional proporcionado por el subsistema de postprocesamiento 122. El subsistema de postprocesamiento 122 proporciona procesamiento adicional a corrientes de producto del sistema del procedimiento primario 118 que lo requieran (p. ej., destilación y desnaturalización del etanol) así como tratamiento para corrientes residuales de otros subsistemas. En algunos casos, los coproductos de los subsistemas 114, 118, 122 también pueden ser útiles directa o indirectamente como productos secundarios y/o para aumentar la eficacia general del subsistema 100. Por ejemplo, el subsistema de postprocesamiento 122 puede producir agua tratada para ser reciclada para usar como agua del procedimiento en otros subsistemas y/o puede producir residuo incinerable que se puede usar como combustible para calderas que producen vapor y/o electricidad.

Al tamaño óptimo para las instalaciones de conversión de biomasa le afectan factores que incluyen economías de escala y el tipo y disponibilidad de biomasa usada como materia prima. El aumento del tamaño de la instalación tiende a aumentar las economías de escala asociadas con los procedimientos de la instalación. Sin embargo, aumentar el tamaño de la instalación también tiende a aumentar los costes (p. ej., costes de transporte) por unidad de materia prima. Los estudios que analizan estos factores sugieren que el tamaño adecuado para las instalaciones de conversión de biomasa puede estar en el intervalo de 2000 a 10.000 toneladas secas de materia prima por día, dependiendo de al menos en parte el tipo de materia prima usada. El tipo de materia prima también puede tener impacto en los requisitos de almacenamiento de la instalación, requiriendo las instalaciones diseñadas principalmente para procesar materia prima cuya disponibilidad varía estacionalmente (p. ej., rastrojo de maíz), más almacenamiento de materia prima dentro o fuera, que las instalaciones diseñadas para procesar materia prima cuya disponibilidad es relativamente constante (p. ej., papel residual).

#### Preparación física

En algunos casos, los métodos de procesado empiezan con una preparación física de la materia prima, p. ej., reducción de tamaño de los materiales brutos de la materia prima, tal como por corte, trituración, cizalladura o picado. En algunos casos, se prepara materia prima suelta (p. ej., papel reciclado, materiales amiláceos, o mijo) por cizalladura o desmenuzado. Se pueden usar tamices y/o imanes para separar objetos de tamaño excesivo o indeseados tales como, por ejemplo, piedras o clavos de la corriente de alimentación.

Los sistemas de preparación de la alimentación se pueden configurar para producir corrientes de alimentación con características específicas tales como, por ejemplo, tamaños máximos específicos, relación longitud a anchura específica, o relaciones de superficies específicas. Como parte de la preparación de la alimentación, se puede controlar la densidad aparente de las materias primas (p. ej., aumentar o disminuir).

#### Reducción de tamaño

En algunas realizaciones, el material que se va a procesar está en forma de un material fibroso que incluye fibras proporcionadas por la cizalladura de una fuente de fibra. Por ejemplo, la cizalladura se puede llevar a cabo con una cortadora de cuchillas rotativas.

Por ejemplo, y con referencia a la figura 2, una fuente de fibra 210 se cizalla, p. ej., en una cortadora de cuchillas rotativas, para proporcionar un primer material fibroso 212. El primer material fibroso 212 se pasa por un primer tamiz 214 que tiene un tamaño medio de aberturas de 1,59 mm o menor (1/16 pulgadas, 0,0625 pulgadas) para proporcionar un segundo material fibroso 216. Si se desea, la fuente de fibra se puede cortar antes de la cizalladura, p. ej., con una desmenuzadora. Por ejemplo, cuando se usa papel como la fuente de fibra, el papel primero se corta en tiras que tienen, p. ej., de 6,35 a 12,7 mm (1/4 a 1/2 pulgadas) de ancho, usando una desmenuzadora, p. ej., una desmenuzadora de tornillo contrarrotatorio, tal como el fabricado por Munson (Utica, N.Y.). Como una alternativa al desmenuzado, el papel se puede reducir de tamaño cortándolo al tamaño deseado usando una cortadora de guillotina. Por ejemplo, la cortadora de guillotina se puede usar para cortar el papel en hojas que tienen, p. ej., 25,4 cm (10 pulgadas) de ancho por 30,48 cm (12 pulgadas) de largo.

En algunas realizaciones, la cizalladura de la fuente de fibra y el paso del primer material fibroso resultante a través del primer tamiz se hacen simultáneamente. La cizalladura y el paso también se pueden llevar a cabo en un procedimiento de tipo discontinuo.

Por ejemplo, se puede usar una cortadora de cuchillas rotativas para cizallar la fuente de fibra y cribar el primer material fibroso simultáneamente. En relación con la figura 3, una cortadora de cuchillas rotativas 220 incluye una tolva 222 que se puede cargar con una fuente de fibra desmenuzada 224 preparada desmenuzando la fuente de fibra. La fuente de fibra desmenuzada se cizalla entre las cuchillas estacionarias 230 y las cuchillas rotativas 232 para proporcionar un primer material fibroso 240. El primer material fibroso 240 pasa por el tamiz 242, y el segundo material fibroso resultante 244 es capturado en el tanque 250. Para ayudar a recoger el segundo material fibroso, el tanque puede tener una presión inferior a la presión atmosférica nominal, p. ej., al menos 10 por ciento inferior a la presión atmosférica nominal, p. ej., al menos 25 por ciento inferior a la presión atmosférica nominal, al menos 50 por ciento inferior a la presión atmosférica nominal, o al menos 75 por ciento inferior a la presión atmosférica nominal. En algunas realizaciones, se usa una fuente de vacío 252 para mantener el tanque por debajo de la presión atmosférica nominal.

La cizalladura puede ser ventajosa para “abrir” y “tensar” los materiales fibrosos, haciendo que la celulosa de los materiales sea más susceptible a la escisión de cadena y/o reducción de cristalinidad. Los materiales abiertos también pueden ser más susceptibles a la oxidación cuando se irradian.

La fuente de fibra se puede cizallar en un estado seco, un estado deshidratado (p. ej., teniendo hasta 10 por ciento en peso de agua absorbida), o en un estado húmedo, p. ej., teniendo entre aproximadamente 10 por ciento y aproximadamente 75 por ciento en peso de agua. La fuente de fibra se puede cizallar incluso mientras está parcial o totalmente sumergida bajo un líquido, tal como agua, etanol, isopropanol. La fuente de fibra también se puede cizallar bajo un gas (tal como una corriente o atmósfera de gas distinto del aire), p. ej., oxígeno o nitrógeno, o vapor.

Otros métodos para hacer los materiales fibrosos incluyen, p. ej., trituración con muela abrasiva, corte o desgarrado mecánico, trituración por rectificadora, o molienda por abrasión con aire.

Si se desea, los materiales fibrosos se pueden separar, p. ej., de forma continua o en lotes, en fracciones según su longitud, anchura, densidad, tipo de material o alguna combinación de estas características.

Por ejemplo, los materiales ferrosos se pueden separar de cualquiera de los materiales fibrosos pasando un material fibroso que incluye un material ferroso por un imán, p. ej., un electroimán, y después pasando el material fibroso resultante a través de una serie de tamices, teniendo cada tamiz aberturas de diferentes tamaños.

Los materiales fibrosos también se pueden separar, p. ej., usando un gas a alta velocidad, p. ej., aire. En dicho procedimiento, los materiales fibrosos se separan extrayendo diferentes fracciones, que se pueden caracterizar de forma fotónica, si se desea. Se describe dicho aparato de separación en Lindsey et al, patente de EE.UU. nº 6.883.667.

Los materiales fibrosos se pueden irradiar inmediatamente después de su preparación, o se pueden hacer secar, p. ej., a aproximadamente 105°C durante 4-18 horas, de modo que el contenido de humedad sea, p. ej., menor de aproximadamente 0,5% antes de usar.

Si se desea, se puede separar la lignina de cualquiera de los materiales fibrosos que incluyen lignina. También para ayudar a la rotura de los materiales que incluyen celulosa, el material se puede tratar antes de la irradiación con calor, un producto químico (p. ej., ácido mineral, base o un oxidante fuerte tal como hipoclorito sódico) y/o una enzima.

En algunas realizaciones, el tamaño medio de abertura del primer tamiz es menor que 0,79 mm (1/32 pulgadas, 0,03125 pulgadas), p. ej., menor que 0,51 mm (1/50 pulgadas, 0,02000 pulgadas), menor que 0,40 mm (1/64 pulgadas, 0,015625 pulgadas), menor que 0,23 mm (0,009 pulgadas), menor que 0,20 mm (1/128 pulgadas, 0,0078125 pulgadas), menor que 0,18 mm (0,007 pulgadas), menor que 0,13 mm (0,005 pulgadas), o incluso menor que menor que 0,10 mm (1/256 pulgadas, 0,00390625 pulgadas). El tamiz se prepara trenzando monofilamentos que tienen un diámetro adecuado para dar el tamaño de aberturas deseado. Por ejemplo, los monofilamentos pueden estar hechos de un metal, p. ej., acero inoxidable. A medida que el tamaño de las aberturas se hace menor, pueden hacerse mayores los requisitos estructurales de los monofilamentos. Por ejemplo, para tamaños de aberturas menores de 0,40 mm, puede ser ventajoso hacer los tamices de monofilamentos hechos de un material distinto del acero inoxidable, p. ej., titanio, aleaciones de titanio, metales amorfos, níquel, tungsteno, rodio, renio, materiales cerámicos o vidrio. En algunas realizaciones, el tamiz está hecho de una placa, p. ej., una placa metálica, que tiene aberturas, p. ej., cortadas en la placa usando un láser. En algunas realizaciones, el área de aberturas de la malla es menor que 52%, p. ej., menor que 41%, menor que 36%, menor que 31%, menor que 30%.

En algunas realizaciones, el segundo material fibroso se cizalla y pasa a través del primer tamiz, o un tamiz de tamaño diferente. En algunas realizaciones, el segundo material fibroso se pasa por un segundo tamiz que tiene un tamaño medio de aberturas igual o menor que el primer tamiz.

En relación con la figura 4, se puede preparar un tercer material fibroso 220 a partir del segundo material fibroso 216 por cizalladura del segundo material fibroso 216 y pasando el material resultante por un segundo tamiz 222 que tiene un tamaño medio de aberturas menor que el primer tamiz 214.

En general, las fibras de los materiales fibrosos pueden tener una relación media de longitud a diámetro relativamente grande (p. ej., mayor que de 20 a 1), incluso si se han cizallado más de una vez. Además, las fibras de los materiales fibrosos descritos en la presente memoria, pueden tener una distribución de longitudes y/o relaciones de longitud a diámetro relativamente estrechas.

5 Como se usa en la presente memoria, las anchuras medias de las fibras (es decir, diámetros) son las determinadas ópticamente por selección aleatoria de aproximadamente 5.000 fibras. Las longitudes medias de las fibras son longitudes ponderadas corregidas. Las superficies específicas BET (Brunauer, Emmet y Teller) son superficies específicas de multipuntos, y las porosidades son las determinadas por porosimetría de mercurio.

10 La relación media de longitud a diámetro del segundo material fibroso 14 puede ser, p. ej., mayor que 8/1, p. ej., mayor que 10/1, mayor que 15/1, mayor que 20/1, mayor que 25/1, o mayor que 50/1. Una longitud media del segundo material fibroso 14 puede ser, p. ej., entre aproximadamente 0,5 mm y 2,5 mm, p. ej., entre aproximadamente 0,75 mm y 1,0 mm, y una anchura media (es decir, diámetro) del segundo material fibroso 14 puede ser, p. ej., entre aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  y 50  $\mu\text{m}$ , p. ej., entre aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  y 30  $\mu\text{m}$ .

15 En algunas realizaciones, una desviación estándar de la longitud del segundo material fibroso 14 es menor que 60 por ciento de una longitud media del segundo material fibroso 14, p. ej., menor que 50 por ciento de la longitud media, menor que 40 por ciento de la longitud media, menor que 25 por ciento de la longitud media, menor que 10 por ciento de la longitud media, menor que 5 por ciento de la longitud media, o incluso menor que 1 por ciento de la longitud media.

20 En algunas realizaciones, una superficie específica BET del segundo material fibroso es mayor que 0,1  $\text{m}^2/\text{g}$ , p. ej., mayor que 0,25  $\text{m}^2/\text{g}$ , mayor que 0,5  $\text{m}^2/\text{g}$ , mayor que 1,0  $\text{m}^2/\text{g}$ , mayor que 1,5  $\text{m}^2/\text{g}$ , mayor que 1,75  $\text{m}^2/\text{g}$ , mayor que 5,0  $\text{m}^2/\text{g}$ , mayor que 10  $\text{m}^2/\text{g}$ , mayor que 25  $\text{m}^2/\text{g}$ , mayor que 35  $\text{m}^2/\text{g}$ , mayor que 50  $\text{m}^2/\text{g}$ , mayor que 60  $\text{m}^2/\text{g}$ , mayor que 75  $\text{m}^2/\text{g}$ , mayor que 100  $\text{m}^2/\text{g}$ , mayor que 150  $\text{m}^2/\text{g}$ , mayor que 200  $\text{m}^2/\text{g}$ , o incluso mayor que 250  $\text{m}^2/\text{g}$ . Una porosidad del segundo material fibroso 14 puede ser, p. ej., mayor que 20 por ciento, mayor que 25 por ciento, mayor que 35 por ciento, mayor que 50 por ciento, mayor que 60 por ciento, mayor que 70 por ciento, p. ej., mayor que 80 por ciento, mayor que 85 por ciento, mayor que 90 por ciento, mayor que 92 por ciento, mayor que 94 por ciento, mayor que 95 por ciento, mayor que 97,5 por ciento, mayor que 99 por ciento, o incluso mayor que 99,5 por ciento.

30 En algunas realizaciones, una relación de la relación media de longitud a diámetro del primer material fibroso a la relación media de longitud a diámetro del segundo material fibroso es, p. ej., menor que 1,5, p. ej., menor que 1,4, menor que 1,25, menor que 1,1, menor que 1,075, menor que 1,05, menor que 1,025, o incluso sustancialmente igual a 1.

35 En realizaciones particulares, el segundo material fibroso se cizalla de nuevo y el material fibroso resultante se pasa por un segundo tamiz que tiene un tamaño medio de aberturas menor que el primer tamiz para proporcionar un tercer material fibroso. En dichos casos, una relación de la relación media de longitud a diámetro del segundo material fibroso a la relación media de longitud a diámetro del tercer material fibroso, puede ser, p. ej., menor que 1,5, p. ej., menor que 1,4, menor que 1,25, o incluso menor que 1,1.

40 En algunas realizaciones, el tercer material fibroso se pasa por un tercer tamiz para producir un cuarto material fibroso. El cuarto material fibroso se puede pasar, p. ej., por un cuarto tamiz para producir un quinto material fibroso. Se pueden repetir procedimientos de cribado similares tantas veces como se desee para producir el material fibroso deseado que tenga las propiedades deseadas.

#### Densificación

45 Los materiales densificados se pueden procesar por cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, o cualquier material descrito en la presente memoria, p. ej., cualquier material fibroso descrito en la presente memoria, se puede procesar por uno cualquiera o más de los métodos descritos en la presente memoria, y después densificar como se describe en la presente memoria.

50 Un material, p. ej., un material fibroso, que tiene una densidad aparente baja, se puede densificar a un producto que tenga una densidad aparente más alta. Por ejemplo, una composición de material que tiene una densidad aparente de 0,05  $\text{g}/\text{cm}^3$ , se puede densificar sellando el material fibroso en una estructura relativamente impermeable a gas, p. ej., una bolsa hecha de polietileno o una bolsa hecha de capas alternantes de polietileno y un nailon, y después evacuando el gas atrapado, p. ej., aire, de la estructura. Después de evacuar el aire de la estructura, el material fibroso puede tener, p. ej., una densidad aparente mayor que 0,3  $\text{g}/\text{cm}^3$ , p. ej., 0,5  $\text{g}/\text{cm}^3$ , 0,6  $\text{g}/\text{cm}^3$ , 0,7  $\text{g}/\text{cm}^3$  o más, p. ej., 0,85  $\text{g}/\text{cm}^3$ . Después de densificar, el producto se puede procesar por cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, p. ej. irradiar, p. ej. con radiación gamma. Esto puede ser ventajoso cuando se desea transportar el material a otro sitio, p. ej., una instalación de fabricación remota, donde la composición de material fibroso se puede añadir a una solución, p. ej., para producir etanol. Después de perforar la estructura sustancialmente impermeable a gas, el material fibroso densificado se puede devolver prácticamente a su densidad aparente inicial, p. ej., mayor que 60 por ciento de su densidad inicial, p. ej., 70 por ciento, 80 por ciento, 85 por ciento o más, p. ej., 95 por ciento de su densidad inicial. Para reducir la electricidad estática en el material fibroso, se

puede añadir un agente antiestático al material.

5 En algunas realizaciones, la estructura, p. ej., bolsa, está formada de un material que se disuelve en un líquido tal como agua. Por ejemplo, la estructura puede estar formada de un poli(alcohol vinílico) de modo que se disuelve cuando se pone en contacto con un sistema basado en agua. Dichas realizaciones permiten añadir estructuras densificadas directamente a soluciones que incluyen un microorganismo, sin liberar primero el contenido de la estructura, p. ej., cortando.

10 En relación con la figura 5, un material de biomasa se puede combinar con cualesquiera aditivos deseados y un aglutinante, y posteriormente densificar por aplicación de presión, p. ej., pasando el material por la línea de contacto definida entre rodillos de presión contrarrotatorios o pasando el material por un molino de pelets. Durante la aplicación de presión, se puede aplicar opcionalmente calor para ayudar a la densificación del material fibroso. El material densificado se puede irradiar.

15 En algunas realizaciones, el material antes de densificar tiene una densidad aparente menor que  $0,25 \text{ g/cm}^3$ , p. ej.,  $0,20 \text{ g/cm}^3$ ,  $0,15 \text{ g/cm}^3$ ,  $0,10 \text{ g/cm}^3$ ,  $0,05 \text{ g/cm}^3$  o menos, p. ej.,  $0,025 \text{ g/cm}^3$ . La densidad aparente se determina usando el método ASTM D1895B. Brevemente, el método implica llenar un tubo graduado de volumen conocido con una muestra y obtener el peso de la muestra. La densidad aparente se calcula dividiendo el peso de la muestra en gramos entre el volumen conocido del cilindro en metros cúbicos.

20 Los aglutinantes preferidos incluyen aglutinantes que son solubles en agua, se hinchan con el agua, o que tienen una temperatura de transición vítrea menor que  $25^\circ\text{C}$ , determinada por calorimetría diferencial de barrido. Por aglutinantes solubles en agua, se entiende aglutinantes que tienen una solubilidad de al menos aproximadamente 0,05 por ciento en peso en agua. Por aglutinantes que se hinchan con el agua, se entiende aglutinantes que aumentan de volumen en más de 0,5 por ciento tras exposición al agua.

25 En algunas realizaciones, los aglutinantes que son solubles o se hinchan en agua incluyen un grupo funcional que es capaz de formar un enlace, p. ej., un enlace de hidrógeno, con las fibras del material fibroso, p. ej., material fibroso celulósico. Por ejemplo, el grupo funcional puede ser un grupo ácido carboxílico, un grupo carboxilato, un grupo carbonilo, p. ej., un aldehído o una cetona, un grupo ácido sulfónico, un grupo sulfonato, un grupo ácido fosfórico, un grupo fosfato, un grupo amida, un grupo amina, un grupo hidroxilo, p. ej., de un alcohol, y combinaciones de estos grupos, p. ej., un grupo ácido carboxílico y un grupo hidroxilo. Los ejemplos monoméricos específicos incluyen glicerina, glioxal, ácido ascórbico, urea, glicina, pentaeritritol, un monosacárido o un disacárido, ácido cítrico y ácido tartárico. Los sacáridos adecuados incluyen glucosa, sacarosa, lactosa, ribosa, fructosa, manosa, arabinosa y eritrosa. Los ejemplos poliméricos incluyen poliglicoles, poli(óxido de etileno), poli(ácidos carboxílicos), poliamidas, poliaminas y polisulfonatos, poli(ácidos sulfónicos). Los ejemplos poliméricos específicos incluyen polipropilenglicol (PPG), polietilenglicol (PEG), poli(óxido de etileno), p. ej., POLYOX<sup>®</sup>, copolímeros de óxido de etileno y óxido de propileno, poli(ácido acrílico) (PAA), poli(acrilamida), polipéptidos, polietilenimina, polivinilpiridina, poli(4-estirenosulfonato sódico) y poli(ácido 2-acrilamido-metil-1-propanosulfónico).

35 En algunas realizaciones, el aglutinante incluye un polímero que tiene una temperatura de transición vítrea menor que  $25^\circ\text{C}$ . Los ejemplos de dichos polímeros incluyen elastómeros termoplásticos (TPE). Los ejemplos de TPE incluyen poliéter-amida en bloques, tales como los disponibles con el nombre comercial PEBAX<sup>®</sup>, elastómeros de poliéster, tales como los disponibles con el nombre comercial HYTEL<sup>®</sup>, y copolímeros estirénicos de bloques, tales como los disponibles con el nombre comercial KRATON<sup>®</sup>. Otros polímeros adecuados que tiene una temperatura de transición vítrea menor que  $25^\circ\text{C}$  incluyen copolímero de etileno y acetato de vinilo (EVA), poliolefinas, p. ej., polietileno, polipropileno, copolímeros de etileno-propileno, y copolímeros de etileno y alfa-olefinas, p. ej., 1-octeno, tal como los disponibles con el nombre comercial ENGAGE<sup>®</sup>. En algunas realizaciones, p. ej., cuando el material es un papel polirrevestido fibrizado, el material se densifica sin la adición separada de un polímero de temperatura de transición vítrea baja.

45 En una realización particular, el aglutinante es una lignina, p. ej., una lignina natural o sintéticamente modificada.

Una cantidad adecuada de aglutinante añadida al material, calculada basado en el peso seco es, p. ej., de aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente 50 por ciento, p. ej., 0,03 por ciento, 0,05 por ciento, 0,1 por ciento, 0,25 por ciento, 0,5 por ciento, 1,0 por ciento, 5 por ciento, 10 por ciento o más, p. ej., 25 por ciento, basado en el peso total del material densificado. El aglutinante se puede añadir al material como un líquido solo puro, o como un líquido que tiene el aglutinante disuelto en el mismo, como un polvo seco del aglutinante o como pelets del aglutinante.

55 El material fibroso densificado se puede hacer en un molino de pelets. En relación con la figura 6, un molino de pelets 300 tiene una tolva 301 para contener el material no densificado 310 que incluye un material que contiene hidratos de carbono, tales como celulosa. La tolva está comunicada con un tornillo sin fin 312 que es accionado por un motor de velocidad variable 314, de modo que el material no densificado puede ser transportado a una zona de acondicionamiento 320 que agita el material no densificado con palas 322 que son giradas por el motor de acondicionamiento 330. Otros aditivos, p. ej. cualquiera de los aditivos y/o cargas descritas en la presente memoria, se pueden añadir en la entrada 332. Si se desea, se puede añadir calor mientras el material fibroso está en la zona

de acondicionamiento. Después del acondicionamiento, el material pasa de la zona de acondicionamiento a través de un tubo de vaciado 340, y a otro tornillo sin fin 342. El tubo de vaciado, controlado por el accionador 344, permite el paso sin obstrucción del material desde la zona de acondicionamiento al tornillo sin fin. El tornillo sin fin es girado por el motor 346, y controla la alimentación del material fibroso a la boquilla y conjunto de rodillos 350. Específicamente, el material se introduce en una boquilla cilíndrica hueca 352, que rota sobre un eje horizontal y que tiene agujeros de boquilla que se extienden radialmente 250. La boquilla 352 es rotada sobre el eje por el motor 360, que incluye un indicador de potencia, que indica la potencia total consumida por el motor. El material densificado 370, p. ej., en forma de pelets, cae del tubo de descarga 372 y es capturado y procesado, tal como por irradiación.

El material, después de densificación, puede estar convenientemente en forma de pelets o astillas que tienen una variedad de formas. Los pelets después se pueden irradiar. En algunas realizaciones, los pelets o astillas son de forma cilíndrica, p. ej., tienen una dimensión transversal máxima de, p. ej., 1 mm o más, p. ej., 2 mm, 3 mm, 5 mm, 8 mm, 10 mm, 15 mm o más, p. ej., 25 mm. Otras formas convenientes incluyen pelets o astillas que tienen forma de placa, que tienen, p. ej., un espesor de 1 mm o más, p. ej., 2 mm, 3 mm, 5 mm, 8 mm, 10 mm o más, p. ej., 25 mm; una anchura de, p. ej., 5 mm o más, p. ej., 10 mm, 15 mm, 25 mm, 30 mm o más, p. ej., 50 mm; y una longitud de 5 mm o más, p. ej., 10 mm, 15 mm, 25 mm, 30 mm o más, p. ej., 50 mm.

En relación ahora con las figuras 7A-7D, los pelets se pueden hacer de modo que tengan un interior hueco. Como se muestra, el hueco en general puede estar alienado con el centro del pelet (figura 7B) o no estar alineado con el centro del pelet (figura 7C). El hacer el pelet hueco en el interior puede aumentar la tasa de disolución en un líquido después de irradiación.

En relación ahora con la figura 7D, el pelet puede tener, p. ej., una forma transversal que es multilobular, p. ej. trilobular como se muestra, o tetralobular, pentalobular, hexalobular o decalobular. El hacer los pelets con dichas formas transversales también puede aumentar la tasa de disolución en una solución después de irradiación.

Alternativamente, el material densificado puede estar en cualquier otra forma deseada, p. ej., el material densificado puede tener forma de una estera, rollo o bala.

## Ejemplos

En un ejemplo, se puede usar como materia prima 1,89 litros (0,5 galones) de cartones de zumo hechos de cartón Kraft blanco no impreso que tiene una densidad aparente de  $320,36 \text{ kg/m}^3$  ( $20 \text{ lb/ft}^3$ ). Los cartones pueden estar doblados planos y entonces alimentar a una desmenuzadora para producir un material de tipo confeti que tiene una anchura entre 0,254 cm (0,1 pulgadas) y 1,27 cm (0,5 pulgadas), una longitud de entre 0,635 cm (0,25 pulgadas) y 2,54 cm (1 pulgada) y un espesor equivalente al del material de partida (aproximadamente (0,075 pulgadas)). El material de tipo confeti se puede alimentar a una cortadora de cuchillas rotativas, que cizalla los trozos de tipo confeti, desgarrando los trozos y liberando material fibroso.

En algunos casos, se pueden disponer múltiples trenes de desmenuzadora-cizalladora en serie con la salida. En una realización, se pueden disponer dos trenes de desmenuzadora-cizalladora en serie con la salida de la primera cizalladora alimentada como entrada a la segunda desmenuzadora. En otra realización, se pueden disponer tres trenes de desmenuzadora-cizalladora en serie con la salida de la primera cizalladora alimentada como entrada a la segunda desmenuzadora y la salida de la segunda cizalladora alimentada como entrada en la tercera desmenuzadora. Se prevé que múltiples pasos por trenes de desmenuzadora-cizalladora aumenten la reducción del tamaño de partículas y aumenten la superficie específica general en la corriente de alimentación.

En otro ejemplo, se puede tratar material fibroso producido en el desmenuzado y cizalladura de cartones de zumo para aumentar su densidad aparente. En algunos casos, el material fibroso se puede pulverizar con agua o una solución madre diluida de POLYOX™ WSR N10 (poli(óxido de etileno) preparada en agua. El material fibroso humectado después se puede procesar a través de un molino de pelets que trabaja a temperatura ambiente. El molino de pelets puede aumentar la densidad aparente de la corriente de alimentación en más de un orden de magnitud.

## Pretratamiento

### Condiciones de pretratamiento

En algunas realizaciones, el procedimiento no incluye hidrolizar el material celulósico y/o lignocelulósico, tal como con un ácido o una base, p. ej., un ácido mineral, tal como ácido clorhídrico o sulfúrico. Si se desea, parte o nada de la materia prima puede incluir un material hidrolizado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 70 por ciento en peso de la materia prima es un material no hidrolizado, p. ej. al menos 90 por ciento en peso de la materia prima es un material no hidrolizado. En algunas realizaciones, sustancialmente toda la materia prima es un material no hidrolizado.

Cualquier materia prima o cualquier reactor o fermentador cargado con una materia prima puede incluir un tampón, tal como bicarbonato sódico, cloruro amónico o Tris; un electrolito, tal como cloruro potásico, cloruro sódico o cloruro cálcico; un factor de crecimiento, tal como biotina y/o una pareja de base tal como uracilo o un equivalente del

mismo; un tensioactivo, tal como Tween® o polietilenglicol; un mineral, tal como calcio, cromo, cobre, yodo, hierro, selenio o cinc; o un agente quelante, tal como etilendiamina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (o su forma de sal, p. ej. EDTA de sodio o potasio), o dimercaprol.

5 Cuando se usa radiación, se puede aplicar a cualquier muestra que esté seca o húmeda, o incluso dispersa en un líquido, tal como agua. Por ejemplo, la irradiación se puede llevar a cabo en material celulósico y/o lignocelulósico en el que menos de aproximadamente 25 por ciento en peso del material celulósico y/o lignocelulósico tiene superficies mojadas con un líquido, tal como agua. En algunas realizaciones, la irradiación se lleva a cabo en material celulósico y/o lignocelulósico en el que sustancialmente nada del material celulósico y/o lignocelulósico está mojado con un líquido, tal como agua.

10 En algunas realizaciones, cualquier procesado descrito en la presente memoria se produce después de que el material celulósico y/o lignocelulósico permanezca seco como se ha adquirido o se ha secado, p. ej., usando calor y/o presión reducida. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el material celulósico y/o lignocelulósico tiene menos de aproximadamente 50 por ciento en peso de agua retenida, medido a 25°C y 50% de humedad relativa.

15 Si se desea, se puede usar un agente de hinchamiento, como se define en la presente memoria, en cualquier procedimiento descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, cuando el material celulósico y/o lignocelulósico se procesa usando radiación, menos de aproximadamente 25 por ciento en peso del material celulósico y/o lignocelulósico está en un estado hinchado, caracterizándose el estado hinchado por tener un volumen de más de aproximadamente 2,5 por ciento mayor que un estado no hinchado, p. ej., más de 5,0, 7,5, 10 o 15 por ciento mayor que el estado no hinchado. En algunas realizaciones, cuando se usa radiación en un material  
20 celulósico y/o lignocelulósico, sustancialmente nada del material celulósico y/o lignocelulósico está en un estado hinchado. En realizaciones específicas, cuando se usa radiación, el material celulósico y/o lignocelulósico incluye un agente de hinchamiento, y el material celulósico y/o lignocelulósico hinchado recibe una dosis menor de aproximadamente 10 Mrad.

25 Cuando se usa radiación en cualquier procedimiento, se puede aplicar mientras el material celulósico y/o lignocelulósico está expuesto al aire, aire enriquecido con oxígeno, o incluso al propio oxígeno, o cubierto por una capa de un gas inerte tal como nitrógeno, argón o helio. Cuando se desea una oxidación máxima, se usa un entorno oxidante, tal como aire u oxígeno.

30 Cuando se usa radiación, se puede aplicar al material celulósico y/o lignocelulósico, bajo una presión que es mayor que aproximadamente 2,5 atmósferas, tal como mayor que 5, 10, 15, 20 o incluso mayor que aproximadamente 50 atmósferas.

#### Tratamiento de radiación

35 La irradiación puede reducir el peso molecular y/o la cristalinidad de la materia prima. En algunas realizaciones, se usa la energía depositada en un material que libera un electrón de su orbital atómico, para irradiar los materiales. La radiación se puede proporcionar mediante 1) partículas cargadas pesadas, tales como partículas alfa o protones, 2) electrones, producidos, por ejemplo, en la desintegración beta o aceleradores de haces de electrones, o 3) radiación electromagnética, por ejemplo, rayos gamma, rayos x, o rayos ultravioleta. En un procedimiento, la radiación producida por sustancias radiactivas se puede usar para irradiar la materia prima. En algunas realizaciones, se puede usar cualquier combinación, en cualquier orden o simultáneamente de (1) a (3). En otro procedimiento, se puede usar radiación electromagnética (p. ej., producida usando emisores de haces de electrones) para irradiar la  
40 materia prima. Las dosis aplicadas dependen del efecto deseado y de la materia prima particular. Por ejemplo, dosis altas de radiación pueden romper enlaces químicos dentro de los componentes de la materia prima y dosis bajas de radiación pueden aumentar los enlaces químicos (p. ej., reticulación) dentro de los componentes de la materia prima. En algunos casos, cuando se desea la escisión de cadenas y/o la funcionalización de la cadena polimérica, se pueden usar partículas más pesadas que los electrones, tales como protones, núcleos de helio, iones de argón, iones de silicio, iones de neón, iones de carbono, iones de fósforo, iones de oxígeno o iones de nitrógeno. Cuando  
45 se desea la escisión de cadena con apertura de anillo, se pueden usar partículas con carga positiva por sus propiedades de ácido de Lewis para la escisión de cadena con apertura de anillo potenciada. Por ejemplo, cuando se desean grupos funcionales que contienen oxígeno, se puede llevar a cabo la irradiación en presencia de oxígeno o incluso la irradiación con iones de oxígeno. Por ejemplo, cuando se desean grupos funcionales que contienen nitrógeno, se puede llevar a cabo la irradiación en presencia de nitrógeno o incluso irradiación con iones de nitrógeno.  
50

55 En relación con la figura 8, en un método de referencia, se irradia un primer material 2 que es o incluye celulosa que tiene un primer peso molecular medio numérico ( $M_{N1}$ ), p. ej., por tratamiento con radiación ionizante (p. ej., en forma de radiación gamma, radiación de rayos X, luz ultravioleta de 100 nm a 280 nm, un haz de electrones u otras partículas cargadas) para proporcionar un segundo material 3 que incluye celulosa que tiene un segundo peso molecular medio numérico ( $M_{N2}$ ) menor que el primer peso molecular medio numérico. El segundo material (o el primer y segundo material) se pueden combinar con un microorganismo (p. ej., una bacteria o una levadura) que puede usar el segundo y/o primer material para producir un combustible 5 que es o incluye hidrógeno, un alcohol (p. ej., etanol o butanol, tal como n-, sec- o t-butanol), un ácido orgánico, un hidrocarburo o mezclas de cualquiera de



estos.

5 Puesto que el segundo material 3 tiene celulosa que tiene un peso molecular reducido con respecto al primer material, y en algunos casos, también una cristalinidad reducida, en general el segundo material es más dispersable, hinchable y/o soluble en una solución que contiene un microorganismo. Estas propiedades hacen que el segundo material 3 sea más susceptible al ataque químico, enzimático y/o biológico con respecto al primer material 2, lo cual puede mejorar mucho la tasa de producción y/o el nivel de producción de un producto deseado, p. ej., etanol. La radiación también puede esterilizar los materiales.

10 En algunas realizaciones, el segundo peso molecular medio numérico ( $M_{N2}$ ) es menor que el primer peso molecular medio numérico ( $M_{N1}$ ) en más de aproximadamente 10 por ciento, p. ej., 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 por ciento, 60 por ciento, o incluso más de aproximadamente 75 por ciento.

En algunos casos, el segundo material tiene celulosa que tiene una cristalinidad ( $T_{C2}$ ) que es menor que la cristalinidad ( $T_{C1}$ ) de la celulosa del primer material. Por ejemplo, ( $T_{C2}$ ) puede ser menor que ( $T_{C1}$ ) en más de aproximadamente 10 por ciento, p. ej. 15, 20, 25, 30, 35, 40, o incluso más de aproximadamente 50 por ciento.

15 En algunas realizaciones, el índice de cristalinidad inicial (antes de irradiación) es de aproximadamente 40 a aproximadamente 87,5 por ciento, p. ej., de aproximadamente 50 a aproximadamente 75 por ciento o de aproximadamente 60 a aproximadamente 70 por ciento, y el índice de cristalinidad después de irradiación es de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 por ciento, p. ej., de aproximadamente 15 a aproximadamente 45 por ciento o de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 por ciento. Sin embargo, en algunas realizaciones, p. ej., después de irradiación extensa, se puede tener un índice de cristalinidad menor que 5 por ciento. En algunas realizaciones, el material después de irradiación es sustancialmente amorfo.

20 En algunas realizaciones, el peso molecular medio numérico inicial (antes de irradiación) es de aproximadamente 200.000 a aproximadamente 3.200.000, p. ej., de aproximadamente 250.000 a aproximadamente 1.000.000 o de aproximadamente 250.000 a aproximadamente 700.000, y el peso molecular medio numérico después de irradiación de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 200.000, p. ej., de aproximadamente 60.000 a aproximadamente 150.000 o de aproximadamente 70.000 a aproximadamente 125.000. Sin embargo, en algunas realizaciones, p. ej., después de irradiación extensa, se puede tener un peso molecular medio numérico menor que aproximadamente 10.000 o incluso menor que aproximadamente 5.000.

25 En algunas realizaciones, el segundo material puede tener un nivel de oxidación ( $T_{O2}$ ) que es mayor que el nivel de oxidación ( $T_{O1}$ ) del primer material. Un nivel mayor de oxidación del material puede ayudar a su dispersabilidad, hinchabilidad y/o solubilidad, potenciando además la susceptibilidad de los materiales al ataque químico, enzimático o biológico. En algunas realizaciones, para aumentar el nivel de oxidación del segundo material con respecto al primer material, la irradiación se lleva a cabo en un entorno oxidante, p. ej., bajo una capa de aire u oxígeno, produciendo un segundo material que está más oxidado que el primer material. Por ejemplo, el segundo material puede tener más grupos hidroxilo, grupos aldehído, grupos cetona, grupos éster o grupos ácido carboxílico, que aumentan la hidrofiliidad.

#### Radiación ionizante

30 Cada forma de radiación ioniza la biomasa por interacciones particulares, determinadas por la energía de la radiación. Las partículas cargadas pesadas ionizan principalmente por dispersión coulombiana; además, estas interacciones producen electrones energéticos que pueden ionizar más la materia. Las partículas alfa son idénticas al núcleo de un átomo de helio y son producidas por la desintegración alfa de diferentes núcleos radiactivos, tales como isótopos de bismuto, polonio, astatina, radón, francio, radio, varios actínidos, tales como actinio, torio, uranio, neptunio, curio, californio, americio y plutonio.

35 Cuando se usan partículas, pueden ser neutras (no cargadas), tener carga positiva o tener carga negativa. Cuando están cargadas, las partículas cargadas pueden llevar una sola carga positiva o negativa, o múltiples cargas, p. ej., 1, 2, 3 o incluso 4 o más cargas. En casos en los que se desea la escisión de cadena, pueden ser deseables partículas con carga positiva, en parte debido a su naturaleza ácida. Cuando se usan partículas las partículas pueden tener la masa de un electrón en reposo, o mayor, p. ej., 500, 1000, 1500, o 2000 o más veces la masa de un electrón en reposo. Por ejemplo, las partículas que tienen una masa de aproximadamente 1 unidad atómica a aproximadamente 150 unidades atómicas, p. ej., de aproximadamente 1 unidad atómica a aproximadamente 50 unidades atómicas, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12 o 15 uma. Los aceleradores usados para acelerar las partículas pueden ser electrostáticos DC, electrodinámicos DC, lineales RF, lineales de inducción magnética o de onda continua. Por ejemplo, los aceleradores de tipo ciclotrón están disponibles en IBA, Bélgica, tal como el sistema Rhodotron®, mientras que los aceleradores de tipo DC están disponibles en RDI, ahora IBA Industrial, tal como Dynamitron®. Los iones y aceleradores de iones se describen en

45 *Introductory Nuclear Physics*, Kenneth S. Krane, John Wiley & Sons, Inc. (1988), Krsto Prelec, FIZIKA B 6 (1997) 4, 177-206, Chu, William T., "Overview of Light-Ion Beam Therapy", Columbus-Ohio, ICRU-IAEA Meeting, 18-20 de marzo 2006, Iwata, Y. et al., "Alternating-Phase-Focused IH-DTL for Heavy-Ion Medical Accelerators", Proceedings of EPAC 2006, Edinburgh, Escocia, y Leitner, C.M. et al., "Status of the Superconducting ECR Ion Source Venus",

Proceedings of EPAC 2000, Vienna, Austria.

Los electrones interactúan por dispersión coulombiana y radiación de frenado producida por cambios en la velocidad de los electrones. Los electrones se pueden producir mediante núcleos radiactivos que sufren desintegración beta, tales como isótopos de yodo, cesio, tecnecio e iridio. Alternativamente, se puede usar una pistola de electrones como una fuente de electrones por emisión termoiónica.

5

La radiación electromagnética interactúa por 3 procedimientos: absorción fotoeléctrica, dispersión de Compton y producción de pares. La interacción dominante está determinada por la energía de la radiación incidente y el número atómico del material. La suma de las interacciones que contribuyen a la radiación absorbida en el material celulósico se puede expresar por el coeficiente de absorción de masa.

10 La radiación electromagnética se subclasifica en rayos gamma, rayos x, rayos ultravioleta, rayos infrarrojo, microondas, u ondas de radio, dependiendo de su longitud de onda.

Por ejemplo, se puede usar radiación gamma para irradiar los materiales. En relación con las figura 9 y 10 (una vista aumentada de la región R), un irradiador gamma 10 incluye fuentes de radiación gamma 408, p. ej., pellets de  $^{60}\text{Co}$ , una mesa de trabajo 14 para soportar los materiales que se van a irradiar y almacenamiento 16, p. ej., hecho de una pluralidad de placas de hierro, los cuales están todos albergados en una cámara de contención de hormigón (cámara aislada) 20 que incluye una puerta de entrada de laberinto 22 además de la puerta forrada de plomo 26. El almacenamiento 16 incluye una pluralidad de canales 30, p. ej., 16 o más canales, que permiten que las fuentes de radiación gamma pasen a través del almacenamiento en su camino próximo a la mesa de trabajo.

15

En funcionamiento, la muestra que se va a irradiar se pone en una mesa de trabajo. El irradiador se configura para que suministre la dosis por unidad de tiempo deseada y el equipo de seguimiento está conectado a un bloque experimental 31. El operador entonces sale de la cámara de contención, pasando por la puerta de entrada de laberinto y por la puerta forrada de plomo. El operador dirige un panel de control 32, que da instrucciones a un ordenador 33 para subir las fuentes de radiación 12 en la posición de trabajo usando el cilindro 36 unido a una bomba hidráulica 40.

20

25 La radiación gamma tiene la ventaja de una profundidad de penetración significativa en una variedad de materiales en la muestra. Las fuentes de rayos gamma incluyen núcleos radiactivos, tales como isótopos de cobalto, calcio, tecnecio, cromo, galio, indio, yodo, hierro, kriptón, samario, selenio, sodio, talio y xenón.

25

Las fuentes de rayos x incluyen colisión de haz de electrones con objetivos metálicos, tales como tungsteno o molibdeno o aleaciones, o fuentes de luz compactas, tales como las producidas comercialmente por Lyncean.

30

Las fuentes de radiación ultravioleta incluyen lámparas de deuterio o cadmio.

Las fuentes de radiación infrarroja incluyen lámparas cerámicas de ventana de zafiro, cinc, o selenuro.

Las fuentes para microondas incluyen fuentes de klistrón, RF tipo Slevin, o fuentes de haces atómicos que usan hidrógeno, oxígeno o nitrógeno gaseosos.

Se pueden usar varios otros dispositivos de irradiación en los métodos descritos en la presente memoria, incluyendo fuentes de ionización de campo, separadores de iones electrostáticos, generadores de ionización de campo, fuentes de emisión termoiónica, fuentes de iones de descarga de microondas, aceleradores de recirculación o estáticos, aceleradores lineales dinámicos, aceleradores de van de Graaff, y aceleradores en tandem plegados. Dichos dispositivos se describen, por ejemplo, en la solicitud provisional de EE.UU. nº de serie 61/073.665.

35

Haz de electrones

40 En algunas realizaciones, se usa un haz de electrones como la fuente de radiación. Un haz de electrones tiene las ventajas de tasas de dosis altas (p. ej., 1, 5 o incluso 10 Mrad por segundo), alto rendimiento, menos contención, y menos equipamiento de confinamiento. Los electrones también pueden ser más eficaces en la producción de escisión de cadena. Además, los electrones que tienen energías de 4-10 MeV pueden tener una profundidad de penetración de 5 a 30 mm o más, tal como 40 mm.

40

45 Los haces de electrones se pueden generar, p. ej., mediante generadores electrostáticos, generadores de cascada, generadores transformadores, aceleradores de baja energía con un sistema de barrido, aceleradores de baja energía con un cátodo lineal, aceleradores lineales y aceleradores pulsados. Los electrones como una fuente de radiación ionizante pueden ser útiles, p. ej., para pilas de materiales relativamente finas, p. ej., menores de 1,27 cm (0,5 pulgadas), p. ej., menor de 1,016 cm, 0,762 cm, 0,508 cm (0,4, 0,3, 0,2 pulgadas), o menor de 0,254 cm (0,1 pulgadas). En algunas realizaciones, la energía de cada electrón del haz de electrones es de aproximadamente 0,3 MeV a aproximadamente 2,0 MeV (millones de electronvoltios), p. ej., de aproximadamente 0,5 MeV a aproximadamente 1,5 MeV, o de aproximadamente 0,7 MeV a aproximadamente 1,25 MeV.

50

La figura 11A muestra un diagrama de flujo del procedimiento 3000 que incluye varias etapas en una secuencia de pretratamiento de la materia prima por irradiación de haz de electrones. En la primera etapa 3010, se recibe un

suministro de materia prima seca de una fuente de alimentación. Como se ha descrito antes, la materia prima seca de la fuente de alimentación puede ser preprocesada antes del suministro a los dispositivos de irradiación de haz de electrones. Por ejemplo, si la materia prima deriva de fuentes vegetales, se pueden separar determinadas partes del material vegetal antes de recoger el material vegetal y/o antes de suministrar el material vegetal mediante el dispositivo de transporte de materia prima. Alternativamente, o además, como se expresa en la etapa opcional 3020, la materia prima de biomasa se puede someter a procesamiento mecánico (p. ej., para reducir la longitud media de las fibras en la materia prima) antes de suministrar a los dispositivos de irradiación de haz de electrones.

En la etapa 3030, la materia prima seca se transfiere a un dispositivo de transporte de materia prima (p. ej., una cinta transportadora) y se distribuye sobre la anchura transversal del dispositivo de transporte de materia prima de manera uniforme en volumen. Esto se puede lograr, por ejemplo, manualmente o por inducción de un movimiento de vibración localizado en algún punto en el dispositivo de transporte de materia prima antes del procesamiento por irradiación de haz de electrones.

En algunas realizaciones, un sistema de mezcla introduce un agente químico 3045 en la materia prima en un procedimiento opcional 3040 que produce una suspensión. La combinación de agua con la materia prima procesada en la etapa de mezcla 3040 crea una suspensión acuosa de materia prima que se puede transportar, por ejemplo, por las tuberías en lugar de usar, por ejemplo, una cinta transportadora.

La siguiente etapa 3050 es un bucle que abarca exponer la materia prima (en forma seca o de suspensión) a radiación con haz de electrones por uno o más (digamos,  $N$ ) dispositivos de irradiación de haz de electrones. La suspensión de materia prima se mueve por cada una de las  $N$  "duchas" de haces de electrones en la etapa 3052. El movimiento puede ser a una velocidad continua a través y entre las duchas, o puede haber una pausa a través de cada ducha, seguido de un movimiento repentino a la siguiente ducha. Una pequeña rendija de la suspensión de materia prima es expuesta en cada ducha durante algún tiempo de exposición predeterminado en la etapa 3053.

Los dispositivos de irradiación de haz de electrones se pueden obtener en el comercio de Ion Beam Applications, Louvain-la-Neuve, Bélgica, o the Titan Corporation, San Diego, CA. Las energías de electrones típicas pueden ser de 1 MeV, 2 MeV, 4,5 MeV, 7,5 MeV, o 10 MeV. La potencia del dispositivo de irradiación de haz de electrones típica puede ser 1 kW, 5 kW, 10 kW, 20 kW, 50 kW, 100 kW, 250 kW, o 500 kW. La eficacia de la despolimerización de la suspensión de materia prima depende de la energía de electrones usada y la dosis aplicada, mientras que el tiempo de exposición depende de la potencia y la dosis. Las dosis típicas pueden tener valores de 1 kGy, 5 kGy, 10 kGy, 20 kGy, 50 kGy, 100 kGy, o 200 kGy.

El compromiso cuando se consideran las especificaciones de potencia del dispositivo de irradiación de haz de electrones incluye el coste de operar, costes de capital, depreciación y espacio del dispositivo. El compromiso cuando se consideran los niveles de dosis de la irradiación de haz de electrones serían los costes energéticos y los problemas de entorno, seguridad y salud (ESH). El compromiso cuando se consideran las energías de los electrones incluyen los costes energéticos; aquí, una energía de electrones baja puede ser ventajosa para potenciar la despolimerización de algunas suspensiones de materias primas (véase, por ejemplo, Bouchard, et al, *Cellulose* (2006) 13: 601-610). Típicamente, los generadores están contenidos en una cámara aislada, p. ej., de plomo, u hormigón u hormigón forrado de plomo.

Puede ser ventajoso proporcionar un doble paso de irradiación de haz de electrones con el fin de proporcionar un procedimiento de despolimerización más eficaz. Por ejemplo, el dispositivo de transporte de materia prima dirigiría la materia prima (en forma seca o de suspensión) por debajo y en dirección inversa a su dirección de transporte inicial. Los sistemas de doble paso pueden permitir procesar suspensiones de materia prima más espesas y pueden proporcionar una despolimerización más uniforme a través del espesor de la suspensión de materia prima.

El dispositivo de irradiación de haz de electrones puede producir un haz fijo o un haz de barrido. Un haz de barrido puede ser ventajoso con longitudes de barrido grandes y velocidades de barrido altas, ya que esto sustituiría eficazmente una anchura de haz fijo grande. Además, están disponibles anchuras de barrido de 0,5 m, 1 m, 2 m o más.

Una vez que se ha transportado una parte de la suspensión de materia prima a través de los  $N$  dispositivos de irradiación de electrones, puede ser necesario en algunas realizaciones, como en la etapa 3060, separar mecánicamente los componentes líquidos y sólidos de la suspensión de materia prima. En estas realizaciones, una parte líquida de la suspensión de materia prima se filtra para las partículas sólidas residuales y se vuelve a reciclar a la etapa de preparación de suspensión 3040. Una parte sólida de la suspensión de materia prima después se avanza a la siguiente etapa de procesamiento 3070 por el dispositivo de transporte de materia prima. En otras realizaciones, la materia prima se mantiene en forma de suspensión para el procesamiento posterior.

Radiación electromagnética.

En realizaciones en las que la irradiación se lleva a cabo con radiación electromagnética, la radiación electromagnética puede tener, p. ej., una energía por fotón (en electronvoltios), mayor que  $10^2$  eV, p. ej., mayor que  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ , o incluso mayor que  $10^7$  eV. En algunas realizaciones, la radiación electromagnética tiene una energía por fotón de entre  $10^4$  y  $10^7$ , p. ej., entre  $10^5$  y  $10^6$  eV. La radiación electromagnética puede tener una

frecuencia de, p. ej., mayor que  $10^{16}$  Hz, mayor que  $10^{17}$  Hz,  $10^{18}$ ,  $10^{19}$ ,  $10^{20}$ , o incluso mayor que  $10^{21}$  Hz. En algunas realizaciones, la radiación electromagnética tiene una frecuencia de entre  $10^{18}$  y  $10^{22}$  Hz, p. ej., entre  $10^{19}$  y  $10^{21}$  Hz.

#### Dosis

- 5 La irradiación (con cualquier fuente de radiación o una combinación de fuentes) se lleva a cabo hasta que el material recibe una dosis de al menos 5,0 Mrad o al menos 10,0 Mrad.

En algunas realizaciones, la irradiación se lleva a cabo con una dosis por unidad de tiempo entre 5,0 y 1500,0 kilorads/hora, p. ej., entre 10,0 y 750,0 kilorads/hora o entre 50,0 y 350,0 kilorads/hora.

- 10 En algunas realizaciones, se usan dos o más fuentes de radiación, tal como dos o más radiaciones ionizantes. Por ejemplo, las muestras se pueden tratar, en cualquier orden, con un haz de electrones, seguido de radiación gamma y luz UV que tiene longitudes de onda de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 280 nm. En algunas realizaciones, las muestras se tratan con tres fuentes de radiación ionizante, tal como un haz de electrones, radiación gamma y luz UV energética.

- 15 Alternativamente, en otro ejemplo, un material fibroso que incluye un material celulósico y/o lignocelulósico se irradia y, opcionalmente, se trata con energía acústica, p. ej., ultrasonidos.

- 20 En un ejemplo del uso de radiación como un pretratamiento, se usa como materia prima 1,89 litros de cartones de zumo hechos de cartón Kraft blanco polirrevestido no impreso, que tiene una densidad aparente de  $320,36 \text{ kg/m}^3$  ( $20 \text{ lb/ft}^3$ ). Los cartones se doblan planos y después se alimentan a una secuencia de tres trenes de desmenuzadora-cizalladora dispuestos en serie con la salida de la primera cizalladora alimentada como entrada a la segunda desmenuzadora, y la salida de la segunda cizalladora alimentada como entrada a la tercera desmenuzadora. El material fibroso producido por el tren de desmenuzadora-cizalladora se puede pulverizar con agua y procesar mediante un molino de pelets que trabaja a temperatura ambiente. Los pelets densificados se ponen en una ampolla de vidrio, que se evacúa con alto vacío y después se vuelve a llenar con gas argón. La ampolla se sella bajo atmósfera de argón. Alternativamente, en otro ejemplo, la ampolla se sella en una atmósfera de aire. Los pelets en la
- 25 la ampolla se irradian con radiación gamma durante aproximadamente 3 horas con una dosis por unidad de tiempo de aproximadamente 1 Mrad por hora para proporcionar un material irradiado en el que la celulosa tiene un peso molecular menor que el material de partida.

#### Aditivos para potenciar la reducción de peso molecular durante la irradiación

- 30 En algunas realizaciones, antes de la irradiación, se pueden añadir diferentes materiales, p. ej., sólidos o líquidos, a la biomasa para potenciar la reducción de peso molecular. En estos casos, en los que se usa líquido, el líquido se puede poner en contacto con las superficies externas de la biomasa y/o el líquido puede estar en partes interiores de la biomasa, p. ej., infundido en la biomasa.

- 35 Por ejemplo, el material puede ser una base débil neutra, tal como alanina, amoniaco, mezcla de amoniaco/agua, p. ej., 25 por ciento en peso de amoniaco en agua, agua, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, piridina o una base aniónica, tal como una sal del ácido acético (p. ej., acetato sódico), carbonato sódico, bicarbonato sódico o una sal de un ion de sulfuro de hidrógeno (p. ej., hidrosulfuro sódico).

Alternativamente, el material puede ser un ácido débil neutro, tal como ácido fórmico, ácido acético, ácido tricloroacético, agua, sulfuro de hidrógeno o un ácido catiónico, tal como una sal de amonio.

#### Inactivación y funcionalización controlada de la biomasa

- 40 Después del tratamiento con una o más radiaciones ionizantes, tales como radiación fotónica (p. ej., rayos X o rayos gamma), radiación de haz de electrones o partículas más pesadas que los electrones con carga positiva o negativa (p. ej., protones o iones de carbono), cualquiera de los materiales que contienen hidratos de carbono o mezclas descritas en la presente memoria son ionizadas, es decir, incluyen radicales en niveles que son detectables con un espectrómetro de resonancia de espín electrónico. El límite práctico actual de la detección de los radicales es aproximadamente  $10^{14}$  espines a temperatura ambiente. Después de ionización, cualquier material de biomasa que se ha ionizado puede reducir el nivel de radicales en la biomasa ionizada, p. ej. de modo que los radicales ya no sean detectables con el espectrómetro de resonancia de espín electrónico. Por ejemplo, los radicales se pueden inactivar por aplicación de suficiente presión a la biomasa y/o usando un fluido en contacto con la biomasa ionizada, tal como un gas o líquido, que reaccione (inactive) los radicales. El uso de un gas o líquido para al menos ayudar a
- 45 la inactivación de los radicales también permite que el operador controle la funcionalización de la biomasa ionizada con una cantidad y tipo de grupos funcionales deseados, tales como grupos ácido carboxílico, grupos enol, grupos aldehído, grupos nitro, grupos nitrilo, grupos amino, grupo alquilamino, grupos alquilo, grupos cloroalquilo o grupos clorofluoroalquilo. En algunos casos, dicha inactivación puede mejorar la estabilidad de algunos de los materiales de biomasa ionizados. Por ejemplo, la inactivación puede mejorar la resistencia de la biomasa a la oxidación. La
- 50 funcionalización por inactivación también puede mejorar la solubilidad de cualquier biomasa descrita en la presente memoria, puede mejorar su estabilidad térmica, lo cual puede ser importante en la fabricación de materiales
- 55

compuestos y cartones descritos en la presente memoria, y puede mejorar el uso del material por diferentes microorganismos. Por ejemplo, los grupos funcionales impartidos al material de la biomasa por inactivación pueden actuar como sitios receptores para la unión por microorganismos, p. ej., para potenciar la hidrólisis de la celulosa por diferentes microorganismos.

5 La figura 11B ilustra el cambio de una estructura molecular y/o supramolecular de una materia prima de biomasa por el pretratamiento de la materia prima de biomasa con radiación ionizante, tal como con electrones o iones de suficiente energía para ionizar la materia prima de biomasa, para proporcionar un primer nivel de radicales. Como se muestra en la figura 11B, si la biomasa ionizada permanece en la atmósfera, se oxidará, en una medida en la que se generan grupos ácido carboxílico por reacción con el oxígeno atmosférico. En algunos casos, con algunos materiales, dicha oxidación es deseada porque puede ayudar a la posterior reducción del peso molecular de la biomasa que contiene hidratos de carbono, y los grupos de oxidación, p. ej., grupos ácido carboxílico pueden ser útiles para la solubilidad y el uso por los microorganismos para algunos casos. Sin embargo, puesto que los radicales pueden “vivir” durante algún tiempo después de la irradiación, p. ej., más de 1 día, 5 días, 30 días, 3 meses, 6 meses o incluso más de 1 año, las propiedades del material pueden seguir cambiando a lo largo del tiempo, lo que en algunos casos, puede no ser conveniente. La detección de radicales en muestras irradiadas por espectroscopía de resonancia de espín electrónico y las vidas de los radicales en dichas muestras se describe en Bartolotta et al., *Physics in Medicine and Biology*, 46 (2001), 461-471 y en Bartolotta et al., *Radiation Protection Dosimetry*, Vol. 84, Nos. 1-4, págs. 293-296 (1999). Como se muestra en la figura 11B, la biomasa ionizada se puede inactivar para funcionalizar y/o estabilizar la biomasa ionizada. En cualquier momento, p. ej., cuando el material está “vivo”, “parcialmente vivo” o totalmente inactivado, la biomasa pretratada se puede convertir en un producto, p. ej., un combustible, un alimento o un material compuesto.

En algunas realizaciones, la inactivación incluye una aplicación de presión a la biomasa, tal como por deformación mecánica de la biomasa, p. ej., comprimir directamente mecánicamente la biomasa en una, dos o tres dimensiones, o aplicar presión a un fluido en el que está sumergido la biomasa, p. ej., presión isostática. En dichos casos, la propia deformación del material da radicales, que a menudo son atrapados en los dominios cristalinos, suficientemente próximos de modo que los radicales se pueden recombinar, o reaccionar con otro grupo. En algunos casos, la presión se aplica junto con la aplicación de calor, con una cantidad suficiente de calor para elevar la temperatura de la biomasa por encima del punto de fusión o punto de reblandecimiento de un componente de la biomasa, tal como la lignina, celulosa o hemicelulosa. El calor puede mejorar la movilidad molecular en el material polimérico, lo que puede ayudar a la inactivación de los radicales. Cuando se usa presión para la inactivación, la presión puede ser mayor que 70,32 kg/cm<sup>2</sup> (1000 psi), tal como mayor que aproximadamente 87,88 kg/cm<sup>2</sup> (1250 psi), 101,95 kg/cm<sup>2</sup> (1450 psi), 254,86 kg/cm<sup>2</sup> (3625 psi), 356,81 kg/cm<sup>2</sup> (5075 psi), 509,72 kg/cm<sup>2</sup> (7250 psi), 703,2 kg/cm<sup>2</sup> (10000 psi) o incluso mayor que 1054,60 kg/cm<sup>2</sup> (15000 psi).

En algunas realizaciones, la inactivación incluye poner en contacto la biomasa con un fluido, tal como un líquido o gas, p. ej., un gas capaz de reaccionar con los radicales, tal como acetileno o una mezcla de acetileno en nitrógeno, etileno, etilenos clorados o clorofluoroetilenos, propileno o mezclas de estos gases. En otras realizaciones particulares, la inactivación incluye poner en contacto la biomasa con un líquido, p. ej., un líquido soluble en, o al menos capaz de penetrar en la biomasa y reaccionar con los radicales, tal como un dieno, tal como 1,5-ciclooctadieno. En algunas realizaciones específicas, la inactivación incluye poner en contacto la biomasa con un antioxidante, tal como vitamina E. Si se desea, la materia prima de biomasa puede incluir un antioxidante disperso en la misma, y la inactivación puede venir del contacto del antioxidante disperso en la materia prima de biomasa con los radicales.

Son posibles otros métodos para la inactivación. Por ejemplo, se puede usar cualquier método para inactivar radicales en materiales poliméricos descritos en Muratoglu et al., publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2008/0067724 y Muratoglu et al., patente de EE.UU. nº 7.166.650, para inactivar cualquier material de biomasa descrito en la presente memoria. Además, cualquier agente de inactivación (descrito como un “agente sensibilizante” en las descripciones citadas antes de Muratoglu) y/o cualquier antioxidante descrito en cualquiera de las referencias de Muratoglu se puede usar para inactivar cualquier material de biomasa ionizado.

La funcionalización se puede potenciar usando iones pesados con carga, tal como cualquiera de los iones más pesados descritos en la presente memoria. Por ejemplo, si se desea potenciar la oxidación, se pueden usar iones de oxígeno cargados para la irradiación. Si se desean grupos funcionales con nitrógeno, se pueden usar iones de nitrógeno o iones que incluyen nitrógeno. Igualmente, si se desean grupos funcionales con azufre o fósforo, se pueden usar iones de azufre o fósforo en la irradiación.

En algunas realizaciones, después la inactivación, cualquiera de los materiales inactivados descritos en la presente memoria se puede tratar además con una o más de radiación, tal como radiación ionizante o no ionizante, ultrasonidos, pirólisis y oxidación para el cambio adicional de la estructura molecular y/o supramolecular.

En realizaciones particulares, los materiales funcionalizados descritos en la presente memoria se tratan con un ácido, base, nucleófilo o ácido de Lewis, para el cambio adicional de estructura molecular y/o supramolecular, tal como reducción adicional del peso molecular. Los ejemplos de ácidos incluyen ácidos orgánicos, tales como ácido acético y ácidos minerales, tal como ácido clorhídrico, sulfúrico y/o nítrico. Los ejemplos de bases incluyen bases

minerales fuertes, tales como una fuente de iones hidróxido, iones básicos, tales como ion fluoruro, o bases orgánicas más débiles, tales como aminas. Incluso el agua y bicarbonato sódico, p. ej., cuando se disuelve en agua, puede realizar el cambio de estructura molecular y/o supramolecular, tal como la reducción adicional de peso molecular.

#### 5 Exposición a haz de partículas en fluidos

En algunos casos, los materiales celulósicos o lignocelulósicos se pueden exponer a un haz de partículas en presencia de uno o más fluidos adicionales (p. ej., gases y/o líquidos). La exposición de un material a un haz de partículas en presencia de uno o más fluidos adicionales puede aumentar la eficacia del tratamiento.

10 En algunas realizaciones, el material se expone a un haz de partículas en presencia de un fluido tal como aire. Las partículas aceleradas en uno cualquiera o más de los tipos de aceleradores descritos en la presente memoria (u otro tipo de acelerador) se acoplan fuera del acelerador por un puerto de salida (p. ej., una membrana fina tal como una hoja metálica), pasan por un volumen de espacio ocupado por el fluido, y después se hacen incidir en el material. Además de tratar directamente el material, algunas de las partículas generan especies químicas adicionales interaccionando con partículas de fluido (p. ej., iones y/o radicales generados a partir de diferentes constituyentes del aire, tales como ozono y óxidos de nitrógeno). Estas especies químicas generadas también pueden interaccionar con el material, y pueden actuar como iniciadores para una variedad de diferentes reacciones de rotura de enlaces químicos en el material. Por ejemplo, cualquier oxidante producido puede oxidar el material, lo cual puede dar como resultado la reducción de peso molecular.

20 En algunas realizaciones, se pueden introducir selectivamente fluidos adicionales en la ruta del haz de partículas antes de hacer incidir el haz en el material. Como se ha discutido antes, las reacciones entre las partículas del haz y las partículas de los fluidos introducidos pueden generar especies químicas adicionales que reaccionan con el material y pueden ayudar a la funcionalización del material, y/o alterar selectivamente de otra manera algunas propiedades del material. El uno o más fluidos adicionales se pueden dirigir a la ruta del haz desde un tubo de suministro, por ejemplo. La dirección y el caudal del o de los fluidos que se introducen, se pueden seleccionar según una tasa de exposición deseada y/o dirección para controlar la eficacia del tratamiento general, incluyendo efectos que resultan tanto del tratamiento basado en partículas como de los efectos que se deben a la interacción de especies generadas dinámicamente a partir del fluido introducido con el material. Además del aire, los fluidos de ejemplo que se pueden introducir en el haz de iones incluyen oxígeno, nitrógeno, uno o más gases nobles, uno o más halógenos e hidrógeno.

#### 30 Irradiación de materiales de biomasa de densidad aparente baja y enfriamiento de la biomasa irradiada

Durante el tratamiento de los materiales de biomasa con radiación ionizante, en especial con dosis por unidad de tiempo altas, tales como con dosis mayores de 0,15 Mrad por segundo, p. ej., 0,25 Mrad/s, 0,35 Mrad/s, 0,5 Mrad/s, 0,75 Mrad/s o incluso mayor que 1 Mrad/s, los materiales de la biomasa pueden retener cantidades significativas de calor de modo que se eleva la temperatura de los materiales de la biomasa. Aunque en algunas realizaciones temperaturas más altas pueden ser ventajosas, p. ej., cuando se desea una velocidad de reacción más rápida, es ventajoso controlar el calentamiento de la biomasa para mantener el control sobre las reacciones químicas iniciadas por la radiación ionizante, tales como la reticulación, escisión de cadenas y/o injerto, p. ej., para mantener el control del procedimiento. Los materiales de baja densidad aparente, tales como los que tienen una densidad aparente menor que aproximadamente 0,4 g/cm<sup>3</sup>, p. ej., menor que aproximadamente 0,35, 0,25 o menor que aproximadamente 0,15 g/cm<sup>3</sup>, en especial cuando se combinan con materiales que tienen perfiles transversales finos, tales como fibras que tienen dimensiones transversales pequeñas, en general son más fáciles de enfriar. Además, los fotones y las partículas en general pueden penetrar más dentro y a través de los materiales que tienen una densidad aparente relativamente baja, lo cual puede permitir el procesamiento de volúmenes mayores de materiales con velocidades mayores, y puede permitir el uso de fotones y partículas que tienen menores energías, p. ej., 0,25 MeV, 0,5 MeV, 0,75 MeV o 1,0 MeV, que pueden reducir los requisitos de apantallamiento de seguridad.

50 Por ejemplo, en un método de cambio de una estructura molecular y/o supramolecular de una materia prima de biomasa, la biomasa se pretrata a una primera temperatura con radiación ionizante, tal como fotones, electrones o iones (p. ej., cationes o aniones con una o múltiples cargas), durante un tiempo suficiente y/o con una dosis suficiente para elevar la materia prima de biomasa a una segunda temperatura mayor que la primera temperatura. La biomasa pretratada después se enfría a una tercera temperatura inferior a la segunda temperatura. Finalmente, si se desea, la biomasa enfriada se puede tratar una o más veces con radiación, p. ej., con radiación ionizante. Si se desea, se puede aplicar enfriamiento a la biomasa después y/o durante cada tratamiento de radiación.

55 La materia prima de biomasa se puede preparar físicamente como se ha descrito antes, p. ej., reduciendo una o más dimensiones de los trozos individuales de la materia prima de biomasa de modo que la materia prima pueda ser procesada más eficazmente, p. ej., más fácilmente enfriada y/o más fácilmente penetrada por una radiación ionizante.

En algunas implementaciones, la radiación ionizante se aplica con una dosis total menor que 25 Mrad o menor que 10 MRad, tal como menos de 5 Mrad o menos de 2,5 Mrad y a una velocidad de más de 0,25 Mrad por segundo, tal

como más de 0,5, 0,75 o mayor que 1,0 Mrad/s, antes de enfriar la biomasa.

El pretratamiento de la materia prima de biomasa con radiación ionizante se puede llevar a cabo cuando la materia prima de biomasa está siendo transportada neumáticamente en un fluido, tal como en un gas, p. ej., nitrógeno o aire. Para ayudar a la reducción del peso molecular y/o funcionalización de los materiales, el gas puede estar saturado con cualquier agente de hinchamiento descrito en la presente memoria y/o vapor de agua. Por ejemplo, se puede usar vapor de agua ácido. Para ayudar a la reducción de peso molecular, el agua se puede acidificar con un ácido orgánico, tal como ácido fórmico, o acético, o un ácido mineral, tal como ácido sulfúrico o clorhídrico.

El pretratamiento de la materia prima de biomasa con radiación ionizante se puede llevar a cabo cuando la materia prima de biomasa cae bajo la influencia de la gravedad. Este procedimiento puede reducir eficazmente la densidad aparente de la materia prima de biomasa cuando está siendo procesada y puede ayudar al enfriamiento de la materia prima de biomasa. Por ejemplo, la biomasa se puede transportar desde una primera cinta a una primera altura por encima del suelo y después puede ser capturada por una segunda cinta en un segundo nivel por encima del suelo menor que el primer nivel. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el borde trasero de la primera cinta y el borde delantero de la segunda cinta definen un hueco. Ventajosamente, la radiación ionizante, tal como un haz de electrones, protones u otros iones, se puede aplicar en el hueco para evitar daño al sistema de transporte de biomasa.

El enfriamiento de la biomasa puede incluir poner en contacto la biomasa con un fluido, tal como un gas, a una temperatura inferior a la primera y segunda temperaturas, tal como nitrógeno gaseoso a o aproximadamente a 77K. Se puede usar incluso agua, tal como agua a una temperatura inferior a la temperatura ambiente nominal (p. ej. 25°C).

A menudo ventajosamente, la materia prima de biomasa tiene fibras internas, y antes de la irradiación con la radiación ionizante, la materia prima de biomasa se ha cizallado en una extensión tal que sus fibras interiores están sustancialmente expuestas. Esta cizalladura puede proporcionar un material de densidad aparente baja que tiene dimensiones del corte transversal pequeñas, lo que puede ayudar a la rotura y/o funcionalización de la biomasa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la biomasa es o incluye fibras discretas y/o partículas que tienen una dimensión máxima de no más de aproximadamente 0,5 mm, tal como no más de aproximadamente 0,25 mm, no más de aproximadamente 0,1 mm o no más de aproximadamente 0,05 mm.

En algunas realizaciones, la materia prima de biomasa a la que se aplica la radiación ionizante tiene una densidad aparente menor que aproximadamente 0,35 g/cm<sup>3</sup>, tal como menor que aproximadamente 0,3, 0,25, 0,20, o menor que aproximadamente 0,15 g/cm<sup>3</sup> durante la aplicación de la radiación ionizante. En dichas realizaciones, la materia prima de biomasa se puede enfriar, y después la radiación ionizante se puede aplicar a la biomasa enfriada. En algunas realizaciones ventajosas, la materia prima de biomasa es o incluye fibras discretas y/o partículas que tienen una dimensión máxima de no más de aproximadamente 0,5 mm, tal como no más de aproximadamente 0,25 mm, no más de aproximadamente 0,1 mm, no más de aproximadamente 0,05 mm, o no más de aproximadamente 0,025 mm.

Dispositivos combinados de irradiación, pirólisis, ultrasonidos y/u oxidación

En algunas realizaciones, puede ser ventajoso combinar dos o más dispositivos separados de irradiación, ultrasonidos, pirólisis y/u oxidación en una sola máquina híbrida. Usando dicha máquina híbrida, se pueden llevar a cabo múltiples procedimientos en yuxtaposición cercana o incluso simultáneamente, con el beneficio de producción creciente del pretratamiento y potenciales ahorros de coste.

Por ejemplo, considérense los procedimientos de irradiación de haz de electrones y tratamiento de ultrasonidos. Cada procedimiento separado es eficaz para reducir el peso molecular medio del material celulósico en un orden de magnitud o más, y en varios órdenes de magnitud cuando se lleva en serie.

Los procedimientos tanto de irradiación como de tratamiento con ultrasonidos se pueden aplicar usando un dispositivo híbrido de haz de electrones/ultrasonido como se ilustra en la figura 25. El dispositivo híbrido de haz de electrones/ultrasonido 2500 está representado encima de una piscina poco profunda (profundidad ~3-5 cm) de una suspensión de material celulósico 2550 disperso en un medio acuoso, oxidante, tal como peróxido de hidrógeno o peróxido de carbamida. El dispositivo híbrido 2500 tiene una fuente de energía 2510, que acciona tanto el emisor de haz de electrones 2540 como los sonotrodos de ultrasonidos 2530.

El emisor de electrones 2540 genera haces de electrones, que pasan por un dispositivo que dirige el haz de electrones 2545 para que impacte en la suspensión 2550 que contiene material celulósico. El dispositivo que dirige el haz de electrones puede ser un escáner que hace un barrido de un haz a lo largo de un intervalo de hasta aproximadamente 182,9 cm (6 pies) en una dirección aproximadamente paralela a la superficie de la suspensión 2550.

Al otro lado del emisor de haz de electrones 2540 están los sonotrodos de ultrasonidos 2530, que suministran energía de ondas ultrasónicas a la suspensión 2550. Los sonotrodos de ultrasonidos 2530 terminan en una pieza final desprendible 2535 que está en contacto con la suspensión 2550.

Los sonotrodos de ultrasonidos 2530 tienen riesgo de dañarse por la exposición residual a largo plazo de la radiación de haz de electrones. Por lo tanto, los sonotrodos se pueden proteger con una pantalla estándar 2520, p. ej., hecha de plomo o una aleación que contiene metal pesado, tal como metal de Lipowitz que sea impenetrable por la radiación de haz de electrones. Sin embargo, se debe tener precaución de asegurarse que la energía ultrasónica no es afectada por la presencia de la pantalla. Las piezas finales desprendibles 2535, que están construidas del mismo material y unidas a los sonotrodos 2530, están en contacto con el material celulósico 2550 durante el procesamiento y se prevé que sean dañadas. Por consiguiente, las piezas finales desprendibles 2535 están construidas para que sean fácilmente sustituibles.

Un beneficio adicional de dicho procedimiento simultáneo de haz de electrones y ultrasonidos, es que los dos procedimientos tienen resultados complementarios. Con la irradiación del haz de electrones solo, una dosis insuficiente puede dar como resultado reticulación de algunos de los polímeros en el material celulósico, lo que disminuye la eficacia del procedimiento de despolimerización general. También se pueden usar dosis menores de irradiación de haz de electrones y/o radiación de ultrasonidos, para lograr el mismo grado de despolimerización que se logra usando la irradiación de haz de electrones y los ultrasonidos por separado. Un dispositivo de haz de electrones se puede combinar con uno o más dispositivos de rotor-estátor, de alta frecuencia, que se pueden usar como una alternativa a los dispositivos de tratamientos con ultrasonidos.

También son posibles otras combinaciones de dispositivos. Por ejemplo, se puede combinar un dispositivo de radiación ionizante que produce radiación gamma emitida, p. ej., de pelets de  $^{60}\text{Co}$ , con una fuente de haz de electrones y/o una fuente de ondas ultrasónicas. Los requisitos de apantallamiento pueden ser más exigentes en este caso.

Los dispositivos de radiación para el pretratamiento de biomasa discutidos antes, también se pueden combinar con uno o más dispositivos que realizan una o más secuencias de procesamiento de pirólisis. Dicha combinación puede tener de nuevo la ventaja de rendimiento mayor. No obstante, se debe tener precaución, ya que puede haber requisitos en conflicto entre algunos procedimientos de radiación y la pirólisis. Por ejemplo, los dispositivos de radiación de ultrasonidos pueden requerir que la alimentación se sumerja en un medio líquido oxidante. Por otra parte, como se ha descrito previamente, puede ser ventajoso para una muestra de alimentación que se somete a pirólisis tener un contenido de humedad particular. En este caso, los nuevos sistemas miden y controlan automáticamente un contenido de humedad particular y regulan el mismo. Además, algunos o todos los dispositivos anteriores, en especial, el dispositivo de pirólisis, se pueden combinar con un dispositivo de oxidación como se ha discutido previamente.

#### Procedimientos primarios

##### Fermentación

El microorganismo puede ser un microorganismo natural o un microorganismo genéticamente modificado. Por ejemplo, el microorganismo puede ser una bacteria, un hongo, p. ej., una levadura, una planta o un protista, p. ej., un alga, un protozoo o un protista de tipo hongo, p. ej., un moho del fango. Cuando los organismos son compatibles, se pueden usar mezclas de organismos.

Durante la fermentación, se fermentan, p. ej., en etanol, mediante un microorganismo de fermentación tal como levadura. Los microorganismos de fermentación adecuados tienen la capacidad de convertir hidratos de carbono, tales como glucosa, xilosa, arabinosa, manosa, galactosa, oligosacáridos o polisacáridos, en productos de fermentación. La fermentación de microorganismos incluye cepas del género *Saccharomyces spp.* p. ej., *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadería), *Saccharomyces distaticus*, *Saccharomyces uvarum*; el género *Kluyveromyces*, p. ej., especies *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis*; el género *Candida*, p. ej., *Candida pseudotropicalis*, y *Candida brassicae*, *Pichia stipitis* (un pariente de *Candida shehatae*), el género *Clavispora*, p. ej., especies *Clavispora lusitanae* y *Clavispora opuntiae*, el género *Pachysolen*, p. ej., especies *Pachysolen tannophilus*, el género *Bretannomyces*, p. ej., especies *Brelannomyces clausenii* (Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, en Handbook on Bioetanol: Production and Utilization, Wyman, C.E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212).

La levadura disponible en el comercio incluye, por ejemplo, Red Star®/Lesaffre Etanol Red (disponible en Red Star/Lesaffre, EE.UU.) FALI® (disponible en Fleischmann's Yeast, una rama de Burns Philip Food Inc., EE.UU.), SUPERSTART® (disponible en Alltech), GERT STRAND® (disponible en Gert Strand AB, Suecia) y FERMOL® (disponible en DSM Specialties).

Las bacterias que pueden fermentar biomasa en etanol y otros productos incluyen, p. ej., *Zymomonas mobilis* y *Clostridium thermocellum* (Philippidis, 1996, véase antes).

La fermentación de biomasa en etanol y otros productos, se puede llevar a cabo usando ciertos tipos de microorganismos termófilos o genéticamente modificados, tal como especies de termoanaerobacterias, incluyendo *T. mathranii*, y especies de levaduras, tales como *Pichia species*. Un ejemplo de una cepa de *T. mathranii* es A3M4 descrita en Sonne-Hansen et al. (*Applied Microbiology and Biotechnology* 1993, 38, 537-541) o Ahring et al. (*Arch. Microbiol* 1997, 168, 114-119).



Se pueden usar levaduras y bacterias *Zymomonas* para la fermentación o conversión. El pH óptimo para la levadura es aproximadamente de pH 4 a 5, mientras que el pH óptimo para *Zymomonas* es de aproximadamente pH 5 a 6. Los tiempos de fermentación típicos son de aproximadamente 24 a 96, con intervalos de temperatura en el intervalo de 26°C a 40°C, sin embargo, los microorganismos termófilos prefieren temperaturas más altas.

- 5 Se pueden usar fermentadores móviles, como se describe en la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº de serie 60/832.735, ahora solicitud internacional publicada nº WO 2008/011598.

#### Postprocesamiento

##### Destilación

- 10 Después de la fermentación, los fluidos resultantes se pueden destilar usando, por ejemplo, una "columna de cerveza" para separar el etanol y otros alcoholes de la mayoría del agua y sólidos residuales. El vapor que sale de la columna de cerveza puede ser, p. ej., 35% en peso de etanol y se puede alimentar a la columna rectificadora. Una mezcla de etanol y agua casi azeotrópica (92,5%) de la columna rectificadora se puede purificar a etanol puro (99,5%) usando tamices moleculares en fase de vapor. Las partes finales de la columna de cerveza se pueden enviar al primer efecto de un evaporador de tres efectos. El refrigerante de reflujo de la columna de rectificación
- 15 puede proporcionar calor para este primer efecto. Después del primer efecto, se pueden separar los sólidos usando una centrífuga y secar en secador rotatorio. Una parte (25%) del efluente de la centrífuga se puede reciclar a la fermentación y el resto enviar a un segundo y tercer efectos del evaporador. La mayor parte del condensado del evaporador se puede devolver al procedimiento como condensado bastante limpio, con una pequeña porción fraccionada al tratamiento de aguas residuales, para prevenir la acumulación de compuestos de bajo punto de
- 20 ebullición.

##### Productos / coproductos

##### Alcoholes

- 25 El alcohol producido puede ser un alcohol monohidroxílico, p. ej., etanol o un alcohol polihidroxílico, p. ej., etilenglicol o glicerina. Los ejemplos de alcoholes que se pueden producir incluyen metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, p. ej., n-, sec- o t-butanol, etilenglicol, propilenglicol, 1,4-butanodiol, glicerina, o mezclas de estos alcoholes.

Cada uno de los alcoholes producido por la instalación tiene valor comercial como materia prima industrial. Por ejemplo, el etanol se puede usar en la fabricación de barnices y perfumes. Como otro ejemplo, el metanol se puede usar como un disolvente usado como un componente en líquido limpiaparabrisas. Como otro ejemplo más, se puede usar butanol en plastificantes, resinas, lacas y líquidos de frenos.

- 30 El bioetanol producido por la instalación es valioso como un ingrediente usado en la industria de alimentación y bebidas. Por ejemplo, el etanol producido por la instalación se puede purificar a alcohol de calidad alimentaria y usar como un ingrediente principal en bebidas alcohólicas.

- 35 El bioetanol producido en la instalación también tiene valor comercial como un combustible para el transporte. El uso de etanol como un combustible para el transporte se puede implementar con inversión de capital relativamente pequeña a partir de fabricantes y propietarios de motores de encendido por chispa (p. ej., cambios en el tiempo de inyección, relación de combustible a aire, y componentes del sistema de inyección de combustible). Muchos fabricantes de automóviles actualmente ofrecen vehículos de combustible flexible, capaces de trabajar con mezclas de etanol/gasolina de hasta 85% en volumen de etanol (p. ej., equipamiento estándar en un Chevy Tahoe 4 x 4).

- 40 El bioetanol producido por esta instalación se puede usar como un combustible de motor para mejorar las condiciones ambientales y económicas más allá de la ubicación de la instalación. Por ejemplo, el etanol producido por esta instalación se puede usar como un combustible para reducir las emisiones de gas invernadero de fuentes hechas por el hombre (p. ej., de fuentes de transporte). Como otro ejemplo, el etanol producido por esta instalación y usado como un combustible de motor también puede desplazar el consumo de gasolina refinada procedente del petróleo.

- 45 El bioetanol tiene un número de octanos mayor que la gasolina convencional, y por lo tanto, se puede usar para mejorar el rendimiento (p. ej., permitir mayores relaciones de compresión) de motores de encendido por chispa. Por ejemplo, pequeñas cantidades (p. ej., 10% en volumen) de etanol se pueden mezclar con gasolina para actuar como un potenciador de octanos para combustibles usados en los motores de encendido por chispa. Como otro ejemplo, se pueden mezclar cantidades mayores (p. ej., 85% en volumen) de etanol con gasolina para aumentar más el
- 50 número de octanos del combustible y desplazar volúmenes mayores de gasolina.

- 55 Las estrategias del bioetanol se describen, p. ej., por DiPardo en *Journal of Outlook for Biomass Ethanol Production and Demand (EIA Forecasts)*, 2002; Sheehan en *Biotechnology Progress*, 15:8179, 1999; Martin en *Enzyme Microbes Technology*, 31:274, 2002; Greer en *BioCycle*, 61-65, Abril 2005; Lynd en *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66:3, 506-577, 2002; Ljungdahl et al. en la patente de EE.UU. nº 4.292.406; y Bellamy en la patente de EE.UU. nº 4.094.742.

## Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos producidos pueden incluir ácidos monocarboxílicos o policarboxílicos. Los ejemplos de ácidos orgánicos incluyen ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caproico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido  $\gamma$ -hidroxibutírico, o mezclas de estos ácidos.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos se pretende que ilustren y no limiten las enseñanzas de esta descripción.

### Ejemplo de referencia 1 - Preparación de material fibroso a partir de papel polirrevestido

Se obtuvo una carga de 680,4 kg (1500 libras) de cartones de zumo de 1,89 litros (0,5 galones) hechos de cartón Kraft blanco polirrevestido no impreso que tenía una densidad aparente de  $320,36 \text{ kg/m}^3$  ( $20 \text{ lb/ft}^3$ ), de International Paper. Cada cartón se dobló plano, y después se alimentó a una desmenuzadora 3 hp Flinch Baugh a una velocidad de aproximadamente 6,80 a 9,07 kg/hora (15 a 20 libras por hora). La desmenuzadora estaba equipada con dos palas rotatorias de 30,5 cm (12 pulgadas), dos palas fijas y un tamiz de descarga de 0,76 cm (0,30 pulgadas). El hueco entre las palas rotatorias y las fijas se ajustó a 0,254 cm (0,10 pulgadas). El resultado de la desmenuzadora parecía confeti que tenía una anchura entre 0,254 cm (0,1 pulgadas) y 1,27 cm (0,5 pulgadas), una longitud de entre 0,635 cm (0,25 pulgadas) y 2,54 cm (1 pulgada) y un espesor equivalente al del material de partida (aproximadamente 0,19 cm (0,075 pulgadas)).

El material de tipo confeti se alimentó a una cortadora de cuchillas rotativas Munson, modelo SC30. El modelo SC30 está equipado con 4 palas rotatorias, 4 palas fijas y un tamiz de descarga que tenía aberturas de 3,175 mm (1/8 pulgadas). El hueco entre las palas rotatorias y las fijas se estableció en 0,0508 cm (0,020 pulgadas). La cortadora de cuchillas rotativas desmenuzó los trozos de tipo confeti por los bordes de las cuchillas, desgarrando y liberando un material fibroso a una velocidad de aproximadamente 0,454 kg por hora (1 libra por hora). El material fibroso tenía una superficie específica BET de  $0,9748 \text{ m}^2/\text{g}$   $\pm$   $0,0167 \text{ m}^2/\text{g}$ , una porosidad de 89,0437 por ciento y una densidad aparente (a  $0,037 \text{ kg/cm}^2$  (0,53 psia)) de 0,1260 g/ml. Una longitud media de las fibras era 1,141 mm y una anchura media de las fibras era 0,027 mm, dando una relación L/D media de 42:1. Se muestra una micrografía electrónica de barrido del material fibroso en la figura 26 con 25 X aumentos.

### Ejemplo de referencia 2 - Preparación de material fibroso a partir de cartón Kraft blanqueado

Se obtuvo una carga de 680,4 kg (1500 libras) de cartón Kraft blanco blanqueado virgen que tenía una densidad aparente de  $480,54 \text{ kg/m}^3$  ( $30 \text{ lb/ft}^3$ ), de International Paper. El material se dobló plano, y después se alimentó a una desmenuzadora 3 hp Flinch Baugh a una velocidad de aproximadamente 6,80 a 9,07 kg/hora (15 a 20 libras por hora). La desmenuzadora estaba equipada con dos palas rotatorias de 30,5 cm (12 pulgadas), dos palas fijas y un tamiz de descarga de 0,76 cm (0,30 pulgadas). El hueco entre las palas rotatorias y las fijas se ajustó a 0,254 cm (0,10 pulgadas). El resultado de la desmenuzadora parecía confeti que tiene una anchura entre 0,254 cm (0,1 pulgadas) y 1,27 cm (0,5 pulgadas), una longitud de entre 0,635 cm (0,25 pulgadas) y 2,54 cm (1 pulgada) y un espesor equivalente al del material de partida (aproximadamente 0,19 cm (0,075 pulgadas)). El material de tipo confeti se alimentó a una cortadora de cuchillas rotativas Munson, modelo SC30. El tamiz de descarga tenía aberturas de 3,175 mm (1/8 pulgadas). El hueco entre las palas rotatorias y las fijas se estableció en 0,0508 cm (0,020 pulgadas). La cortadora de cuchillas rotativas desmenuzó los trozos de tipo confeti, liberando un material fibroso a una velocidad de aproximadamente 0,454 kg por hora (1 libra por hora). El material fibroso tenía una superficie específica BET de  $1,1346 \text{ m}^2/\text{g}$   $\pm$   $0,0103 \text{ m}^2/\text{g}$ , una porosidad de 88,3285 por ciento y una densidad aparente (a  $0,037 \text{ kg/cm}^2$  (0,53 psia)) de 0,1497 g/ml. Una longitud media de las fibras era 1,063 mm y una anchura media de las fibras era 0,0245 mm, dando una relación L/D media de 43:1. Se muestra una micrografía electrónica de barrido del material fibroso en la figura 27 con 25 X aumentos.

Ejemplo de referencia 3 - Preparación de material fibroso desmenuzado dos veces a partir de cartón Kraft blanqueado

Se obtuvo una carga de 680,4 kg (1500 libras) de cartón Kraft blanco blanqueado virgen que tenía una densidad aparente de  $480,54 \text{ kg/m}^3$  ( $30 \text{ lb/ft}^3$ ), de International Paper. El material se dobló plano, y después se alimentó a una desmenuzadora 3 hp Flinch Baugh a una velocidad de aproximadamente 6,80 a 9,07 kg/hora (15 a 20 libras por hora). La desmenuzadora estaba equipada con dos palas rotatorias de 30,5 cm (12 pulgadas), dos palas fijas y un tamiz de descarga de 0,76 cm (0,30 pulgadas). El hueco entre las palas rotatorias y las fijas se ajustó a 0,254 cm (0,10 pulgadas). El resultado de la desmenuzadora parecía confeti. El material de tipo confeti se alimentó a una cortadora de cuchillas rotativas Munson, modelo SC30. El tamiz de descarga tenía aberturas de 1,59 mm (1/16 pulgadas). El hueco entre las palas rotatorias y las fijas se estableció en 0,0508 cm (0,020 pulgadas). La cortadora de cuchillas rotativas desmenuzó los trozos de tipo confeti, liberando un material fibroso a una velocidad de aproximadamente 0,454 kg por hora (1 libra por hora). El material resultante de la primera cizalladura se volvió a alimentar al mismo inicio descrito antes y se desmenuzó de nuevo. El material fibroso resultante tenía una superficie específica BET de  $1,4408 \text{ m}^2/\text{g}$   $\pm$   $0,0156 \text{ m}^2/\text{g}$ , una porosidad de 90,8997 por ciento y una densidad aparente (a  $0,037 \text{ kg/cm}^2$  (0,53 psia)) de 0,1298 g/ml. Una longitud media de las fibras era 0,891 mm y una anchura media de las

fibras era 0,026 mm, dando una relación L/D media de 34:1. Se muestra una micrografía electrónica de barrido del material fibroso en la figura 28 con 25 X aumentos.

Ejemplo de referencia 4 - Preparación de material fibroso desmenuzado tres veces a partir de cartón Kraft blanqueado

- 5 Se obtuvo una carga de 680,4 kg (1500 libras) de cartón Kraft blanco blanqueado virgen que tenía una densidad aparente de 480,54 kg/m<sup>3</sup> (30 lb/ft<sup>3</sup>), de International Paper. El material se dobló plano, y después se alimentó a una desmenuzadora 3 hp Flinch Baugh a una velocidad de aproximadamente 6,80 a 9,07 kg/hora (15 a 20 libras por hora). La desmenuzadora estaba equipada con dos palas rotatorias de 30,5 cm (12 pulgadas), dos palas fijas y un tamiz de descarga de 0,76 cm (0,30 pulgadas). El hueco entre las palas rotatorias y las fijas se ajustó a 0,254 cm (0,10 pulgadas). El resultado de la desmenuzadora parecía confeti (como antes). El material de tipo confeti se alimentó a una cortadora de cuchillas rotativas Munson, modelo SC30. El tamiz de descarga tenía aberturas de 3,175 mm (1/8 pulgadas). El hueco entre las palas rotatorias y las fijas se ajustó a 0,508 cm (0,20 pulgadas). La cortadora de cuchillas rotativas desmenuzó los trozos de tipo confeti por los bordes de las cuchillas. El material resultante de la primera cizalladura se volvió a alimentar a la misma disposición y el tamiz se sustituyó con un tamiz de 1,59 mm (1/16 pulgadas). Este material se desmenuzó. El material resultante de la segunda cizalladura se volvió a alimentar en la misma disposición y el tamiz se sustituyó por un tamiz de 0,079 (1/32 pulgadas). Este material se desmenuzó. El material fibroso resultante tenía una superficie específica BET de 1,6897 m<sup>2</sup>/g +/- 0,0155 m<sup>2</sup>/g, una porosidad de 87,7163 por ciento y una densidad aparente (a 0,037 kg/cm<sup>2</sup> (0,53 psia)) de 0,1448 g/ml. Una longitud media de las fibras era 0,824 mm y una anchura media de las fibras era 0,0262 mm, dando una relación L/D media de 32:1. Se muestra una micrografía electrónica de barrido del material fibroso en la figura 29 con 25 X aumentos.

Ejemplo de referencia 5 - Preparación de material fibroso densificado a partir de cartón Kraft blanqueado sin aglutinante añadido

- 25 Se preparó material fibroso de acuerdo con el ejemplo 2. Se pulverizaron aproximadamente 0,454 kg (1 libra) de agua sobre cada uno de 4,54 kg (10 libras) de material fibroso. El material fibroso se densificó usando un molino de pelet California Pellet Mill 1100 que trabajaba a 75°C. Se obtuvieron pellets que tenían una densidad aparente en el intervalo de aproximadamente 112,13 kg/m<sup>3</sup> (7 lb/pie<sup>3</sup>) a aproximadamente 240,28 kg/m<sup>3</sup> (15 lb/pie<sup>3</sup>).

Ejemplo de referencia 6 - Preparación de material fibroso densificado a partir de cartón Kraft blanqueado con aglutinante

Se preparó material fibroso de acuerdo con el ejemplo 2.

- 30 Se preparó una solución madre al 2 por ciento en peso de POLYOX™ WSRN10 (poli(óxido de etileno)) en agua. Se pulverizó aproximadamente 0,454 kg (1 lb) de solución madre sobre cada uno de 4,54 kg (10 libras) de material fibroso. El material fibroso se densificó usando un molino de pelet California Pellet Mill 1100 que trabajaba a 75°C. Se obtuvieron pellets que tenían una densidad aparente en el intervalo de aproximadamente 240,28 kg/m<sup>3</sup> (15 lb/pie<sup>3</sup>) a aproximadamente 640,72 kg/m<sup>3</sup> (40 lb/pie<sup>3</sup>).

- 35 Ejemplo de referencia 7 - Reducción del peso molecular de la celulosa en papel Kraft fibroso por radiación gamma con oxidación mínima

Se preparó material fibroso de acuerdo con el ejemplo 4. El papel Kraft fibroso se densifica de acuerdo con el ejemplo 5.

- 40 Los pellets densificados se ponen en una ampolla de vidrio que tiene una capacidad máxima de 250 ml. La ampolla de vidrio se vacía con alto vacío (10<sup>-5</sup> torr) durante 30 min, y después se vuelve a llenar con gas argón. La ampolla se cierra herméticamente bajo argón. Los pellets en la ampolla se irradian con radiación gamma durante aproximadamente 3 horas con una dosis por unidad de tiempo de 1 Mrad por hora, para proporcionar un material irradiado en el que la celulosa tiene un peso molecular menor que el material de partida Kraft fibroso.

- 45 Ejemplo de referencia 8 - Reducción del peso molecular de la celulosa en papel Kraft fibroso por radiación gamma con oxidación máxima

Se preparó material fibroso de acuerdo con el ejemplo 4. El papel Kraft fibroso se densifica de acuerdo con el ejemplo 5.

- 50 Los pellets densificados se ponen en una ampolla de vidrio que tiene una capacidad máxima de 250 ml. La ampolla de vidrio se cierra herméticamente bajo atmósfera de aire. Los pellets en la ampolla se irradian con radiación gamma durante aproximadamente 3 horas con una dosis por unidad de tiempo de 1 Mrad por hora, para proporcionar un material irradiado en el que la celulosa tiene un peso molecular menor que el material de partida Kraft fibroso.

Ejemplo de referencia 9 - Procesamiento con haz de electrones

Las muestras se trataron con haz de electrones usando un acelerador de ondas continuas Rhodotron® TT200 en

cámara aislada que suministra electrones a 5 MeV a 80 kW de potencia de salida. La tabla 1 describe los parámetros usados. La tabla 2 describe la dosis nominal usada para el ID de muestra (en Mrad) y la correspondiente dosis suministrada a la muestra (en kgy).

Tabla 1. Parámetros del Rhodotron® TT200

Haz	
Haz producido:	Electrones acelerados
Energía del haz:	Nominal (fija): 10 MeV (+0 keV-250 keV)
Dispersión de energía a 10 MeV:	Anchura de banda a media altura (FWHM) 300 keV
Potencia del haz a 10 MeV:	Intervalo de operación garantizado de 1 a 80 kW
Consumo de energía	
Estado en espera (vacío y enfriamiento encendidos):	<15 kW
A 50 kW de potencia del haz:	<210 kW
A 80 kW de potencia del haz:	<260 kW
Sistema RF	
Frecuencia:	107,5 ±1 MHz
Tipo de tétrodo:	Thomson TH781
Sonotrodo de barrido	
Longitud de barrido nominal (medida a 25-35 cm desde la ventana):	120 cm
Intervalo de barrido:	de 30% a 100% de la longitud de barrido nominal
Frecuencia de barrido nominal (a la longitud de barrido máx.):	100 Hz ±5%
Uniformidad de barrido (a lo largo de 90% de la longitud de barrido nominal)	±5%

5

Tabla 2. Dosis suministradas a las muestras

Dosis total (Mrad) (Número asociado con el ID de muestra)	Dosis suministrada (kgy) <sup>1</sup>
1	9,9
3	29,0
5	50,4
7	69,2
10	100,0
15	150,3
20	198,3
30	330,9
50	529,0
70	695,9
100	993,6

<sup>1</sup>Por ejemplo, se suministraron 9,9 kgy en 11 segundos con una corriente de haz de 5 mA y una velocidad lineal de 3,93 m/min (12,9 pies/min). El tiempo de enfriamiento entre tratamientos era aproximadamente 2 minutos.

10 Ejemplo de referencia 10 - Métodos de determinación del peso molecular de materiales celulósicos y lignocelulósicos por cromatografía de gel permeable

Los materiales celulósicos y lignocelulósicos para analizar se trataron de acuerdo con el ejemplo 4. Los materiales

de muestra presentados en las siguientes tablas incluyen papel Kraft (P), paja de trigo (WS), alfalfa (A), celulosa (C), mijo (SG), hierbas (G) y almidón (ST) y sacarosa (S). El número "132" del ID de muestra se refiere al tamaño de partículas del material después de cizalladura a través de un tamiz de 0,79 mm (1/32 pulgadas). El número después del guion se refiere a la dosis de radiación (MRad) y "US" se refiere al tratamiento con ultrasonidos. Por ejemplo, un ID de muestra "P132-10" se refiere a papel Kraft que se ha cizallado a un tamo de partículas de malla n° 132 y se ha irradiado con 10 Mrad.

5

Para las muestras que se irradiaron con haz de electrones, el número después del guion se refiere a la cantidad de energía suministrada a la muestra. Por ejemplo, una muestra con ID "P-100e" se refiere a papel Kraft al que se ha suministrado una dosis de energía de aproximadamente 100 MRad o aproximadamente 1000 kgy (tabla 2).

10 Tabla 3. Peso molecular medio máximo del papel Kraft irradiado

Fuente de la muestra	ID de la muestra	Dosis <sup>1</sup> (Mrad)	Ultrasonidos <sup>2</sup>	PM medio ± Desv. estándar
Papel Kraft	P132	0	No	32853 ± 10006
	P132-10	10	"	61398 ± 2468**
	P132-100	100	"	8444 ± 580
	P132-181	181	"	6668 ± 77
	P132-US	0	Si	3095 ± 1013

\*\*La dosis baja de radiación parece que aumenta el peso molecular de algunos materiales

<sup>1</sup>Dosis por unidad de tiempo = 1 Mrad/h

<sup>2</sup>Tratamiento durante 30 minutos con ultrasonidos a 20 kHz usando un sonotrodo de 1000 W en condiciones de recirculación con el material disperso en agua.

15 Tabla 4. Peso molecular medio máximo del papel Kraft irradiado con haz de electrones

Fuente de la muestra	ID de la muestra	Dosis <sup>1</sup> (Mrad)	PM medio ± Desv. estándar
Papel Kraft	P-1e	1	63489 ± 595
	P-5e	5	56587 ± 536
	P-10e	10	53610 ± 327
	P-30e	30	38231 ± 124
	P-70e	70	12011 ± 158
	P-100e	100	9770 ± 2

Tabla 5. Peso molecular medio máximo de materiales tratados con radiación gamma

ID de la muestra	Pico n°	Dosis <sup>1</sup> (Mrad)	Ultrasonidos <sup>2</sup>	PM medio ± Desv. estándar
WS132	1	0	No	1407411 ± 175191
	2	"	"	39145 ± 3425
	3	"	"	2886 ± 177
WS132-10*	1	10	"	26040 ± 3240
WS132-100*	1	100	"	23620 ± 453
A132	1	0	"	1604886 ± 151701
	2	"	"	37525 ± 3751
	3	"	"	2853 ± 490
A132-10*	1	10	"	50853 ± 1665
	2	"	"	2461 ± 17
A132-100*	1	100	"	38291 ± 2235
	2	"	"	2487 ± 15

SG132	1	0	"	1557360 ± 83693
	2	"	"	42594 ± 4414
	3	"	"	3268 ± 249
SG132-10*	1	10	"	60888 ± 9131
SG132-100*	1	100	"	22345 ± 3797
SG132-10-US	1	10	Si	86086 ± 43518
	2	"	"	2247 ± 468
SG132-100-US	1	100	"	4696 ± 1465

\*Los máximos coalescen después de tratamiento

\*\*La dosis baja de radiación parece que aumenta el peso molecular de algunos materiales

<sup>1</sup>Dosis por unidad de tiempo = 1 Mrad/h

<sup>2</sup>Tratamiento durante 30 minutos con ultrasonidos a 20 kHz usando un sonotrodo de 1000 W en condiciones de recirculación con el material disperso en agua.

5

Tabla 6. Peso molecular medio máximo de material irradiado con haz de electrones

ID de la muestra	Pico nº	Dosis	PM medio ± Desv. estándar
	1		1004783 ± 97518
A-1e	2	1	34499 ± 482
	3		2235 ± 1
A-5e	1	5	38245 ± 346
	2		2286 ± 35
A-10e	1	10	44326 ± 33
	2		2333 ± 18
A-30e	1	30	47366 ± 583
	2		2377 ± 7
A-50e	1	50	32761 ± 168
	2		2435 ± 6
	1		447362 ± 38817
G-1e	2	1	32165 ± 779
	3		3004 ± 25
G-5e	1	5	62167 ± 6418
	2		2444 ± 33
G-10e	1	10	72636 ± 4075
	2		3065 ± 34
G-30e	1	30	17159 ± 390
G-50e	1	50	18960 ± 142
ST	1	0	923336 ± 1883
	2		150265 ± 4033
ST-1e	1	1	846081 ± 5180
	2		131222 ± 1687
ST-5e	1	5	90664 ± 1370
ST-10e	1	10	98050 ± 255

ST-30e	1	30	41884 ± 223
ST-70e	1	70	9699 ± 31
ST-100e	1	100	8705 ± 38

La cromatografía de permeabilidad en gel (GPC) se usa para determinar la distribución de pesos moleculares de polímeros. Durante el análisis de GPC, una solución de la muestra de polímero se pasa por una columna empaquetada con un gel poroso que atrapa moléculas pequeñas. La muestra se separa basándose en el tamaño molecular, eluyendo las moléculas más grandes más pronto que las moléculas más pequeñas. El tiempo de retención de cada componente se detecta lo más a menudo por el índice de refracción (RI), dispersión de luz evaporativa (ELS) o ultravioleta, y se compara con una curva de calibración. Después, los datos resultantes se usan para calcular la distribución de pesos moleculares para la muestra.

Se usa más bien la distribución de pesos moleculares que un peso molecular único, para caracterizar polímeros sintéticos. Para caracterizar esta distribución, se usan medias estadísticas. La más común de estas medias son el "peso molecular medio numérico" ( $M_n$ ) y el "peso molecular medio ponderado" ( $M_w$ ).

El  $M_n$  es similar a la media aritmética estándar asociada con un grupo de números. Cuando se aplica a polímeros,  $M_n$  se refiere al peso molecular medio de las moléculas en el polímero.  $M_n$  se calcula dando la misma cantidad de importancia a cada molécula independientemente de su peso molecular individual. El  $M_n$  medio se calcula por la siguiente fórmula donde  $N_i$  es el número de moléculas con una masa molar igual a  $M_i$ .

$$\bar{M}_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i}$$

$M_w$  es otro descriptor de la distribución de pesos moleculares que pone mayor énfasis en moléculas más grandes que en moléculas más pequeñas en la distribución. La siguiente fórmula muestra el cálculo estadístico del peso molecular medio ponderado.

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i}$$

El índice de polidispersidad o PI se define como la relación de  $M_w/M_n$ . Cuanto mayor es el PI, más ancha o más dispersa es la distribución. El menor valor de un PI puede ser 1. Este representa una muestra monodispersa, es decir, un polímero con todas las moléculas en la distribución que son del mismo peso molecular.

El valor del peso molecular en el pico ( $M_p$ ) es otro descriptor definido como el modo de la distribución de pesos moleculares. Significa el peso molecular que es el más abundante en la distribución. Este valor también da comprensión de la distribución de pesos moleculares.

La mayoría de las mediciones de GPC se hacen con respecto a diferentes patrones de polímeros. La precisión de los resultados depende de cómo de cerca se corresponden las características del polímero que se analiza con la de los patrones estándar. El error esperado en reproducibilidad entre diferentes series de determinaciones, calibradas por separado, es aproximadamente 5-10% y es característico de la precisión limitada de las determinaciones por GPC. Por lo tanto, los resultados de GPC son más útiles cuando se hace una comparación entre las distribuciones de pesos moleculares de diferentes muestras durante la misma serie de determinaciones.

Las muestras lignocelulósicas requieren preparación de la muestra antes del análisis por GPC. Primero, se preparó una solución saturada (8,4% en peso) de cloruro de litio (LiCl) en dimetilacetamida (DMAc). Se añadieron aproximadamente 100 mg de la muestra a aproximadamente 10 g de solución de LiCl/DMAc saturada recién preparada, y la muestra se calentó a aproximadamente 150°C-170°C con agitación durante 1 hora. Las soluciones resultantes en general eran de color amarillo de claro a oscuro. La temperatura de las soluciones se disminuyó a

aproximadamente 100°C y se calentó durante 2 horas adicionales. Las temperaturas de las soluciones después se disminuyeron a aproximadamente 50°C y la solución de muestra se calentó durante aproximadamente 48 a 60 horas. Hay que indicar que las muestras irradiadas a 100 MRad eran solubilizadas más fácilmente comparadas con sus homólogas no tratadas. Adicionalmente, las muestras cizalladas (indicadas por el número 132) tenían pesos moleculares medios ligeramente inferiores comparadas con las muestras no cortadas.

Las soluciones de muestra resultante se diluyeron 1:1 usando DMAc como disolvente y se filtraron a través de un filtro de PTFE de 0,45 µm. Las soluciones de muestras filtradas después se analizaron por GPC usando los parámetros descritos en la tabla 7. Los pesos moleculares medios de los picos (Mp) de las muestras, determinados por cromatografía en gel permeable (GPC) se resumen en las tablas 3-6. Cada muestra se preparó por duplicado y cada preparación de la muestra se analizó por duplicado (dos inyecciones) para un total de 4 inyecciones por muestra. Los patrones de poliestireno EasiCal® PS1A y PS1B se usaron para generar una curva de calibración de escala de peso molecular de aproximadamente 580 a 7.500.00 Daltons.

Tabla 7. Condiciones de análisis de GPC

Instrumento:	Waters Alliance GPC 2000
Columnas (3)	Plgel 10 µm Mixed-B S/N's: 10M-MB-148-83; 10M-MB-148-84; 10M-MB-174-129 LiCl al 0,5% en DMAc (1,0 ml/min)
Fase móvil (disolvente):	70°C
Temperatura de la columna/detector:	70°C
Temperatura del inyector:	323,5 µl
Tamaño del bucle de muestra:	

15 Ejemplo de referencia 11 - Análisis de superficie por espectrometría de masas de iones secundarios en tiempo de vuelo (ToF-SIMS)

La espectroscopía de masas de iones secundarios en tiempo de vuelo (ToF-SIMS) es una espectroscopía sensible a la superficie que usa un haz de iones pulsado (Cs o Ga microcentrado) para eliminar moléculas de la superficie muy externa de la muestra. Las partículas se eliminan de monocapas atómicas en la superficie (iones secundarios). Después, estas partículas se aceleran en un "tubo de vuelo" y se determina su masa midiendo el tiempo exacto al que llegan al detector (es decir, el tiempo de vuelo). ToF-SIMS proporciona información elemental y molecular detallada sobre la superficie, capas finas, interfases de la muestra, y da un análisis tridimensional completo. El uso está extendido, incluyendo semiconductores, polímeros, pinturas, recubrimientos, vidrio, papel, metales, materiales cerámicos, biomateriales y tejido orgánico. Puesto que ToF-SIMS es una técnica de exploración, se detectan todos los elementos de la tabla periódica, incluyendo H. Los datos de ToF-SIMS se presentan en las tablas 8-11. Los parámetros usados se dan en la tabla 12.

Tabla 8. Intensidades medias normalizadas de diferentes iones positivos de interés (normalizado con respecto a los recuentos totales de iones x 10000)

m/z	especies	P132		P132-10		P132-100	
		Media	σ	Media	σ	Media	σ
23	Na	257	28	276	54	193	36
27	Al	647	43	821	399	297	44
28	Si	76	45,9	197	89	81,7	10,7
15	CH <sub>3</sub>	77,9	7,8	161	26	133	12
27	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub>	448	28	720	65	718	82
39	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	333	10	463	37	474	26
41	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	703	19	820	127	900	63
43	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	657	11	757	162	924	118
115	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub>	73	13,4	40,3	4,5	42,5	15,7
128	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	55,5	11,6	26,8	4,8	27,7	6,9



ES 2 565 777 T3

73	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> Si*	181	77	65,1	18,4	81,7	7,5
147	C <sub>5</sub> H <sub>15</sub> OSi <sub>2</sub> *	72,2	33,1	24,9	10,9	38,5	4
207	C <sub>5</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> Si <sub>3</sub> *	17,2	7,8	6,26	3,05	7,49	1,77
647	C <sub>42</sub> H <sub>64</sub> PO <sub>3</sub>	3,63	1,05	1,43	1,41	10,7	7,2

Tabla 9. Intensidades medias normalizadas de diferentes iones negativos de interés (normalizado con respecto a los recuentos totales de iones x 10000)

m/z	especies	P132		P132-10		P132-100	
		Media	$\sigma$	Media	$\sigma$	Media	$\sigma$
19	F	15,3	2,1	42,4	37,8	19,2	1,9
35	Cl	63,8	2,8	107	33	74,1	5,5
13	CH	1900	91	1970	26	1500	6
25	C <sub>2</sub> H	247	127	220	99	540	7
26	CN	18,1	2,1	48,6	30,8	43,9	1,4
42	CNO	1,16	0,71	0,743	0,711	10,8	0,9
46	NO <sub>2</sub>	1,87	0,38	1,66	1,65	12,8	1,8

5 Tabla 10. Intensidades medias normalizadas de diferentes iones positivos de interés (normalizado con respecto a los recuentos totales de iones x 10000)

m/z	especies	P-1e		P-5e		P-10e		P-30e		P-70e		P-100e	
		Media	$\sigma$	Media	$\sigma$	Media	$\sigma$	Media	$\sigma$	Media	$\sigma$	Media	$\sigma$
23	Na	232	56	370	37	241	44	518	57	350	27	542	104
27	Al	549	194	677	86	752	371	761	158	516	159	622	166
28	Si	87,3	11,3	134	24	159	100	158	32	93,7	17,1	124	11
15	CH <sub>3</sub>	114	23	92,9	3,9	128	18	110	16	147	16	141	5
27	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub>	501	205	551	59	645	165	597	152	707	94	600	55
39	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	375	80	288	8	379	82	321	57	435	61	417	32
41	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	716	123	610	24	727	182	607	93	799	112	707	84
43	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	717	121	628	52	653	172	660	89	861	113	743	73
115	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub>	49,9	14,6	43,8	2,6	42,2	7,9	41,4	10,1	27,7	8	32,4	10,5
128	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	38,8	13,1	39,2	1,9	35,2	11,8	31,9	7,8	21,2	6,1	24,2	6,8
73	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> Si*	92,5	3,0	80,6	2,9	72,3	7,7	75,3	11,4	63	3,4	55,8	2,1
147	C <sub>5</sub> H <sub>15</sub> OSi <sub>2</sub> *	27,2	3,9	17,3	1,2	20,4	4,3	16,1	1,9	21,7	3,1	16,3	1,7
207	C <sub>5</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> Si <sub>3</sub> *	6,05	0,74	3,71	0,18	4,51	0,55	3,54	0,37	5,31	0,59	4,08	0,28
647	C <sub>42</sub> H <sub>64</sub> PO <sub>3</sub>	1,61	1,65	1,09	1,30	0,325	0,307	nd	~	0,868	1,31	0,306	0,334

Tabla 11. Intensidades medias normalizadas de diferentes iones negativos de interés (normalizado con respecto a los recuentos totales de iones x 10000)

m/z	especies	P-1e		P-5e		P-10e		P-30e		P-70e		P-100e	
		Media	$\sigma$	Media	$\sigma$	Media	$\sigma$	Media	$\sigma$	Media	$\sigma$	Media	$\sigma$
13	CH	1950	72	1700	65	1870	91	1880	35	2000	46	2120	102
25	C <sub>2</sub> H	154	47	98,8	36,3	157	4	230	17	239	22	224	19
19	F	25,4	1	24,3	1,4	74,3	18,6	40,6	14,9	25,6	1,9	21,5	2
35	Cl	39,2	13,5	38,7	3,5	46,7	5,4	67,6	6,2	45,1	2,9	32,9	10,2
26	CN	71,9	18,9	6,23	2,61	28,1	10,1	34,2	29,2	57,3	28,9	112	60
42	CNO	0,572	0,183	0,313	0,077	0,62	0,199	1,29	0,2	1,37	0,55	1,38	0,28
46	NO <sub>2</sub>	0,331	0,057	0,596	0,255	0,668	0,149	1,44	0,19	1,92	0,29	0,549	0,1

Tabla 12. Parámetros de ToF-SIMS

Condiciones del instrumento	
Instrumento:	PHI TRIFT II
Fuente de iones primarios:	<sup>69</sup> Ga
Potencial de haz de iones primarios:	12 kV iones + 18 kV iones -
Corriente de iones primarios (DC):	2 na para muestras P#E 600 pA para muestras P132
Filtro de energía /CD:	Out/Out
Masas blanco:	Ninguno
Compensación de carga:	On

5

ToF-SIMS usa un haz de partículas pulsadas, enfocadas (típicamente Cs o Ga) para desalojar especies químicas sobre la superficie de materiales. Las partículas producidas más cerca del sitio de impacto tienden a ser iones disociados (positivos o negativos). Las partículas secundarias generadas más lejos del sitio de impacto tienden a ser compuestos moleculares, típicamente fragmentos de macromoléculas orgánicas mucho mayores. Después, las partículas son aceleradas en una ruta de vuelo en su camino hacia un detector. Debido a que se puede medir el "tiempo de vuelo" de las partículas desde el momento del impacto al detector en una escala de nanosegundos, se puede producir una resolución de masa tan fina como 0,00X unidades de masa atómica (es decir, una parte en mil en la masa de un protón). En condiciones de operación típicas, los resultados del análisis de ToF-SIMS incluyen: un espectro de masas que explora todas las masas atómicas a lo largo de un intervalo de 0-10.000 uma, los rastros de los haces producen mapas de cualquier masa de interés en una escala de submicrómetros, y se producen perfiles de profundidad por eliminación de las capas de superficie por pulverización catódica bajo el haz de iones. El análisis de iones negativos mostraba que el polímero tenía cantidades crecientes de grupos CNO, CN y NO<sub>2</sub>.

10

15

Ejemplo de referencia 12. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)/espectroscopía electrónica para análisis químico (ESCA)

20

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) (a veces llamada "ESCA") mide la composición química de los 5 nanómetros superiores de la superficie; la XPS usa energía de fotoionización y análisis por energía dispersiva de los fotoelectrones emitidos, para estudiar la composición y el estado electrónico de la región de la superficie de una muestra. La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X se basa en un solo fotón entra/electrón sale. Los rayos X blandos estimulan la eyección de fotoelectrones cuya energía cinética se mide mediante un analizador de energía electrónica electrostática. Se producen pequeños cambios en la energía por estados de valencia químicamente cambiados de los átomos de los cuales son eyectados los electrones; por lo tanto, la medición proporciona información química sobre la superficie de la muestra.

25

Tabla 13. Concentraciones atómicas (en %) <sup>a,b</sup>

ID de la muestra	Átomo			
	C	O	Al	Si
P132 (Área 1)	57,3	39,8	1,5	1,5
P132 (Área 2)	57,1	39,8	1,6	1,5
P132-10 (Área 1)	63,2	33,5	1,7	1,6
P132-10 (Área 2)	65,6	31,1	1,7	1,7
P132-100 (Área 1)	61,2	36,7	0,9	1,2
P132-100 (Área 2)	61	36,9	0,8	1,3

<sup>a</sup>Normalizado a 100% de los elementos detectados. Los XPS no detectan H o He.

Tabla 14. Estado químico del carbono (en % de C)

ID de la muestra	C-C, C-H	C-O	C=O	O-C=O
	P132 (Área 1)	22	49	21
P132 (Área 2)	25	49	20	6
P132-10 (Área 1)	34	42	15	9
P132-10 (Área 2)	43	38	14	5
P132-100 (Área 1)	27	45	15	9
P132-100 (Área 2)	25	44	23	9

5 Tabla 15. Concentraciones atómicas (en %) <sup>a,b</sup>

ID de la muestra	Átomo				
	C	O	Al	Si	Na
P-1e(Área 1)	59,8	37,9	1,4	0,9	~
P-1e(Área2)	58,5	38,7	1,5	1,3	~
P-5e (Área 1)	58,1	39,7	1,4	0,8	~
P-5e (Área 2)	58,0	39,7	1,5	0,8	~
P-10e (Área 1)	61,6	36,7	1,1	0,7	~
P-10e (Área 2)	58,8	38,6	1,5	1,1	~
P-50e (Área 1)	59,9	37,9	1,4	0,8	<0,1
P-50e (Área 2)	59,4	38,3	1,4	0,9	<0,1
P-70e(Área1)	61,3	36,9	1,2	0,6	<0,1
P-70e (Área 2)	61,2	36,8	1,4	0,7	<0,1
P-100e (Área 1)	61,1	37,0	1,2	0,7	<0,1
P-100e (Área 2)	60,5	37,2	1,4	0,9	<0,1

<sup>a</sup>Normalizado a 100% de los elementos detectados. Los XPS no detectan H o He.

<sup>b</sup>Un símbolo de menor que "<" indica que la cuantificación precisa no se puede hacer debido a la intensidad de la señal débil.

Tabla 16. Tabla del estado químico del carbono (en % de C)

	C-C, C-H	C-O	C=O	O-C=O
ID de la muestra				
P-1e (Área 1)	29	46	20	5
P-1e (Área 2)	27	49	19	5
P-5e (Área 1)	25	53	18	5
P-5e (Área 2)	28	52	17	4
P-10e (Área 1)	33	47	16	5
P-10e (Área 2)	28	51	16	5
P-50e (Área 1)	29	45	20	6
P-50e (Área 2)	28	50	16	5
P-70e (Área 1)	32	45	16	6
P-70e (Área 2)	35	43	16	6
P-100e (Área 1)	32	42	19	7
P-100e (Área 2)	30	47	16	7

Tabla 17. Parámetros analíticos

Instrumento:	PHI Quantum 2000
Fuente de rayos X:	Al <sub>K<math>\alpha</math></sub> monocromado 1486,6 eV
Ángulo de admisión:	±23°
Ángulo de salida:	45°
Área de análisis:	1400 x 300 $\mu$ m
Corrección de carga:	C1s 284,8 eV

- 5 Los espectros de XPS se obtienen por irradiación de un material con un haz de rayos X de aluminio o magnesio mientras se mide simultáneamente la energía cinética (KE) y el número de electrones que escapan de la parte superior de 1 a 10 nm del material que se está analizando (véase los parámetros analíticos, tabla 17). La técnica de XPS es muy específica de superficie debido al corto rango de fotoelectrones que son excitados del sólido. La energía de los fotoelectrones que salen de la muestra se determina usando un analizador hemisférico concéntrico (CHA) y esto da un espectro con una serie de picos de fotoelectrones. La energía de unión de los picos es característica de cada elemento. Las áreas de los picos se pueden usar (con factores de sensibilidad adecuados) para determinar la composición de la superficie de los materiales. La forma de cada pico y la energía de unión pueden ser alteradas ligeramente por el estado químico del átomo que emite. Por lo tanto, los XPS pueden proporcionar información de enlaces químicos también. XPS no es sensible a hidrógeno o helio, pero puede detectar todos los demás elementos. XPS requiere condiciones de ultravacío (UHV) y se usa habitualmente para el análisis de superficie de polímeros, recubrimientos, catalizadores, fibras, materiales cerámicos, productos farmacéuticos/materiales médicos, y materiales de origen biológico. Los datos de XPS se describen en las tablas 13-16.

## Ejemplo de referencia 13. Análisis Raman

- 20 Los espectros de Raman se adquirieron de la superficie de fibras de las muestras: P132, P132-100, P-1e y P100e. Las mediciones se realizaron usando un espectrómetro "LabRam" J-Y. Se usaron para las mediciones un láser HeNe (longitud de onda 632,8 nm) y rejilla de 600 gr/mm. Las mediciones se realizaron de forma confocal usando geometría de retrodispersión (180°) bajo un microscopio Olympus BX40. Las muestras tenían un espectro Raman típico de celulosa.
- 25 Ejemplo de referencia 14. Análisis de superficie por microscopía de sonda de barrido (SPM) usando un microscopio de fuerza atómica (AFM)

El propósito de este análisis era obtener imágenes de microscopio de fuerza atómica (AFM) de las muestras en las

tablas 18 y 19, para medir la rugosidad.

5 La microscopía de sonda de barrido (SPM) es una rama de la microscopía que forma imágenes de las superficies usando una sonda física que barre la muestra. Se obtiene una imagen de la superficie moviendo mecánicamente la sonda en una trama de barrido de la muestra, línea por línea, y registrando la interacción de sonda-superficie en función de la posición. El microscopio de fuerza atómica (AFM) o microscopio de fuerza de barrido (SFM) es un tipo de microscopio de sonda de barrido de resolución muy alta, con resolución demostrada de fracciones de un nanómetro, más de 1000 veces mejor que el límite de difracción óptica. La sonda (o la muestra bajo una sonda estacionaria) en general se mueve mediante un tubo piezoeléctrico. Dichos escáneres se diseñan para ser movidos con precisión en cualquiera de los tres ejes perpendiculares (x,y,z). Siguiendo el patrón de la trama, los datos del detector forman una imagen de la interacción de sonda-superficie. Se usa la retroalimentación desde el detector para mantener la sonda a una fuerza o distancia constante desde la superficie del objeto. Para la microscopía de fuerza atómica, el detector es un fotodetector sensible a la posición que registra el ángulo de reflexión desde un haz láser centrado en la parte superior del cantilever.

Tabla 18. Resultados de rugosidad para las muestras tratadas con radiación gamma

ID de la muestra	RMS (Å)	R <sub>a</sub> (Å)	R <sub>máx</sub> (Å)
P132	927,2	716,3	8347,6
P132-10	825,7	576,8	11500
P132-100	1008	813,5	7250,7

15

Tabla 19. Resultados de rugosidad para las muestras tratadas con haz de electrones

ID de la muestra	RMS (Å)	R <sub>a</sub> (Å)	R <sub>máx</sub> (Å)
P-1e	1441,2	1147,1	8955,4
P-5e	917,3	727,5	6753,4
P-10e	805,6	612,1	7906,5
P-30e	919,2	733,7	6900
P-70e	505,8	388,1	5974,2
P-100e	458,2	367,9	3196,9

20 Las imágenes de AFM se recogieron usando un NanoScope III Dimension 5000 (Digital Instruments, Santa Barbara, California, EE.UU.). El instrumento se calibró frente a patrón trazable de NIST con una precisión mejor de 2%. Se usaron puntas de silicio con nanosondas. Se usaron procedimientos de procesamiento de imágenes que implicaban autoaplanado, ajuste de plano o convolución.

25 Se generó una imagen de un área de 5 µm x 5 µm en un sitio aleatorio en la parte superior de una sola fibra. Se incluyen vistas en perspectiva (3-D) de estas superficies con exageraciones verticales indicadas en las gráficas (figuras 29A-29F). Se llevaron a cabo los análisis de rugosidad y se expresan en: (1) Rugosidad media cuadrática, RMS; (2) Rugosidad media, R<sub>a</sub>; y (3) Altura máxima (Pico a valle), R<sub>máx</sub>. Los resultados se resumen en las tablas 18 y 19.

Ejemplo de referencia 15 - Determinación de la cristalinidad de materiales irradiados por difracción de rayos X

30 La difracción de rayos X (XRD) es un método por el cual se irradia una muestra cristalina con rayos X monoenergéticos. La interacción de la estructura cristalina de la muestra con estos rayos X se registra y proporciona información sobre la estructura cristalina que se está irradiando. La "huella dactilar" característica resultante permite la identificación de los compuestos cristalinos presentes en la muestra. Usando un análisis de ajuste de patrón completo (el refinamiento de Rietvelt), se pueden llevar a cabo análisis cuantitativos en muestras que contienen más de un compuesto cristalino.

Tabla 20. Datos de XRD que incluyen el tamaño de dominio y % de cristalinidad

ID de la muestra	Tamaño del dominio (Å)	% de cristalinidad
P132	55	55
P132-10	46	58
P132-100	50	55
P132-181	48	52
P132-US	26	40
A132	28	42
A132-10	26	40
A132-100	28	35
WS132	30	36
WS132-10	27	37
WS132-100	30	41
SG132	29	40
SG132-10	28	38
SG132-100	28	37
SG132-10-US	25	42
SG132-100-US	21	34

5 Cada muestra se puso en un soporte de base cero y se puso en un difractor Phillips PW1800 usando radiación de Cu. Después se realizaron barridos a lo largo del intervalo de 5° a 50° con un tamaño de paso de 0,05°, y un tiempo de recuento de 2 horas cada uno.

Una vez obtenidos los patrones de difracción, las fases se identificaron con ayuda del Fichero de difracción de polvo publicado por el Centro Internacional para los Datos de Difracción. En todas las muestras, la fase cristalina identificada era celulosa -Ia, que tiene una estructura triclinica.

10 La característica distintiva entre las 20 muestras es la anchura de pico, que está relacionada con el tamaño del dominio cristalino. La anchura del pico experimental se usó para computar el tamaño del dominio y el porcentaje de cristalinidad, que se describen en la tabla 4.

El porcentaje de cristalinidad ( $X_c\%$ ) se mide como una relación del área cristalina al área total bajo los picos de difracción de rayos X,

$$X_c \% = \frac{A_c}{\{A_a + A_c\}} \times 100\%$$

15 donde,

$A_c$  = Área de la fase cristalina

$A_a$  = Área de la fase amorfa

$X_c$  = Porcentaje de cristalinidad

20 Para determinar el porcentaje de cristalinidad para cada muestra era necesario extraer primero la cantidad de la fase amorfa. Esto se hace calculando el área de cada patrón de difracción que se puede atribuir a la fase cristalina (representado por los picos más agudos) y la fase no cristalina (representado por los hombros anchos debajo del patrón y centrados a 22° y 38°).

25 Se usó un procedimiento sistemático para minimizar el error en estos cálculos debido a los picos cristalinos anchos así como a la intensidad base alta. Primero, se aplicó una base lineal y después se eliminó. Segundo, dos picos Gaussianos centrados a 22° y 38° con anchuras de 10-12° se ajustó cada uno a los hombros debajo de los picos cristalinos. Tercero, se determinaron el área bajo los dos picos Gaussianos anchos y el resto del patrón. Finalmente,

se calculó el porcentaje de cristalinidad dividiendo el área bajo el pico cristalino entre la intensidad total (después de restar la base). El tamaño del dominio y el % de cristalinidad de las muestras determinados por difracción de rayos X (XRD) se presentan en la tabla 20.

Ejemplo de referencia 16 - Análisis de porosimetría de materiales irradiados

- 5 El análisis de tamaño de poros y volumen de poros con mercurio (tabla 21) se basa en forzar mercurio (un líquido no humectante) en una estructura porosa bajo presiones estrechamente controladas. Puesto que el mercurio no moja la mayoría de las sustancias y no penetrará los poros espontáneamente por acción capilar, debe ser forzado en los huecos de la muestra aplicando presión externa. La presión requerida para llenar los huecos es inversamente proporcional al tamaño de los poros. Solo se requiere una cantidad pequeña de fuerza o presión para llenar huecos grandes, mientras que se requiere más presión para llenar huecos de poros muy pequeños.
- 10

Tabla 21. Distribución del tamaño y volumen de poros por porosimetría de mercurio

ID muestra	Volumen de intrusión total (ml/g)	Area de poros total (m <sup>2</sup> /g)	Mediana del diámetro poros (volumen) (µm)	Mediana del diámetro poros (Área) (µm)	Diámetro medio de poros (4V/A) (µm)	Densidad volúmica aparente (esqueleto) 0,035 kg/cm <sup>2</sup> (0,50 psia) (g/ml)	Densidad aparente (g/ml)	Porosidad (%)
P132	6,0594	1,228	36,2250	13,7278	19,7415	0,1448	1,1785	87,7163
PI 32-10	5,5436	1,211	46,3463	4,5646	18,3106	0,1614	1,5355	89,4875
P132-100	5,3985	0,998	34,5235	18,2005	21,6422	0,1612	1,2413	87,0151
P132-181	3,2866	0,868	25,3448	12,2410	15,1509	0,2497	1,3916	82,0577
P132-US	6,0005	14,787	98,3459	0,0055	1,6231	0,1404	0,8894	84,2199
A132	2,0037	11,759	64,6308	0,0113	0,6816	0,3683	1,4058	73,7990
A132-10	1,9514	10,326	53,2706	0,0105	0,7560	0,3768	1,4231	73,5241
A132-100	1,9394	10,205	43,8966	0,0118	0,7602	0,3760	1,3889	72,9264
SG132	2,5267	8,265	57,6958	0,0141	1,2229	0,3119	1,4708	78,7961
SG132-10	2,1414	8,643	26,4666	0,0103	0,9910	0,3457	1,3315	74,0340
SG132-100	2,5142	10,766	32,7118	0,0098	0,9342	0,3077	1,3590	77,3593
SG132-10-US	4,4043	1,722	71,5734	1,1016	10,2319	0,1930	1,2883	85,0169
SG132-100-US	4,9665	7,358	24,8462	0,0089	2,6998	0,1695	1,0731	84,2010
WS132	2,9920	5,447	76,3675	0,0516	2,1971	0,2773	1,6279	82,9664
WS132-10	3,1138	2,901	57,4727	0,3630	4,2940	0,2763	1,9808	86,0484
WS132-100	3,2077	3,114	52,3284	0,2876	4,1199	0,2599	1,5611	83,3538
A-1e	1,9535	3,698	25,3411	0,0810	2,1130	0,3896	1,6299	76,0992
A-5e	1,9697	6,503	29,5954	0,0336	1,2117	0,3748	1,4317	73,8225
A-10e	2,0897	12,030	45,5493	0,0101	0,6948	0,3587	1,4321	74,9545
A-50e	2,1141	7,291	37,0760	0,0304	1,1599	0,3577	1,4677	75,6264
G-1e	2,4382	7,582	58,5521	0,0201	1,2863	0,3144	1,3472	76,6610
G-5e	2,4268	6,436	44,4848	0,0225	1,5082	0,3172	1,3782	76,9831
G-10e	2,6708	6,865	62,8605	0,0404	1,5562	0,2960	1,4140	79,0638
G-50e	2,8197	6,798	56,5048	0,0315	1,6591	0,2794	1,3179	78,7959
P-1e	7,7692	1,052	49,8844	22,9315	29,5348	0,1188	1,5443	92,3065
P-5e	7,1261	1,212	46,6400	12,3252	23,5166	0,1268	1,3160	90,3644
P-10e	6,6096	1,113	41,4252	17,4375	23,7513	0,1374	1,4906	90,7850
P-50e	6,5911	1,156	40,7837	15,9823	22,7974	0,1362	1,3302	89,7616
P-100e	5,3507	1,195	35,3622	10,7400	17,9063	0,1648	1,3948	88,1840
S	0,4362	0,030	102,8411	42,5047	57,8208	0,9334	1,5745	40,7160
S-1e	0,3900	0,632	90,6808	0,0041	2,4680	0,9772	1,5790	38,1140
S-5e	0,3914	0,337	97,1991	0,0070	4,6406	0,9858	1,6052	38,5847
S-10e	0,4179	0,349	113,4360	0,0042	4,7873	0,9469	1,5669	39,5678
S-30e	0,4616	5,329	102,0559	0,0042	0,3464	0,9065	1,5585	41,8388
S-50e	0,5217	7,162	137,2124	0,0051	0,2914	0,8521	1,5342	44,4582
S-100e	0,8817	15,217	76,4577	0,0053	0,2318	0,6478	1,5105	57,1131
St	0,6593	17,631	4,2402	0,0053	0,1496	0,7,757	1,5877	51,1438
St-1e	0,6720	18,078	4,3360	0,0052	0,1487	0,7651	1,5750	51,4206
St-5e	0,6334	19,495	4,2848	0,0051	0,1300	0,7794	1,5395	49,3706
St-10e	0,6208	16,980	4,3362	0,0056	0,1462	0,7952	1,5703	49,3630
St-30e	0,6892	18,066	4,4152	0,0050	0,1526	0,7475	1,5417	51,5165
St-50e	0,6662	18,338	4,3759	0,0054	0,1453	0,7637	1,5548	50,8778
St-100e	0,6471	23,154	5,4032	0,0048	0,1118	0,7229	1,3582	46,7761

El AutoPore 9520 puede alcanzar una presión máxima de 414 MPa o 60.000 psia. Hay cuatro estaciones de presión

baja para la preparación de muestra y recolección de datos de macroporos de 0,014 kg/cm<sup>2</sup> (0,2 psia) a 3,5 kg/cm<sup>2</sup> (50 psia). Hay dos cámaras de alta presión, que recogen datos de 1,75 kg/cm<sup>2</sup> (25 psia) a 42.000 kg/cm<sup>2</sup> (60.000 psia). La muestra se pone en un aparato de tipo copa llamado un penetrómetro, que está unido a un vástago capilar de vidrio recubierto de metal. Cuando el mercurio invade los huecos en y alrededor de la muestra, se mueve hacia abajo del vástago capilar. La pérdida de mercurio del vástago capilar produce un cambio en la capacitancia eléctrica. El cambio en la capacitancia durante el experimento se convierte en el volumen de mercurio conociendo el volumen del vástago del penetrómetro que se usa. Están disponibles una variedad de penetrómetros con diferentes tamaños de copa (muestra) y capilares para acomodar la mayor parte de los tamaños y configuraciones. La siguiente tabla 22 define algunos de los parámetros clave calculados para cada muestra.

5

10 Tabla 22. Definición de parámetros

Parámetro	Descripción
Volumen de intrusión total:	El volumen total de intrusión de mercurio durante un experimento. Este puede incluir relleno intersticial entre partículas pequeñas, porosidad de la muestra, y volumen de compresión de la muestra.
Área de poros total:	El volumen de intrusión total convertido en un área asumiendo poros de forma cilíndrica
Mediana del diámetro de poro (volumen):	El tamaño del percentil 50 en la gráfica de volumen acumulativo
Mediana del diámetro de poro (área):	El tamaño del percentil 50 en la gráfica de área acumulativa
Diámetro medio de poros:	El volumen de poros total dividido entre el área de poros total (4V/A)
Densidad volúmica aparente:	La masa de la muestra dividida entre el volumen aparente. El volumen aparente se determina a la presión de llenado, típicamente 0,035 kg/cm <sup>2</sup> (0,5 psia)
Densidad aparente:	La masa de la muestra dividida entre el volumen de muestra medido a la presión más alta, típicamente 42.000 kg/cm <sup>2</sup> (60.000 psia)
Porosidad:	(Densidad aparente)

Ejemplo de referencia 17 - Análisis del tamaño de partículas de materiales irradiados

La técnica de medición del tamaño de partículas por dispersión de luz estática se basa en la teoría de Mie (que también abarca la teoría de Fraunhofer). La teoría de Mie predice la relación de la intensidad frente al ángulo como una función del tamaño para partículas de dispersión esféricas con la condición de que se conozcan otras variables del sistema y se mantengan constantes. Estas variables son la longitud de onda de la luz incidente y el índice de refracción relativo del material de muestra. La aplicación de la teoría de Mie proporciona la información detallada del tamaño de partículas. La tabla 23 resume el tamaño de partículas usando la mediana del diámetro, diámetro medio y diámetro modal como parámetro.

15

20 Tabla 23. Tamaño de partículas por dispersión de luz láser (dispersión de muestra seca)

ID de la muestra	Mediana del diámetro (µm)	Diámetro medio (µm)	Diámetro modal (µm)
<b>A132</b>	380,695	418,778	442,258
<b>A132-10</b>	321,742	366,231	410,156
<b>A132-100</b>	301,786	348,633	444,169
<b>SG132</b>	369,400	411,790	455,508
<b>SG132-10</b>	278,793	325,497	426,717
<b>SG132-100</b>	242,757	298,686	390,097
<b>WS132</b>	407,335	445,618	467,978
<b>WS132-10</b>	194,237	226,604	297,941
<b>WS132-100</b>	201,975	236,037	307,304

El tamaño de partículas se determinó por dispersión de luz láser (dispersión de muestra seca) usando un Malvern Mastersizer 2000 usando las siguientes condiciones:



Velocidad de alimentación: 35%  
 Presión del dispersor: 4 bar  
 Modelo óptico: (2,610, 1,000i), 1,000

5 Se introdujo una cantidad de muestra adecuada en una bandeja vibratoria. Se ajustaron la velocidad de alimentación y la presión de aire para asegurar que las partículas eran dispersadas adecuadamente. El componente clave es seleccionar una presión de aire que romperá aglomeraciones, pero no compromete la integridad de la muestra. La cantidad de muestra necesaria varía dependiendo del tamaño de las partículas. En general, las muestras con partículas finas requieren menor material que las muestras con partículas gruesas.

Ejemplo de referencia 18 - Análisis de la superficie específica de materiales irradiados

10 Se analizó la superficie específica de cada muestra usando un sistema de superficie específica acelerada y porosimetría ASAP 2420. Las muestras se prepararon primero desgasificando durante 16 horas a 40°C. Después, se calcula el espacio libre (tanto caliente como frío) con helio y después el tubo de muestra se extrae de nuevo para eliminar el helio. La recolección de datos empieza después de esta segunda extracción y consiste en presiones objetivo definidas que controlan cuánto gas se administra a la muestra. A cada presión objetivo, se determinan y registran la cantidad de gas adsorbida y la presión real. La presión dentro del tubo de muestra se mide con un transductor de presión. Continuarán dosis adicionales de gas hasta que se logra la presión objetivo y se deja equilibrar. La cantidad de gas adsorbido se determina sumando las múltiples dosis en la muestra. La presión y cantidad definen una isoterma de adsorción de gas y se usan para calcular una serie de parámetros, incluyendo la superficie específica BET (Tabla 24).

20 Tabla 24. Resumen de la superficie específica por adsorción de gas

ID de la muestra	Superficie específica de sitio puntual (m <sup>2</sup> /g)	Superficie específica BET (m <sup>2</sup> /g)
P132	a P/Po=0,250387771	1,5253
P132-10	a P/Po=0,239496722	1,0212
P132-100	a P/Po=0,240538100	1,0338
P132-181	a P/Po=0,239166091	0,5102
P132-US	a P/Po=0,217359072	1,0983
A132	a P/Po=0,240040610	0,5400
A132-10	a P/Po=0,211218936	0,5383
A132-100	a P/Po=0,238791097	0,4258
SG132	a P/Po=0,237989353	0,6359
SG132-10	a P/Po=0,238576905	0,6794
SG132-100	a P/Po=0,241960361	0,5518
SG132-10-US	a P/Po=0,225692889	0,5693
SG132-100-US	a P/Po=0,225935246	1,0983
G-10-US		0,751
G100-US		1,496
G132-US		1,679
WS132	a P/Po=0,237823664	0,6582
WS132-10	a P/Po=0,238612476	0,6191
WS132-100	a P/Po=0,238398832	0,6255
A-1e	a P/Po=0,238098138	0,6518
A-5e	a P/Po=0,243184477	0,6263
A-10e	a P/Po=0,243163236	0,4899
A-50e	a P/Po=0,243225512	0,4489
G-1e	a P/Po=0,238496102	0,5489
G-5e	a P/Po=0,242792602	0,5621
G-10e	a P/Po=0,243066031	0,5021
G-50e	a P/Po=0,238291132	0,4913
P-1e	a P/Po=0,240842223	1,1413
P-5e	a P/Po=0,240789274	1,0187
P-10e	a P/Po=0,240116967	1,1015
P-50e	a P/Po=0,240072114	1,0089
P-100e	a P/Po=0,236541386	0,9116
S	a P/Po=0,225335038	0,0147

<b>S-1e</b>	a P/Po=0,217142291	0,0193	0,0372
<b>S-5e</b>	a P/Po=0,133107838	0,0201	0,0485
<b>S-10e</b>	a P/Po=0,244886517	0,0236	0,0317
<b>S-30e</b>	a P/Po=0,237929400	0,0309	0,0428
<b>S-50e</b>	a P/Po=0,245494494	0,0262	0,0365
<b>S-100e</b>	a P/Po=0,224698551	0,0368	0,0506
<b>St</b>	a P/Po=0,238324949	0,3126	0,4013
<b>St-1e</b>	a P/Po=0,238432726	0,3254	0,4223
<b>St-5e</b>	a P/Po=0,238363587	0,3106	0,4071
<b>St-10e</b>	a P/Po=0,238341099	0,3205	0,4268
<b>St-30e</b>	a P/Po=0,238629889	0,3118	0,4189
<b>St-50e</b>	a P/Po=0,244630980	0,3119	0,3969
<b>St-100e</b>	a P/Po=0,238421621	0,2932	0,3677

5 El modelo BET para isotermas es una teoría ampliamente usada para calcular la superficie específica. El análisis implica determinar la capacidad de monocapa de la superficie de la muestra calculando la cantidad necesaria para cubrir la superficie entera con una sola capa de kriptón densamente empaquetada. La capacidad de la monocapa se multiplica por el área transversal de una molécula de gas sonda para determinar el área superficial total. La superficie específica es el área superficial de la parte alícuota de muestra dividido entre la masa de la muestra.

Ejemplo de referencia 19 - Determinación de la longitud de fibra de materiales irradiados

10 El ensayo de la distribución de la longitud de fibra se llevó a cabo por triplicado en las muestras enviadas usando el sistema Techpap MorFi LB01. La longitud y anchura de fibra media se describen en la tabla 25.

Tabla 25. Resumen de los datos de longitud y anchura de la fibra lignocelulósica

ID de la muestra	Media aritmética (mm)	Longitud media ponderada en longitud (mm)	Longitud media ponderada en longitud corregida estadísticamente (mm)	Anchura (micrómetros) (µm)
P132-10	0,484	0,615	0,773	24,7
P132-100	0,369	0,423	0,496	23,8
P132-181	0,312	0,342	0,392	24,4
A132-10	0,382	0,423	0,650	43,2
A132-100	0,362	0,435	0,592	29,9
SG132-10	0,328	0,363	0,521	44,0
SG132-100	0,325	0,351	0,466	43,8
WS132-10	0,353	0,381	0,565	44,7
WS132-100	0,354	0,371	0,536	45,4

Ejemplo de referencia 20 - Tratamiento ultrasónico de mijo irradiado y no irradiado

15 El mijo se cizalló de acuerdo con el ejemplo 4. El mijo se trató mediante ultrasonidos solo o irradiación con 10 Mrad o 100 MRad de rayos gamma y después ultrasonidos. Los materiales resultantes corresponden a G132-BR (no irradiado), G132-10-BR (10 Mrad y ultrasonidos) y G132-100-BR (100 Mrad y ultrasonidos), como se presenta en la tabla 1. El tratamiento por ultrasonidos se llevó a cabo en cada muestra durante 30 min usando ultrasonidos de 20 kHz de un sonotrodo a 1000 W en condiciones de recirculación. Cada muestra se dispersó en agua en una concentración de aproximadamente 0,10 g/ml.

20 Las figuras 30 y 31 muestran el aparato usado para los ultrasonidos. El aparato 500 incluye un convertidor 502 conectado a un impulsor 504 que comunica con un sonotrodo fabricado de titanio o una aleación de titanio. El sonotrodo, que tiene una junta 510 hecha por VITON<sup>®</sup> de aproximadamente su perímetro en su lado de procesamiento, forma un cierre hermético a líquidos con una celda de procesamiento 508. El lado de procesamiento del sonotrodo está sumergido en un líquido, tal como agua, que tiene dispersa en la misma la muestra que se va a tratar con ultrasonidos. La presión en la celda se controla con un manómetro 512. Cuando está en funcionamiento, cada muestra es movida mediante la bomba 517 desde el depósito 516 a través de la celda de procesamiento y recibe los ultrasonidos. Después de sonicación, la muestra es capturada en el depósito 520. El procedimiento se puede invertir en cuanto que el contenido del depósito 520 se puede mandar a través de la celda de procesamiento y capturar en el depósito 516. Este procedimiento se puede repetir una serie de veces hasta que se suministra a la muestra el nivel deseado de procesamiento.

30

Ejemplo de referencia 21 - Micrografías electrónicas de barrido de mijo no radiado en comparación con mijo irradiado e irradiado y tratado con ultrasonidos

5 Las muestras de mijo para las micrografías electrónicas de barrido se aplicaron a cinta de carbono y se recubrieron por pulverización catódica con oro (70 segundos). Las imágenes se tomaron con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo JOEL 6500.

La figura 32 es una micrografía de barrido electrónica a 1000 X aumentos de un material fibroso producido de cizallado de mijo en una cortadora de cuchillas rotativas y después pasando el material cizallado a través de un tamiz de 0,79 mm (1/32 pulgadas).

10 Las figuras 33 y 34 son micrografías electrónicas de barrido del material fibroso de la figura 32 después de irradiar con rayos gamma de 10 Mrad y 100 Mrad, respectivamente, con 1000 X aumentos.

La figura 35 es una micrografía de barrido electrónica del material fibroso de la figura 32 después de irradiar con 10 Mrad y tratamiento con ultrasonidos, con 1000 X aumentos.

La figura 36 es una micrografía de barrido electrónica del material fibroso de la figura 32 después de irradiar con 100 Mrad y tratamiento con ultrasonidos, con 1000 X aumentos.

15 Ejemplo de referencia 22 - Espectro de infrarrojos de transformada de Fourier (FT-IR) de papel Kraft irradiado y no irradiado

El análisis de FT-IR se llevó a cabo en un Nicolet/Impact 400. Los resultados indican que las muestras P132, P132-10, P132-100, P-1e, P-5e, P-10e, P-30e, P-70e, y P-100e, están de acuerdo con un material basado en celulosa.

20 La figura 37 es un espectro de infrarrojos de papel cartón Kraft cizallado de acuerdo con el ejemplo 4, mientras que la figura 38 es un espectro de infrarrojos del papel Kraft de la figura 37 después de irradiación con 100 Mrad de radiación gamma. La muestra irradiada muestra un pico adicional en la región A (centrada a aproximadamente  $1730\text{ cm}^{-1}$ ) que no se encuentra en el material no irradiado. Hay que indicar que se detectó un aumento en la cantidad de una absorción de carbonilo a  $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$  cuando se pasaba de P132 a P132-10 a P132-100. Se observaron resultados similares de las muestras P-1e, P-5e, P-10e, P-30e, P-70e, y P-100e.

25 Ejemplo de referencia 23 - Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono-13 (RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$ ) de papel Kraft irradiado y no irradiado.

Preparación de las muestras

30 Las muestras P132, P132-10, P132-100, P-1e, P-5e, P-10e, P-30e, P-70e, y P-100e se prepararon para el análisis por disolución en DMSO- $d_6$  con fluoruro de tetrabutilamonio trihidrato al 2%. Las muestras que se habían sometido a niveles menores de radiación eran significativamente menos solubles que las muestras de mayor radiación. Las muestras no irradiadas formaban un gel en esta mezcla de disolvente, pero calentando a  $60^\circ\text{C}$  se resolvían los picos en los espectros de RMN. Las muestras que se habían sometido a mayores niveles de radiación eran solubles en una concentración de 10% en p/p.

Análisis

35 Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de las muestras con 15 mg/ml mostraban un pico de resonancia muy ancho aparente centrado en 16 ppm (figuras 38A-38J). Este pico es característico de un protón de -OH intercambiable para un enol y se confirmó mediante una "agitación con  $d_2O$ ". Se analizaron compuestos modelo (acetiacetona, ácido glucurónico y ácido cetoglucónico) y hace que sea un caso convincente que este pico era realmente un protón de enol intercambiable. Este pico de enol propuesto era muy sensible a los efectos de la concentración, y los autores de la invención no pudieron concluir si esta resonancia se debía a un enol o posiblemente a un ácido carboxílico.

40 Las resonancias de protón de ácidos carboxílicos de compuestos modelo eran similares a lo que se observó para las muestras de celulosa tratadas. Estos compuestos modelo se desplazaban a campo alto a  $\sim 5\text{-}6$  ppm. La preparación de P-100e en mayores concentraciones ( $\sim 10\%$  en p/p) condujo al notable desplazamiento a campo bajo donde se encontraban las resonancias de ácido carboxílico de los compuestos modelo ( $\sim 6$  ppm) (figura 38N). Los resultados condujeron a la conclusión de que esa resonancia no es fiable para la caracterización de este grupo funcional, sin embargo, los datos sugieren que el número de hidrógenos intercambiables aumenta con el aumento de irradiación de la muestra. Además, no se detectaron protones vinílicos.

45 Los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de las muestras confirman la presencia de un carbonilo de un ácido carboxílico o un derivado de ácido carboxílico. Este nuevo pico (a 168 ppm) no está presente en las muestras no tratadas (figura 38K). Un espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  con un retraso grande permitió la cuantificación de la señal para P-100e (figuras 38L-38M). La comparación de la integración de la resonancia del carbonilo con las resonancias a aproximadamente 100 ppm (las señales de C1) sugiere que la relación del carbono carbonílico a C1 es de 1:13,8 o aproximadamente 1 carbonilo cada 14 unidades de glucosa. El desplazamiento químico a 100 ppm se correlaciona bien con el ácido glucurónico.

55

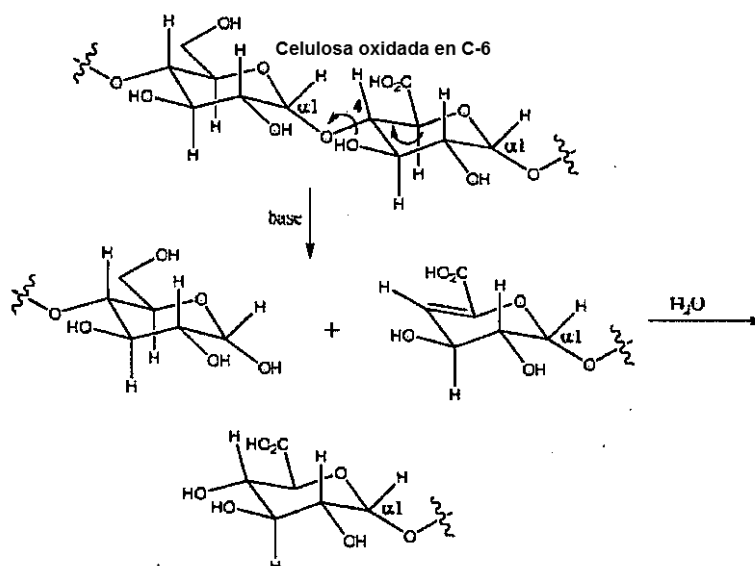
## Valoración

- Las muestras P-100e y P132-100 (1 g) se suspendieron en agua desionizada (25 ml). Se añadió el indicador amarillo de alizarina a cada muestra con agitación. P-100e era más difícil de mojar. Ambas muestras se valoraron con una solución de NaOH 0,2 M. El punto final era muy sutil y se confirmó usando un papel de pH. El pH inicial de las muestras era ~4 para ambas muestras. P132-100 necesitó 0,4 miliequivalentes de hidróxido, lo que da un peso molecular para el ácido carboxílico de 2500 uma. Si se usa 180 uma para un monómero, esto sugiere que hay un grupo ácido carboxílico para 13,9 unidades de monómero. Igualmente, P-100e necesitaba 3,2 miliequivalentes de hidróxido, que se calcula que es un grupo ácido carboxílico por cada 17,4 unidades de monómero.

## Conclusiones

- 10 Parece que el carbono C-6 de la celulosa se oxida al ácido carboxílico (un derivado de ácido glucurónico), y esta oxidación es sorprendentemente específica. Esta oxidación está de acuerdo con la banda de IR que crece con la irradiación a  $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a un ácido carboxílico alifático. Los resultados de la valoración están de acuerdo con la RMN de  $^{13}\text{C}$  cuantitativa. La mayor solubilidad de la muestra con los niveles más altos de irradiación se correlaciona bien con el número creciente de protones de ácido carboxílico. Se proporciona a continuación un mecanismo propuesto para la degradación de la "celulosa oxidada en C-6"
- 15

Esquema 1



## Ejemplo de referencia 24 - Combinación de pretratamiento con haz de electrones y ultrasonidos

- Se usa mijo como materia prima y se cizalla con una cortadora de cuchillas rotativas Munson en un material fibroso. El material fibroso después se distribuye uniformemente sobre una bandeja abierta compuesta de estaño con un área mayor de aproximadamente  $0,323\text{ m}^2$  (500 pulgadas<sup>2</sup>). El material fibroso se distribuye de modo que tenga una profundidad de aproximadamente 2,54-5,08 cm (1-2 pulgadas) en la bandeja abierta. El material fibroso se puede distribuir en bolsas de plástico con dosis más bajas de irradiación (por debajo de 10 Mrad), y dejar sin cubrir en la bandeja metálica con dosis de radiación más altas.
- 25 Después, muestras separadas del material fibroso se exponen a dosis sucesivas de radiación de haz de electrones para lograr una dosis total de 1 Mrad, 2 Mrad, 3, Mrad, 5 Mrad, 10 Mrad, 50 Mrad, y 100 Mrad. Algunas muestras se mantienen en las mismas condiciones que las muestras restantes, pero no se irradian, para servir de control. Después de enfriar, el material fibroso irradiado se manda adelante para el posterior procesamiento a través de un dispositivo de ultrasonidos.
- 30 El dispositivo de ultrasonidos incluye un convertidor conectado a un impulsor que comunica con un sonotrodo fabricado de titanio o una aleación de titanio. El sonotrodo, que tiene una junta hecha por VITON® de aproximadamente su perímetro en su lado de procesamiento, forma un cierre hermético a líquidos con una celda de procesamiento. El lado de procesamiento del sonotrodo está sumergido en un líquido, tal como agua, en el que se sumerge el material fibroso que se va a irradiar. La presión en la celda se controla con un manómetro de presión.
- 35 Cuando está en funcionamiento, cada muestra es movida mediante la bomba a través de la celda de procesamiento y recibe los ultrasonidos.

Para preparar el material fibroso irradiado para los ultrasonidos, el material fibroso irradiado se retira de cualquier recipiente (p. ej., bolsas de plástico) y se dispersa en agua en una concentración de aproximadamente 0,10 g/ml. Se

5 lleva a cabo el tratamiento con ultrasonidos en cada muestra durante 30 min usando ultrasonidos de 20 kHz desde un sonotrodo a 1000 W en condiciones de recirculación. Después del tratamiento con ultrasonidos, el material fibroso irradiado se captura en un depósito. Este procedimiento se puede repetir una serie de veces hasta alcanzar un nivel de procesamiento deseado, basándose en el control de los cambios estructurales en el mijo. De nuevo, algunas muestras irradiadas se mantienen en las mismas condiciones que el resto de las muestras, pero no se tratan con ultrasonidos, de nuevo para servir como controles. Por lo tanto, algunos controles no son procesados, algunos son solo irradiados, y algunos son solo tratados con ultrasonidos.

Ejemplo 25 - Ensayo microbiano de biomasa pretratada

10 Se analiza en los materiales lignocelulósicos específicos previamente tratados como se describe en la presente memoria, la toxicidad para cepas comunes de levaduras y bacterias usadas en la industria de los biocombustibles para la etapa de fermentación en la producción de etanol. Además, se examina el contenido de azúcar y la compatibilidad con enzimas celulasa para determinar la viabilidad del procedimiento de tratamiento. El ensayo de los materiales previamente tratados se lleva a cabo en dos fases como sigue.

Fase 1: Toxicidad y contenido de azúcar

15 La toxicidad de las hierbas previamente tratadas y materias primas de papel se mide en levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (levadura del vino) y *Pichia stipitis* (ATCC 66278) así como en las bacterias *Zymomonas mobilis* (ATCC 31821) y *Clostridium thermocellum* (ATCC 31924). Se lleva a cabo un estudio de crecimiento con cada uno de los organismos para determinar el tiempo óptimo de incubación y toma de muestra.

20 Después, se incuba cada una de las materias primas, por duplicado con *S. cerevisiae*, *P. stipitis*, *Z. mobilis*, y *C. thermocellum* en un medio microbiológico estándar para cada organismo. Se usa caldo YM para las dos cepas de levaduras *S. cerevisiae* y *P. stipitis*. Se usa medio RM para *Z. mobilis* y medio CM4 para *C. thermocellum*. Se usa un control positivo con azúcar puro añadido, pero sin materia prima, para la comparación. Durante la incubación, se toman un total de 5 muestras a lo largo de un periodo de tiempo de 12 horas, a las 0, 3, 6, 9 y 12 horas y se analiza la viabilidad (recuentos de placa para *Z. mobilis* y recuentos directos para *S. cerevisiae*) y la concentración de etanol.

25 El contenido de azúcar de las materias primas se mide usando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) equipada con una columna Shodex™ Sugar SP0810 o Biorad Aminex® HPX-87P. Cada una de las materias primas (aproximadamente 5 g) se mezcla con agua de ósmosis inversa (RO) durante 1 hora. Se separa la parte líquida de la mezcla y se analiza el contenido de glucosa, galactosa, xilosa, manosa, arabinosa y celobiosa. El análisis se lleva a cabo de acuerdo con el protocolo del Centro Nacional de Bioenergía *Determinación de hidratos de carbono estructurales y lignina en biomasa*

Fase 2: Compatibilidad de celulasa

35 Se ensayan materias primas, por duplicado, con Accellerase™ 1000 disponible en el comercio, que contiene un complejo de enzimas que reduce la biomasa lignocelulósica a azúcares fermentables, a la temperatura y concentración recomendados en un matraz de Erlenmeyer. Los matraces se incuban con agitación moderada a aproximadamente 200 rpm durante 12 horas. Durante este tiempo, se toman muestras cada 3 horas, a las 0, 3, 6, 9 y 12 horas para determinar la concentración de azúcares reductores (Hope y Dean, *Biotech J.*, 1974, 144:403) en la parte líquida de los matraces.

Ejemplo 26 - Análisis de la concentración de azúcar usando HPLC

40 Se analizaron 13 muestras para la concentración de azúcar (HPLC) y la toxicidad contra 3 microorganismos (*Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae*, y *Zymomonas mobilis*). La tabla 26 cita el equipamiento usado para estos experimentos. Las tablas 27 y 28 proporcionan una lista de azúcares (incluyendo el proveedor y números de lotes) usados para preparar el patrón de HPLC y el protocolo usado para preparar el patrón de HPLC, respectivamente.

Tabla 26. Equipamiento usado en experimentos

Equipamiento	Fabricante, nombre
pH-ímetro	Orion
Agitadores (2)	B. Braun Biotech, Certomat BS-1
HPLC	Waters, Modulo de HPLC 2690
Espectrofotómetro	Unicorn, UV300
Analizador bioquímico YSI	Interscience, YSI

Tabla 27. Azúcares usados en el análisis de HPLC

Azúcar	Fabricante	n° Ref	n° de lote
glucosa		49140	1284892
xilosa		95731	1304473 51707231
celobiosa	BioChemika	22150	1303157 14806191
arabinosa		10840	1188979 24105272
manosa		63582	363063/1 22097
galactosa		48259	46032/1 33197

Tabla 28. Preparación de patrones de HPLC

Concentración deseada (mg/ml)	Volumen de la solución de azúcar	Volumen de agua nanopura (ml)	Volumen total (ml)
4	50 ml de 4 mg/ml	0	50
2	25 ml de 4 mg/ml	25	50
1	25 ml de 2 mg/ml	25	50
0,5	25 ml de 1 mg/ml	25	50
0,1	5 ml de 1 mg/ml	20	25
Patrón de verificación 1,5 mg/ml	18,75 ml de 4 mg/ml	31,25	50

## 5 Análisis

Cada muestra (1 gramo) se mezcló con agua de ósmosis inversa a 200 rpm y 50°C durante la noche. El pH de la muestra se ajustó a entre 5 y 6 y se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm. Las muestras se almacenaron a -20°C antes del análisis para mantener la integridad de las muestras. Las observaciones hechas durante la preparación de las muestras se presentan en la tabla 29.

## 10 Tabla 29. Observaciones durante la preparación de la muestra de HPLC

Muestra	Cantidad usada (g)	Agua añadida (ml)	pH	Observaciones
P132	1	30	5,38	Esponjoso, difícil de mezclar
P132-10	1	25	6,77	Esponjoso, difícil de mezclar
P132-100	1	20	3,19	El pH es bajo, difícil de llevar a pH 5,0, se usó NaOH 10 N
P132-US	0,3	5	6,14	
A132	1	15	5,52	
A132-10	1	15	4,9	
A132-100	1	15	5,39	
SG132	1	15	5,59	
SG132-10	1	15	5,16	
SG132-100	1	15	4,7	
SG132-10-US	0,3	5	5,12	
SG132-100-US	0,3	5	4,97	
WS132	1	15	5,63	
WS132-10	1	15	5,43	
WS132-100	1	15	5,02	

\*El pH de estas muestras se ajustó al pH usando NaOH 1 N

5 Se prepararon patrones recientes a partir de una solución madre de 4 mg/ml de los 6 azúcares combinados, glucosa, xilosa, celobiosa, arabinosa, manosa y galactosa. La solución madre se preparó disolviendo 0,400 gramos de cada azúcar en 75 ml de agua nanopura (filtrada a través de 0,3 micrómetros). Una vez disueltos, la solución madre se diluyó a 100 ml usando un matraz aforado y se almacenó a -20°C. Se prepararon soluciones de trabajo de los patrones de 0,1, 0,5, 1, 2 y 4 mg/ml, por dilución seriada de la solución madre con agua nanopura. Además, también se preparó un patrón de verificación de 1,5 mg/ml a partir de la solución madre.

10 Las concentraciones de azúcar se analizaron de acuerdo con el protocolo de *Determination of Structural Carbohydrates in Biomass (Determinación de hidratos de carbono estructurales en biomasa)* (NREL Biomass Program, 2006) y este protocolo se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. Se usó una columna SHODEX SUGAR SP0810 con un detector de dispersión de luz evaporativo. Se analizó un patrón de verificación (1,5 mg/ml del patrón) cada 8 inyecciones para asegurar que se mantenían la integridad de la columna y del detector durante el experimento. El coeficiente de variación de la curva patrón (valor de R<sup>2</sup>) era al menos 0,989 y la concentración de los patrones de verificación estaba dentro del 10% de la concentración real. Las condiciones de HPLC eran las siguientes:

15 Tabla 30. Parámetros de HPLC

Volumen de inyección:	20 µl
Fase móvil:	agua nanopura*, filtrada 0,45 µm y desgasificada
Caudal:	0,5 ml/min
Temperatura de la columna:	85°C
Temperatura del detector:	temperatura del evaporador 110°C temperatura del nebulizador 90°C

\* Los ensayos iniciales indicaron que se observaba mejor separación cuando se usaba agua nanopura que acetonitrilo:agua 15/85 en la fase móvil (el fabricante no recomienda usar más de 20% de acetonitrilo en esta columna).

Resultados

20 Los resultados del análisis por HPLC se presentan en las tablas 31, 32 y 33.

Tabla 31. Concentración de azúcar expresada como mg/ml y mg/g de extracto

ID de la muestra	Xilosa PM ~150 C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> Mono		Arabinosa PM ~150 C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> Mono		Glucosa PM ~180 C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> Mono		Galactosa (véase gluc) mg/ml :mg/g		Manosa (véase gluc) mg/ml :mg/g		Celobiosa PM ~340 C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> Disac	
	mg/ml	mg/g	mg/ml	mg/g	mg/ml	mg/g	mg/ml	mg/g	mg/ml	mg/g	mg/ml	mg/g
<b>P</b>												
P-132	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
P-132-10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.34	8.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.33
P-132-100	0.35	7.04	0.00	0.00	0.34	6.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.36
P-132-BR	0.35	5.80	0.43	7.17	0.34	5.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>G</b>												
G-132	0.39	5.88	0.38	5.73	0.84	12.66	0.34	5.04	0.92	13.76	0.00	0.00
G-132-10	0.50	7.50	0.41	6.18	1.07	16.04	0.35	5.19	0.98	14.66	0.00	0.00
G-132-100	0.00	0.00	0.37	5.54	0.41	6.14	0.00	0.00	0.55	8.28	0.45	0.00
G-132-10-US	0.34	5.73	0.39	6.45	0.33	5.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G-132-100-US	0.00	0.00	0.37	6.22	0.35	5.90	0.33	5.43	0.40	6.70	0.39	0.00
<b>A</b>												
A-132	1.36	20.39	0.00	0.00	1.06	16.22	0.39	5.84	1.07	16.02	0.00	0.00
A-132-10	1.19	17.87	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.37	5.52	0.00	0.00
A-132-100	1.07	16.11	0.00	0.00	0.35	5.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.81
<b>WS</b>												
WS-132	0.49	7.41	0.41	6.15	0.39	5.90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
WS-132-10	0.57	8.49	0.40	5.99	0.73	10.95	0.34	5.07	0.50	7.55	0.00	0.00
WS-132-100	0.43	6.39	0.37	5.51	0.36	5.36	0.00	0.00	0.36	5.33	0.35	0.00

Tabla 32. Concentración de azúcar expresada como % de papel

Concentración de azúcar (% de muestra seca)	P132	P132-10	P132-100	P132-US
celobiosa	0,00	0,81	0,72	0,00
glucosa	0,00	0,86	0,67	0,56
xilosa	0,00	0,00	0,70	0,58
galactosa	0,00	0,00	0,00	0,00
arabinosa	0,00	0,00	0,00	0,72
manosa	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 33. Concentración de azúcar expresada como % de la muestra total

Concentración de azúcar (% de muestra seca)	A132	A132-10	A132-100	SG132	SG132-10	SG132-100	SG132-10-US	SG132-100-US	WS132	WS132-10	W
celobiosa	0,00	0,00	1,22	0,00	0,00	0,67	0,00	0,65	0,00	0,00	
glucosa	1,62	0,00	0,52	1,27	1,60	0,61	0,54	0,59	0,59	1,10	
xilosa	2,04	1,79	1,61	0,59	0,75	0,00	0,57	0,00	0,74	0,85	
galactosa	0,58	0,00	0,00	0,50	0,52	0,00	0,00	0,54	0,00	0,51	
arabinosa	0,00	0,00	0,00	0,57	0,62	0,55	0,65	0,62	0,62	0,60	
manosa	1,60	0,55	0,00	1,38	1,47	0,83	0,00	0,67	0,00	0,76	

5

## Ejemplo 27 - Estudio de toxicidad

Se analizó la toxicidad de 12 muestras frente a un panel de tres cultivos productores de etanol. En este estudio, se añadió glucosa a las muestras con el fin de distinguir entre desnutrición de los cultivos y la toxicidad de las muestras. Se ensayó en una decimotercera muestra la toxicidad contra *Pichia stipitis*. Se cita en la tabla 32 un resumen del protocolo usado. Se da en las tablas 34-36 una descripción de los productos químicos y el equipamiento usado en el ensayo de toxicidad.

10

Tabla 34. Condiciones para ensayar la toxicidad

Variable	Organismo		
	<i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 31821	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 24858	<i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124
Repetición del ensayo	Duplicado		
Volumen de inoculación (ml)	1	0,1	1
Temperatura de incubación	30°C	25°C	25°C
Velocidad del agitador (rpm)	125	200	125
Volumen del matraz Erlenmeyer	250 ml	500 ml	250 ml
Volumen de medio	100 ml	100 ml	100 ml
Tiempo de incubación total (horas)	36	36	48
Análisis de etanol (horas)	24, 30, 36	24, 30, 36	24, 36, 48
Recuentos de células (horas)	24, 36	24, 36	24, 48
pH	0 horas	0 horas	0 horas



Tabla 35. Reactivos usados para ensayar la toxicidad

Componente del medio	Fabricante	Referencia nº	Lote nº
Urea	ScholAR Chemistry	9472706	AD-7284-43
Base nitrogenada de levadura	Becton Dickinson	291940	7128171
Peptona	Becton Dickinson	211677	4303198
Xilosa	Fluka	95731	1304473
			51707231
Glucosa	Sigma	G-5400	107H0245
Extracto de levadura (usado para <i>S. cerevisiae</i> )	Becton Dickinson	288620	4026828
Extracto de levadura (usado para <i>P. stipitis</i> y <i>Z. mobilis</i> )	Becton Dickinson	212750	7165593
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Sigma	M5921	034K0066
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma	A4418	117K5421
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma	P5379	074K0160
Caldo YM	Becton Dickinson	271120	6278265

Tabla 36. Componentes YSI usados en el estudio del matraz agitado

Componente	Catálogo nº	Lote nº
Membrana para etanol YSI	2786	07L100153
Patrón de etanol YSI (3,2 g/l)	2790	012711040
Tampón de etanol YSI	2787	07M1000053, 07100215

5 El ensayo se llevó a cabo usando los tres microorganismos como se describe a continuación.

*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858 (American Type Culture Collection)

10 Se preparó un cultivo inclinado de *S. cerevisiae* a partir de un cultivo liofilizado rehidratado obtenido de la ATCC. Una parte del material inclinado se sembró en estrías sobre un caldo YM + agar 20 g/l (pH 5,0) y se incubó a 30°C durante 2 días. Un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 50 ml de medio (glucosa 20 g/l, extracto de levadura 3 g/l y peptona 5,0 g/l, pH 5,0) se inoculó con una colonia de la placa de YM y se incubó durante 24 horas a 25°C y 200 rpm. Después de 23 horas de crecimiento, se tomó una muestra y se analizó la densidad óptica (600 nm en un espectrofotómetro de UV) y pureza (tinción de Gram). Basándose en estos resultados, se escogió un matraz (llamado el matraz de siembra) con una DO de 14,8 y tinción de Gram transparente para inocular todos los matraces de ensayo.

15 Los recipientes de ensayo eran matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían 100 ml de medio estéril descrito antes. Todos los matraces se trataron en autoclave a 121°C y 1,05 kg/cm<sup>2</sup> (15 psi) antes de la adición de los materiales de ensayo. Los materiales de ensayo no se esterilizaron, ya que el tratamiento en autoclave cambiará el contenido de las muestras. Las muestras de ensayo se añadieron en el momento de la inoculación (en lugar de antes de) para reducir la posibilidad de contaminación. Además de las muestras de ensayo, se añadió a cada matraz 20 1 ml (1% en v/v) de material del matraz de siembra. Los matraces se incubaron como se ha descrito antes durante 36 horas.

*Pichia stipitis* NRRL Y-7124 (ARS Culture Collection)

25 Se preparó un cultivo inclinado de *P. stipitis* a partir de un cultivo liofilizado rehidratado de ARS Culture Collection. Una parte del material inclinado se sembró en estrías sobre un caldo YM + agar 20 g/l (pH 5,0) y se incubó a 30°C durante 2 días. Un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 100 ml de medio (glucosa 40 g/l, base nitrogenada

de levadura 1,7 g/l, urea 2,27 g/l, peptona 6,56 g/l, xilosa 40 g/l, pH 5,0) se inoculó con una pequeña cantidad del material inclinado y se incubó durante 24 horas a 25°C y 125 rpm. Después de 23 horas de crecimiento, se tomó una muestra y se analizó la densidad óptica (600 nm en un espectrofotómetro de UV) y pureza (tinción de Gram). Basándose en estos resultados, se escogió un matraz (llamado el matraz de siembra) con una DO de 5,23 y tinción de Gram transparente para inocular todos los matraces de ensayo.

Los recipientes de ensayo eran matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 100 ml de medio estéril descrito antes. Todos los matraces se trataron en autoclave vacíos a 121°C y 1,05 kg/cm<sup>2</sup> (15 psi) y se añadió medio esterilizado por filtración (filtro de 0,22 µm) a los matraces antes de la adición de los materiales de ensayo. Los materiales de ensayo no se esterilizaron, ya que el tratamiento en autoclave cambiará el contenido de las muestras y la esterilización por filtración no es adecuada para la esterilización de sólidos. Las muestras de ensayo se añadieron en el momento de la inoculación (en lugar de antes de) para reducir la posibilidad de contaminación. Además de las muestras de ensayo, se añadió a cada matraz 1 ml (1% en v/v) de material del matraz de siembra. Los matraces se incubaron como se ha descrito antes durante 48 horas.

*Zymomonas mobilis* ATCC 31821 (American Type Culture)

Se preparó un cultivo inclinado de *Z. mobilis* a partir de un cultivo liofilizado rehidratado obtenido de la ATCC. Una parte del material inclinado se sembró en estrías en placas DYE (glucosa 20 g/l, extracto de levadura 10 g/l, agar 20 g/l, pH 5,4) y se incubó a 30°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 días. Un tubo de ensayo con tapón de rosca de 20 ml que contenía 15 ml de medio (glucosa 25 g/l, extracto de levadura 10 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/l, pH 5,4) se inoculó con una colonia y se incubó durante 24 horas a 30°C sin agitación. Después de 23 h de crecimiento, se tomó una muestra y se analizó la densidad óptica (600 nm en un espectrofotómetro de UV) y pureza (tinción de Gram). Basándose en estos resultados, se escogió un tubo (DO 1,96) para inocular el segundo matraz de siembra. El segundo matraz de siembra era un matraz de 125 ml que contenía 70 ml de medio descrito antes y se inoculó con 700 µl (1% en v/v) y se incubó durante 24 horas a 30°C sin agitación. Después de 23 horas de crecimiento, se tomó una muestra y se analizó la densidad óptica (600 nm en un espectrofotómetro de UV) y pureza (tinción de Gram). Basándose en estos resultados, se escogió un matraz (llamado el matraz de siembra) con una DO de 3,72 para inocular todos los matraces de ensayo.

Los recipientes de ensayo eran matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 100 ml de medio estéril descrito antes, con excepción del extracto de levadura de 5 g/l. Todos los matraces se trataron en autoclave vacíos a 121°C y 1,05 kg/cm<sup>2</sup> (15 psi) y se añadió medio filtrado esterilizado (filtro de 0,22 µm) a los matraces antes de la adición de los materiales de ensayo. Los materiales de ensayo no se esterilizaron, ya que el tratamiento en autoclave cambiará el contenido de las muestras y la esterilización por filtración no es adecuada para la esterilización de sólidos. Las muestras de ensayo se añadieron en el momento de la inoculación (en lugar de antes de) para reducir la posibilidad de contaminación. Además de las muestras de ensayo, se añadió a cada matraz 1 ml (1% en v/v) de material del matraz de siembra. Los matraces se incubaron como se ha descrito antes durante 36 horas.

Análisis

Se analizaron dos muestras para la concentración celular (usando recuento por extensión en placa para *Z. mobilis* y recuentos directos (hemocitómetro y microscopio para *S. cerevisiae* y *P. stipitis*). Muestras adecuadamente diluidas de *Z. mobilis* se extendieron en placas de dextrosa-extracto de levadura (glucosa 20 g/l, extracto de levadura 10 g/l, agar 20 g/l, pH 5,4) y se incubaron a 30°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 días, y se contó el número de colonias. Se mezclaron muestras adecuadamente diluidas de *S. cerevisiae* y *P. stipitis* con azul Trypan al 0,05%, se cargaron en un hemocitómetro Neubauer. Las células se contaron bajo 40 X aumentos.

Se analizó en tres muestras la concentración de etanol usando el analizador bioquímico YSI basado en el ensayo de la alcohol deshidrogenasa (YSI, Interscience). Las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 20 min y el líquido sobrenadante se almacenó a -20°C para conservar la integridad. Las muestras se diluyeron a entre 0-3,2 g/l de etanol antes del análisis. Se analizó un patrón de etanol de 3,2 g/l aproximadamente cada 30 muestras para asegurar que se mantenía la integridad de la membrana durante el análisis. La densidad óptica (600 nm) de las muestras no se da porque las muestras de ensayo sólidas interferían con la medición de absorbancia aumentando la turbidez de las muestras y no son precisas.

Resultados del análisis de etanol

El rendimiento se usó para comparar cada muestra con el control para cada microorganismo (tablas 37-39). Sin embargo, el % de rendimiento no se puede usar para comparar entre cepas. Cuando se comparan cepas, debería usarse la concentración total de etanol. Cuando se analizan los datos un % de rendimiento menor de 80% puede indicar toxicidad cuando va acompañado de número bajo de células. La ecuación usada para determinar el % de rendimiento es:

$$\% \text{ de rendimiento} = (\text{etanol en la muestra} / \text{etanol en el control}) \times 100$$

Tabla 37. Concentración de etanol y % de rendimiento usando *Saccharomyces cerevisiae*

Muestra nº	24 horas		30 horas		36 horas	
	Concentración de etanol (g/l)	% Rendimiento	Concentración de etanol (g/l)	% Rendimiento	Concentración de etanol (g/l)	% Rendimiento
P132	4,0	140	5,2	127	3,26	176
P132-10	4,2	147	5,1	125	3,86	209
P132-100	4,3	149	5,6	136	3,47	187
A132	5,5	191	6,5	160	5,24	283
A132-10	1,9	67	6,3	153	5,54	299
A132-100	4,4	154	5,6	137	4,04	218
G132	5,3	186	6,0	146	3,99	215
G132-10	5,2	180	6,4	156	4,63	250
G132-100	5,5	191	6,3	155	4,60	248
WS132	4,8	168	6,3	155	4,51	244
WS132-10	4,9	172	6,0	146	4,55	246
WS132-100	4,9	170	5,7	140	4,71	254
Control	2,9	100	4,1	100	1,85	100

Tabla 38. Concentración de etanol y % de rendimiento usando *Pichia stipitis*

Muestra nº	24 horas		36 horas		48 horas	
	Concentración de etanol (g/l)	% Rendimiento	Concentración de etanol (g/l)	% Rendimiento	Concentración de etanol (g/l)	% Rendimiento
P132	2,8	130	3,4	188	8,1	176
P132-10	7,3	344	11,9	655	15,8	342
P132-100	5,2	247	8,6	472	13,3	288
A132	12,2	575	14,7	812	14,9	324
A132-10	15,1	710	18,7	1033	26,0	565
A132-100	10,9	514	16,7	923	22,2	483
G132	8,0	375	12,9	713	13,3	288
G132-10	10,1	476	16,0	884	22,3	485
G132-100	8,6	406	15,2	837	21,6	470
WS132	9,8	460	14,9	820	17,9	389
WS132-10	7,8	370	16,1	890	19,3	418
WS132-100	9,1	429	15,0	829	15,1	328
Muestra A*	13,2	156	19,0	166	20,6	160
Control	2,1	100	1,8	100	4,6	100

- 5 Las muestras en negrita eran las productoras más altas de etanol, por encima de 20 g/l y similares a las concentraciones en hidrolizados de madera (H.K. Sreenath y T.W. Jeffries, *Bioresource Technology* 72 (2000) 253-260).

\*Analizado en experimento de matraz agitado más tarde

Tabla 39. Concentración de etanol y % de rendimiento usando *Zymomonas mobilis*

Muestra nº	24 horas		30 horas		36 horas	
	Concentración de etanol (g/l)	% Rendimiento	Concentración de etanol (g/l)	% Rendimiento	Concentración de etanol (g/l)	% Rendimiento
P132	7,5	85	6,8	84	7,5	93
P132-10	7,5	85	4,8	59	6,8	84
P132-100	7,3	83	6,2	77	7,1	88
A132	9,6	109	8,3	103	9,1	112
A132-10	9,2	105	8,4	105	8,8	109
A132-100	8,2	93	7,6	94	7,6	93
WS132	7,9	89	7,1	88	7,7	94
WS132-10	8,2	93	6,8	85	7,3	90
WS132-100	8,7	98	6,9	86	8,3	102
G132	8,7	99	7,1	88	8,1	99
G132-10	7,8	88	7,0	88	7,3	90
G132-100	8,6	98	7,8	98	8,3	102
Control	8,8	100	8,0	100	8,1	100

Resultados del análisis de concentración celular

- 5 El % de células se usa para comparar cada muestra con el control para cada organismo (tablas 40-42). Sin embargo, el % de células no se puede usar para comparar entre cepas. Cuando se comparan cepas, debe usarse la concentración total de las células. Cuando se analizan los datos, un % de rendimiento menor que 70% puede indicar toxicidad cuando va acompañado de baja concentración de etanol. La ecuación usada para determinar el % de rendimiento es:

$$\% \text{ de células} = (\text{número de células en la muestra} / \text{número de células en el control}) \times 100$$

- 10 Tabla 40. Resultados del análisis de concentración celular para *Saccharomyces cerevisiae*

Muestra nº	24 horas		36 horas	
	Concentración celular ( $\times 10^8$ /ml)	% de células	Concentración celular ( $\times 10^8$ /ml)	% de células
<b>P132</b>	1,99	166	2,51	83
<b>P132-10</b>	2,51	209	1,91	63
<b>P132-100</b>	1,35	113	1,99	66
<b>A132</b>	3,80	316	2,59	85
<b>A132-10</b>	1,73	144	3,90	129
<b>A132-100</b>	3,98	331	2,51	83
<b>G132</b>	2,14	178	3,12	103
<b>G132-10</b>	2,33	194	2,59	85
<b>G132-100</b>	3,57	298	2,66	88
<b>WS132</b>	4,10	341	2,66	88
<b>WS132-10</b>	2,63	219	2,81	93
<b>WS132-100</b>	2,29	191	2,40	79
<b>Control</b>	1,20	100	3,03	100

Tabla 41. Resultados del análisis de concentración celular para *Pichia stipitis*

Muestra nº	24 horas		48 horas	
	Concentración celular (x 10 <sup>9</sup> /ml)	% de células	Concentración celular (x 10 <sup>8</sup> /ml)	% de células
<b>P132</b>	16,4	108	20,3	87
<b>P132-10</b>	11,5	76	9,5	41
<b>P132-100</b>	6,5	43	17,8	76
<b>A132</b>	7,1	47	10,2	44
<b>A132-10</b>	12,7	84	9,3	40
<b>A132-100</b>	11,8	78	18,3	78
<b>G132</b>	4,5	30	4,8	21
<b>G132-10</b>	22,8	151	9,8	42
<b>G132-100</b>	10,1	67	21,7	93
<b>WS132</b>	17,6	117	8,2	35
<b>WS132-10</b>	5,3	35	10,8	46
<b>WS132-100</b>	9,3	62	10,7	46
<b>Control</b>	15,1	100	23,4	100

Tabla 42. Resultados del análisis de concentración celular para *Zymomonas mobilis*

Muestra nº	24 horas		36 horas	
	Concentración celular (x 10 <sup>8</sup> /ml)	% de células	Concentración celular (x 10 <sup>8</sup> /ml)	% de células
<b>P132</b>	7,08	86	2,97	66
<b>P132-10</b>	21,80	264	4,37	98
<b>P132-100</b>	4,50	54	3,35	75
<b>A132</b>	6,95	84	1,99	44
<b>A132-10</b>	6,13	74	4,05	91
<b>A132-100</b>	9,60	116	4,20	94
<b>G132</b>	7,48	90	3,84	86
<b>G132-10</b>	14,75	178	2,89	65
<b>G132-100</b>	6,00	72	2,55	57
<b>WS132</b>	9,70	117	4,55	102
<b>WS132-10</b>	13,20	160	4,32	97
<b>WS132-100</b>	5,15	62	2,89	65
<b>Control</b>	8,27	100	4,47	100

- 5 Ejemplo de referencia 28 - Fermentación en matraces agitados de muestras de celulosa usando *P. stipitis*

#### Resumen

Se ensayaron 13 muestras para la producción de etanol en cultivo de *P. stipitis* sin azúcar añadido. Se ensayaron en presencia y ausencia de celulosa (complejo enzimático Accellerase 1000®, Genencor). El equipamiento y los reactivos usados para el experimento se citan a continuación en las tablas 43-45.

- 10 Tabla 43. Equipamiento y frecuencia de mantenimiento

Equipamiento	Fabricante	Frecuencia de mantenimiento
Agitadores (2)	B. Braun Biotech, Certomat BS-1	Trimestral
Espectrofotómetro	Unicam, UV300	Bianual
Analizador bioquímico YSI	Interscience, YSI	Mensual

Tabla 44. Componentes de YSI usados en el estudio en matraces agitados

Equipamiento	Catálogo n°	Lote n°
Membrana para etanol YSI	2786	07L100153
Patrón de etanol YSI (3,2 g/l)	2790	012711040
Tampón para etanol YSI	2787	07M1000053 07100215

Tabla 45. Productos químicos usados para la fermentación en matraces agitados

Componente del medio	Fabricante	Referencia n°	Lote n°
Urea	SchoLAR Chemistry	9472706	AD-7284-43
Base nitrogenada de levadura	Becton Dickinson	291940	7128171
Peptona	Becton Dickinson	211677	4303198
Caldo YM	Becton Dickinson	271120	6278265
Complejo enzimático Accellerase®	Genencor	Accellerase® 1000	160079133
Xilosa	BioChemika	95731	1304473 51707231
Glucosa	Sigma	G-5400	107H0245

5 Se preparó un cultivo inclinado de *P. stipitis* NRRL Y-7124 a partir de cultivo liofilizado rehidratado de ARS Culture Collection. Una parte del material inclinado se sembró por estrías en caldo para hongos y levaduras (YM) + agar 20 g/l (pH 5,0) y se incubó a 30°C durante 2 días. Un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 100 ml de medio (glucosa 40 g/l, base nitrogenada de levadura 1,7 g/l, urea 2,27 g/l, peptona 6,56 g/l, xilosa 40 g/l, pH 5,0) se inoculó con una colonia y se incubó durante 24 horas a 25°C y 100 rpm. Después de 23 horas de crecimiento, se tomó una muestra y se analizó la densidad óptica (600 nm en un espectrofotómetro de UV) y pureza (tinción de Gram). Basándose en estos resultados, se escogió un matraz (llamado el matraz de siembra) con una DO de 6,79 y tinción de Gram transparente para inocular todos los matraces de ensayo.

15 Los recipientes de ensayo eran matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 100 ml de medio (base nitrogenada de levadura 1,7 g/l, urea 2,27 g/l, peptona 6,56 g/l). No se añadió azúcar (glucosa o xilosa) al medio de crecimiento del matraz. Todos los matraces se trataron en autoclave vacíos a 121°C y 1,05 kg/cm<sup>2</sup> (15 psi) y se añadió medio esterilizado por filtración (filtro de 0,22 µm) a los matraces antes de la adición de los materiales de ensayo. Los materiales de ensayo no se esterilizaron, ya que el tratamiento en autoclave cambiará el contenido de las muestras y la esterilización por filtración no es adecuada para la esterilización de sólidos. Las muestras de ensayo (listadas en la tabla 46) se añadieron en el momento de la inoculación (en lugar de antes de) para reducir la posibilidad de contaminación. Además de las muestras de ensayo, se añadió a cada matraz 1 ml (1% en v/v) de material del matraz de siembra. Los matraces que contenían la muestra P132-100 requerían la adición de 0,4 ml de NaOH 1 M para llevar el pH a 5,0. Los matraces se incubaron a 30°C y 150 rpm durante 96 horas.

25 Un conjunto de matraces duplicados por materia prima contenían el complejo enzimático Accellerase® (1,25 ml por matraz, la dosis más alta recomendada es 0,25 ml por gramo de biomasa, Genencor) para intentar la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). El otro conjunto de matraces duplicados no contenía el complejo enzimático Accellerase®. Se analizó un total de 52 matraces.

30 También se analizaron 6 matraces de control. Los matraces de control positivo contenían celulosa en polvo SolkaFloc 200 NF (lote n° UA158072, International Fiber Corporation) en una concentración de 2,5 gramos por matraz de 100 ml (25 gramos por litro) con o sin adición del complejo enzimático Accellerase®. Además, también se usó un control que contenía solo azúcares (glucosa y xilosa).

Tabla 46. La cantidad de cada materia prima añadida a cada matraz

Número Xyleco	Cantidad añadida al matraz (g/100 ml)
P132	2,5
P132-10	2,5
P132-100	2,5
A132	5
A132-10	5
A132-100	5
G132	5
G132-10	5
G132-100	5
WS132	5
WS132-10	5
WS132-100	5
Muestra A	5

Análisis

5 Se analizó la concentración de etanol de las muestras (tablas 47, 48 y 49) usando el analizador bioquímico YSI basado en el ensayo de la alcohol deshidrogenasa (YSI, Interscience). Las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 20 min y el líquido sobrenadante se almacenó a -20°C. Las muestras se diluyeron a entre 0-3,2 g/l de etanol antes del análisis. Se analizó un patrón de etanol de 2,0 g/l aproximadamente cada 30 muestras para asegurar que se mantenía la integridad de la membrana durante el análisis.

Resultados

10 Tabla 47. Resultados de los matraces de control

Control	Concentración de etanol (g/l)			
	24 horas	36 horas	48 horas	96 horas
Contiene glucosa, sin celulosa, sin enzima	13,20	19,00	20,60	21,60
Contiene celulosa cristalina (Solka Floe), sin azúcar, sin enzima	0,00	0,00	0,00	0,00
Contiene celulosa cristalina (Solka Floe) 25 g/l, sin azúcar, Accellerase® añadida	6,56	7,88	9,80	8,65

Tabla 48. Resultados de los matraces de agitación sin complejo enzimático Accellerase® 1000

Número de muestra	Concentración de etanol (g/l)			
	24 horas	36 horas	48 horas	96 horas
P132	0,09	0,00	0,00	0,12
P132-10	0,02	0,01	0,02	0,17
P132-100	0,09	0,01	0,00	0,02
A132	1,74	1,94	2,59	3,70
A132-10	1,82	2,36	2,30	2,96
A132-100	0,30	0,73	1,31	2,38
G132	0,40	0,09	0,24	0,42
G132-10	0,69	0,42	0,22	0,24
G132-100	0,19	0,05	0,05	0,21
WS132	0,47	0,50	0,68	0,65
WS132-10	0,47	0,49	0,34	0,92
WS132-100	0,14	0,07	0,08	0,22
Muestra A	1,88	1,89	2,30	3,28

Tabla 49. Resultados de los matraces de agitación con complejo enzimático Accellerase® 1000

Número de muestra	Concentración de etanol (g/l)			
	24 horas	36 horas	48 horas	96 horas
P132	7,04	8,72	9,30	5,80
P132-10	4,22	4,48	4,49	1,24
P132-100	3,18	4,28	4,70	3,35
A132	2,79	2,91	2,03	4,30
A132-10	3,31	1,62	2,11	2,71
A132-100	2,06	1,92	1,02	1,47
G132	0,87	0,40	0,32	0,44
G132-10	1,38	1,04	0,63	0,07
G132-100	2,21	2,56	2,34	0,12
WS132	1,59	1,47	1,07	0,99
WS132-10	1,92	1,18	0,73	0,23
WS132-100	2,90	3,69	3,39	0,27
Muestra A	2,21	2,35	3,39	2,98

## 5 Ejemplo de referencia 29 - Ensayo de celulasa

## Resumen

Se ensayó en 13 muestras la susceptibilidad a la celulasa usando una celulasa industrial (Accellerase® 1000, Genencor) en condiciones óptimas de temperatura y pH.

## Protocolo

- 10 El protocolo es una modificación del NREL "Laboratory Analytical Procedure LAP-009 *Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass*". Se añadió una muestra de material a 10 ml de tampón de citrato sódico 0,1 M (pH 4,8) y tetraciclina 40 mg/ml (para prevenir el crecimiento de bacterias) en un tubo de 50 ml por duplicado. La cantidad de muestra añadida a cada tubo se cita en la tabla 50. Algunas muestras eran difíciles de mezclar (P132, P132-10, P132-100), por lo tanto se añadieron a una menor concentración. También se incluyeron un control positivo de 0,2
- 15 gramos de celulosa en polvo SolkaFloc 200 NF (lote nº UA158072, International Fiber Corporation) y un control negativo (sin muestra). Se añadió a los tubos suficiente agua de ósmosis inversa (RO) para llevar el volumen a un total de 20 ml. Tanto el tampón de citrato sódico como el agua se calentaron a 50°C antes de usar.

- 20 La enzima Accellerase® 1000 se añadió a cada tubo con una dosis de 0,25 ml por gramo de biomasa (la dosis más alta recomendada por Genencor). Los tubos se incubaron en un ángulo de 45° a 150 rpm y 50°C (recomendado por Genencor) durante 72 horas. Las muestras se tomaron a las 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48 y 72 horas (tablas 52 y 53), se centrifugaron a 14.000 rpm durante 20 min y el líquido sobrenadante se congeló a -20°C. La concentración de glucosa en las muestras se analizó usando el analizador bioquímico YSI (Interscience) usando las condiciones descritas en la tabla 51. Se preparó un patrón de glucosa de 2,5 g/l disolviendo 2,500 gramos de glucosa (Sigma nº de cat. G7528-5KG, Lote nº: 107H0245) en agua destilada. Una vez disuelta, el volumen total se llevó a 1 litro con



agua destilada en un matraz aforado. El patrón se preparó de nuevo cada semana y se almacenó a 4°C.

Tabla 50. Cantidad de cada muestra añadida

Número Xyleco	Cantidad añadida al tubo (g/20 ml)
P132	0,5
P132-10	0,5
P132-100	0,5
A132	0,75
A132-10	0,75
A132-100	0,75
G132	0,75
G132-10	0,75
G132-100	0,75
WS132	0,75
WS132-10	0,75
WS132-100	0,75
Muestra A	0,75
SolkaFloc 200NF (Control)	0,2
Control negativo	0

Tabla 51. Componentes YSI usados en el estudio de matraz agitado

Componente	Catálogo nº	Lote nº
Membrana para glucosa YSI	2365	07D100124
Tampón para glucosa YSI	2357	014614A

5

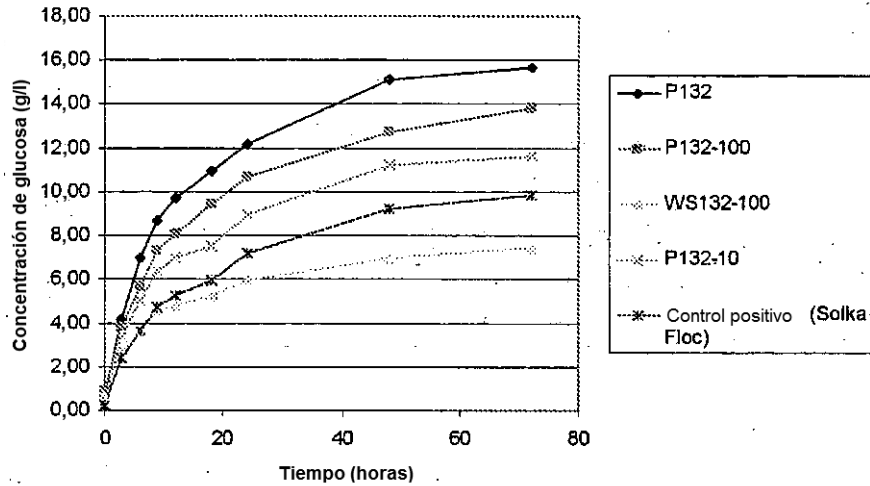
## Resultados

Tabla 52. Resultados de ensayo de la celulasa

Número de muestra	Concentración de glucosa (mg/ml) en los tiempos de incubación (horas)								
	0	3	6	9	12	18	24	48	72
<b>P132</b>	0,59	4,19	7,00	8,72	9,70	10,95	12,19	15,10	15,65
<b>P132-10</b>	0,36	3,37	5,08	6,39	6,98	7,51	8,99	11,25	11,65
<b>P132-100</b>	0,91	3,86	5,67	7,31	8,08	9,47	10,70	12,70	13,80
<b>A132</b>	0,39	1,51	1,92	2,40	2,64	3,04	3,30	3,90	4,06
<b>A132-10</b>	0,42	1,80	2,27	2,63	2,86	3,16	3,43	4,02	4,14
<b>A132-100</b>	0,46	2,09	2,72	3,16	3,43	3,78	4,09	4,84	5,26
<b>G132</b>	0,40	1,16	1,35	1,52	1,60	1,67	1,85	2,10	2,21
<b>G132-10</b>	0,34	1,34	1,64	1,95	2,03	2,09	2,36	2,77	3,02
<b>G132-100</b>	0,61	1,84	2,32	2,89	3,14	3,52	3,97	4,81	5,44
<b>WS132</b>	0,35	1,48	1,81	2,14	2,26	2,50	2,70	3,18	3,26

<b>WS132-10</b>	0,44	1,77	2,22	2,60	2,76	2,6-1	3,15	3,62	3,82
<b>WS132-100</b>	0,70	2,76	3,63	4,59	4,78	5,29	5,96	6,99	7,43
<b>Muestra A</b>	0,42	1,09	1,34	1,55	1,69	1,66	2,17	2,96	3,71
<b>Control negativo (sin muestra)</b>	0,03	0,03	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02
<b>Control positivo (SolkaFloc)</b>	0,17	2,38	3,65	4,71	5,25	5,98	7,19	9,26	9,86

Gráfica 1. Concentración de glucosa (Los 4 productores superiores)



La cantidad de celulosa digerida en el tubo se calculó como sigue:

- 5  $\text{g/ml de glucosa} \times 20 \text{ ml (volumen de muestra)} \times 0,9$  (para corregir para la molécula de agua añadida tras la hidrólisis de celulosa)

El porcentaje de muestra total liberada como glucosa (en la tabla 53 a continuación) se calculó como sigue:

$$\text{g de celulosa digeridos/g de muestra añadida (véase la tabla 5 para detalles)} \times 100$$

Tabla 53. Resultados del ensayo de celulasa

Número de muestra	Porcentaje de la muestra total liberada como glucosa (%) en el tiempo de incubación (h)								
	0	3	6	9	12	18	24	48	72
<b>P132</b>	2,02	14,98	25,16	31,36	34,85	39,38	43,81	54,29	56,27
<b>P132-10</b>	1,19	12,02	18,25	22,97	25,06	27,00	32,29	40,43	41,87
<b>P132-100</b>	3,17	13,79	20,38	26,28	29,02	34,06	38,45	45,65	49,61
<b>A132</b>	0,86	3,55	4,58	5,74	6,29	7,27	7,87	9,31	9,70
<b>A132-10</b>	0,94	4,25	5,42	6,29	6,82	7,56	8,18	9,60	9,89
<b>A132-100</b>	1,03	4,94	6,50	7,56	8,18	9,05	9,77	11,57	12,58
<b>G132</b>	0,89	2,71	3,22	3,62	3,79	3,98	4,39	4,99	5,26
<b>G132-10</b>	0,74	3,14	3,91	4,66	4,82	4,99	5,62	6,60	7,20
<b>G132-100</b>	1,39	4,34	5,54	6,91	7,49	8,42	9,48	11,50	13,01
<b>WS132</b>	0,77	3,48	4,32	5,11	5,38	5,98	6,43	7,58	7,78
<b>WS132-10</b>	0,98	4,18	5,30	6,22	6,58	6,24	7,51	8,64	9,12
<b>WS132-100</b>	1,61	6,55	8,69	10,99	11,42	12,67	14,26	16,73	17,78
<b>Muestra A</b>	0,94	2,54	3,19	3,70	4,01	3,96	5,16	7,06	8,86
<b>Control positivo (SolkaFloc)</b>	1,29	21,15	32,72	42,30	47,07	53,73	64,53	83,16	88,56

Ejemplo 30 - Fermentación en matraces agitados usando *Pichia stipitis*

Resumen

Se llevó a cabo la fermentación en matraces agitados usando *Pichia stipitis* usando 4 materiales celulósicos que tenían el mayor % de rendimiento de la tabla 36.

## 5 Protocolo

Los experimentos se llevaron a cabo bajo los parámetros señalados en las tablas 54-56.

Tabla 54. Equipamiento y frecuencia de mantenimiento

Equipamiento	Fabricante, nombre	Frecuencia de mantenimiento
Agitadores (2)	B. Braun Biotech, Certomat BS-1	Trimestral
Espectrofotómetro	Unicam, UV300	Bianual
Analizador bioquímico YSI	Interscience, YSI	Mensual

Tabla 55. Componentes de YSI usados en el estudio en matraces agitados

Componente	Referencia nº	Lote nº
Membrana para etanol YSI	2786	07M100361
Patrón de etanol YSI (3,2 g/l)	2790	1271040
Tampón para etanol YSI	2787	07J100215

10

Tabla 56. Productos químicos usados para la fermentación en matraces agitados

Componente del medio	Fabricante	Referencia nº	Lote nº
Urea	ScholAR Chemistry	9472706	AD-7284-43
Base nitrogenada de levadura	Becton Dickinson	291940	7128171
Peptona	Becton Dickinson	211677	4303198
Caldo YM	Becton Dickinson	271120	6278265
Xilosa	Alfa Aesar	A10643	10130919
Glucosa	Fisher Scientific	BP350-1	030064

Desarrollo de la siembra

15 Para los siguientes experimentos en matraces agitados, se prepararon los matraces de siembra usando el siguiente procedimiento.

20 Se preparó un banco de células de trabajo de *P. stipitis* NRRL Y-7124 a partir de cultivo liofilizado rehidratado de ARS Culture Collection. Crioviales que contenían cultivo de *P. stipitis* en glicerol al 15% en v/v se almacenaron a -75°C. Una parte del banco de células de trabajo congelado se sembró por estrías en caldo para hongos y levaduras (YM) + agar 20 g/l (pH 5,0) y se incubó a 30°C durante 2 días. Las placas se mantuvieron durante 2 días a 4°C antes de usar. Un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 100 ml de medio (glucosa 40 g/l, base nitrogenada de levadura 1,7 g/l, urea 2,27 g/l, peptona 6,56 g/l, xilosa 40 g/l, pH 5,0) se inoculó con una colonia y se incubó durante 24 horas a 25°C y 100 rpm. Después de 23 horas de crecimiento, se tomó una muestra y se analizó la densidad óptica (600 nm en un espectrofotómetro de UV) y pureza (tinción de Gram). Basándose en estos resultados, se escogió un matraz (llamado el matraz de siembra) con una DO entre 4 y 8 y con una tinción de Gram transparente para inocular todos los matraces de ensayo.

25 Se llevaron a cabo tres experimentos usando las muestras A132-10, A132-100, G132-10 y G132-100. En el experimento nº 1 se ensayó la concentración de etanol en estas cuatro muestras en concentraciones variables de

xilosa y con concentraciones constantes de glucosa. En el experimento n° 2 se ensayó la concentración de etanol en estas cuatro muestras con el doble de concentración de materia prima que la usada en los experimentos de la tabla 36. Finalmente, en el experimento n° 3 se ensayó la concentración de etanol en estas cuatro muestras mientras se variaba tanto la concentración de xilosa como la de glucosa, simultáneamente.

#### 5 Experimento n° 1 - Variación de la concentración de glucosa

Se ensayaron 4 muestras celulósicas (A132-10, A132-100, G132-10 y G132-100) en concentraciones variables de xilosa citadas en la siguiente tabla 57.

Tabla 57. Composición del medio de los matraces del experimento n° 1

Tratamiento	Concentración de xilosa (g/l)	Concentración de glucosa (g/l)
100% de xilosa	40,0	40,0
50% de xilosa	20,0	40,0
25% de xilosa	10,0	40,0
1 % de xilosa	4,0	40,0
0% de xilosa	0,0	40,0

10 Los recipientes de ensayo (un total de 40 matraces Erlenmeyer de 250 ml) contenían 100 ml de medio. Se prepararon 5 tipos diferentes de medio con la cantidad de xilosa y glucosa indicadas en la tabla 57. Además, el medio contenía base nitrogenada de levadura 1,7 g/l (Becton Dickinson n° 291940), urea 2,27 g/l (Scholar Chemistry n° 9472706), y peptona 6,56 g/l (Becton Dickinson n° 211677). Todos los matraces se trataron en autoclave vacíos a 121°C y 1,05 kg/cm<sup>2</sup> (15 psi) y se añadió medio esterilizado por filtración (filtro de 0,22 µm) a los  
15 matraces antes de la adición de los materiales de ensayo. Los matraces se mantuvieron a temperatura ambiente durante 4 días y se inspeccionó la contaminación (turbidez) antes de usar. Los materiales de ensayo no se esterilizaron, ya que el tratamiento en autoclave cambiará el contenido de las muestras y la esterilización por filtración no es adecuada para la esterilización de sólidos. Las muestras de ensayo (A132-10, A132-100, G132-10 y G132-100) se añadieron en el momento de la inoculación (en lugar de antes de) para reducir la posibilidad de  
20 contaminación. Además de las muestras de ensayo, se añadió a cada matraz 1 ml (1% en v/v) de material del matraz de siembra. Los matraces se incubaron a 30°C y 150 rpm durante 72 horas.

Desgraciadamente, un matraz (muestra A132-100 con 100% de xilosa) se rompió durante el ensayo. Por lo tanto, todos los resultados pasadas las 24 horas de incubación se describen como un solo matraz. Después de 72 horas de incubación, se añadió 100% de la cantidad original del material celulósico (5,0 g) a los matraces de xilosa al  
25 100% (7 matraces en total, un matraz que contenía muestra A-132-100 se rompió) y se incubaron como antes durante 48 horas adicionales.

Tabla 58. Adición de materia prima a matraces con xilosa al 100% en el tiempo de incubación de 72 horas

Materia prima	Añadido a las 72 horas (gramos)
A132-10	5
A132-100	5
G132-10	5
G132-100	5

#### Análisis

30 Se tomaron muestras de los 40 matraces de ensayos en los tiempos de incubación de 0, 6, 12, 24, 36, 48 y 72 horas. Además, se tomaron muestras a las 24 y 48 horas después de adición de la segunda cantidad de materia prima en los matraces de xilosa al 100% (véase la tabla 58).

Se analizó en un total de 292 muestras la concentración de etanol usando un analizador bioquímico YSI basado en el ensayo de la alcohol deshidrogenasa (YSI, Interscience). Las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 20  
35 min y el líquido sobrenadante se almacenó a -20°C. Hay que indicar que en el tiempo 0 las muestras necesitaron

filtración a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm. Las muestras se diluyeron a entre 0-3,2 g/l de etanol antes del análisis. Se analizó un patrón de etanol 2,0 g/l aproximadamente cada 30 muestras para asegurar que se mantenía la integridad de la membrana.

- 5 Se analizó en un total de 47 muestras el recuento celular. Las muestras se tomaron a las 72 horas de incubación y 48 horas después de la adición de más material celulósico. Las muestras diluidas de forma adecuada se mezclaron con azul de Trypan al 0,05% y se cargaron en un hemocitómetro Neubauer. El recuento de las células se hizo con 40 X aumentos.

Experimento nº 2 - Análisis de 2 x concentración de materia prima

- 10 Los recipientes de ensayo (un total de 8 matraces Erlenmeyer de 250 ml) contenían 100 ml de medio. El medio contenía glucosa 40 g/l, xilosa 40 g/l, base nitrogenada de levadura 1,7 g/l (Becton Dickinson nº 291940), urea 2,27 g/l (Scholar Chemistry nº 9472706), y peptona 6,56 g/l (Becton Dickinson nº 211677). Los matraces se prepararon como en el experimento nº 1. Las muestras de ensayo (A132-10, A132-100, G132-10 y G132-100, con 10 g por 100 ml) se añadieron en el momento de la inoculación (en lugar de antes de) para reducir la posibilidad de contaminación. Además de las muestras de ensayo, se añadió a cada matraz 1 ml (1% en v/v) de material del matraz de siembra. Los matraces se incubaron a 30°C y 150 rpm durante 72 horas.

Análisis

Las muestras eran de los 8 matraces de ensayo a un tiempo de incubación de 0, 6, 12, 24, 36, 48 y 72 horas. El análisis de etanol de las 56 muestras se llevó a cabo como para el experimento nº 1 y se dan en la tabla 59. Se llevó a cabo un recuento celular en la muestra de 72 horas como para el experimento nº 1 y se presenta en la tabla 60.

- 20 Tabla 59. Concentración de etanol en los matraces con doble de materia prima

Tiempo de la muestra	Concentración de etanol (g/l)			
	A132-10	A132-100	G132-10	G132-100
0	1,38	0,26	0,12	0,11
6	1,75	0,21	0,20	0,10
12	2,16	0,73	0,69	0,31
24	19,05	15,35	16,55	12,60
36	21,75	17,55	18,00	15,30
48	26,35	23,95	24,65	20,65
72	26,95	27,35	28,90	27,40

Tabla 60. Concentración celular a las 72 horas de tiempo de incubación en matraces con doble de materia prima

Muestra	Concentración celular (x 10 <sup>8</sup> /ml)
A132-10	4,06
A132-100	5,37
G132-10	5,18
G132-100	4,47

Experimento nº 3 - Variación de las concentraciones de glucosa y xilosa

- 25 Se ensayaron 4 muestras celulósicas (A132-10, A132-100, G132-10 y G132-100) con concentraciones variables de xilosa y glucosa como se indica en la siguiente tabla (tabla 60).

Tabla 61. Composición del medio de los matraces del experimento nº 3

Tratamiento	Concentración de xilosa (g/l)	Concentración de glucosa (g/l)
50% de azúcar	20,0	20,0
25% de azúcar	10,0	10,0
10% de azúcar	4,0	4,0
0% de azúcar	0,0	0

5 Los recipientes de ensayo (un total de 32 matraces Erlenmeyer de 250 ml) contenían 100 ml de medio. Se prepararon 4 tipos diferentes de medio con la cantidad de xilosa y glucosa indicada en la tabla 61. Además, el medio contenía base nitrogenada de levadura 1,7 g/l (Becton Dickinson nº 291940), urea 2,27 g/l (Scholar Chemistry nº 9472706), y peptona 6,56 g/l (Becton Dickinson nº 211677). Los matraces se prepararon como en el experimento nº 1. Las muestras de ensayo (A132-10, A132-100, G132-10 y G132-100) se añadieron en el momento de la inoculación (en lugar de antes de) para reducir la posibilidad de contaminación. Además de las muestras de ensayo, se añadió a cada matraz 1 ml (1% en v/v) de material del matraz de siembra. Los matraces se incubaron a 30°C y 150 rpm durante 72 horas.

10 Análisis

15 Las muestras se tomaron de los 32 matraces de ensayo en un tiempo de incubación de 0, 6, 12, 24, 36, 48 y 72 horas (véase las tablas 62-65). Se analizó en un total de 224 muestras la concentración de etanol usando un analizador bioquímico YSI basado en el ensayo de la alcohol deshidrogenasa (YSI, Interscience). Las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 20 min y el líquido sobrenadante se almacenó a -20°C. Hay que indicar que algunas de las muestras necesitaron centrifugación y filtración a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm. Las muestras se diluyeron a entre 0-3,2 g/l de etanol antes del análisis. Se analizó un patrón de etanol de 2,0 g/l aproximadamente cada 30 muestras para asegurar que se mantenía la integridad de la membrana YSI.

Tabla 62. Resultados de etanol de la muestra A-132-10

Tiempo de la muestra	Concentración de etanol (g/l)								
	0% Xilosa	10% Xilosa	25% Xilosa	50% Xilosa	100% Xilosa	0% Azúcares*	10% Azúcares*	25% Azúcares*	50% Azúcares*
0	0,43	0,42	0,42	0,41	0,39	0,53	0,57	0,56	0,56
6	1,16	1,16	1,15	1,16	1,12	0,93	0,91	0,83	0,88
12	1,72	1,86	1,71	1,79	1,90	1,21	2,13	2,47	2,32
24	15,55	15,90	17,05	17,05	16,95	1,02	4,88	9,77	13,35
36	17,10	17,40	20,25	21,35	20,25	1,29	4,27	9,99	17,55
48	16,40	17,05	19,70	23,00	26,80	1,47	3,03	8,33	16,60
72	15,15	15,55	19,25	21,85	28,00	1,14	1,52	5,08	14,20
24 horas después de adición	--	--	--	--	23,15	--	--	--	--
48 horas después de adición	--	--	--	--	21,55	--	--	--	--

20 \*Análisis del experimento nº 3

Tabla 63. Resultados de etanol de la muestra A-132-100

Tiempo de la muestra	Concentración de etanol (g/l)								
	0% Xilosa	10% Xilosa	25% Xilosa	50% Xilosa	100% Xilosa	0% Azúcares*	10% Azúcares*	25% Azúcares*	50% Azúcares*
0	0,11	0,09	0,17	0,20	0,18	0,12	0,14	0,09	0,13
6	0,13	0,15	0,15	0,15	0,14	0,10	0,11	0,11	0,13
12	0,88	1,00	1,18	1,25	0,89	0,18	1,58	1,55	1,57
24	15,90	15,70	16,50	16,05	14,60**	0,18	3,33	7,99	11,15
36	16,00	17,90	16,90	19,45	17,80**	0,21	2,85	8,37	16,10
48	15,75	16,70	19,30	22,15	27,00**	0,54	1,47	7,54	15,60
72	14,85	15,35	18,55	21,30	28,50**	0,78	0,51	4,47	12,90
24 horas después de adición	--	--	--	--	24,80**	--	--	--	--
48 horas después de adición	--	--	--	--	23,60**	--	--	--	--

\*Análisis del experimento nº 3

\*\*Todos los resultados basados en el análisis de un matraz

5 Tabla 64. Resultados de etanol de la muestra G132-10

Tiempo de la muestra	Concentración de etanol (g/l)								
	0% Xilosa	10% Xilosa	25% Xilosa	50% Xilosa	100% Xilosa	0% Azúcares*	10% Azúcares*	25% Azúcares*	50% Azúcares*
0	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,05	0,05	0,05	0,06
6	0,14	0,13	0,14	0,14	0,13	0,11	0,12	0,11	0,12
12	1,01	0,96	1,00	0,87	1,14	0,48	1,60	1,79	1,71
24	15,90	15,70	16,30	16,05	14,60	0,13	3,96	8,54	11,10
36	15,10	17,45	16,80	18,75	22,15	0,09	3,02	8,69	16,55
48	15,95	16,90	19,25	21,10	24,00	0,07	2,05	8,10	16,50
72	13,50	15,80	18,55	21,25	26,55	0,09	0,11	5,55	14,15
24 horas después de adición	--	--	--	--	24,95	--	--	--	--
48 horas después de adición	--	--	--	--	24,20	--	--	--	--

\*Análisis del experimento nº 3

Tabla 65. Resultados de etanol de la muestra G132-100

Tiempo de la muestra	Concentración de etanol (g/l)								
	0 % Xilosa	10 % p/v Xilosa	25 % p/v Xilosa	50 % p/v Xilosa	100 % p/v Xilosa	0 % Azúcares*	10 % Azúcares*	25 % Azúcares*	50 % Azúcares
0	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06
6	0,07	0,07	0,08	0,08	0,07	0,04	0,05	0,05	0,06
12	0,60	0,56	0,67	0,58	0,71	0,13	1,37	1,48	1,44
24	13,05	14,45	14,90	13,95	12,05	0,03	3,67	7,62	10,5
36	15,10	17,10	18,25	18,20	19,25	0,01	3,09	8,73	16,1
48	14,40	17,00	19,35	22,55	24,45	0,01	1,91	7,76	15,8
72	14,70	15,40	18,45	22,10	27,55	0,03	0,01	5,08	14,3
24 horas después de adición	--	--	--	--	25,20	--	--	--	--
48 horas después de adición	--	--	--	--	24,60	--	--	--	--

\*Análisis del experimento nº 3

5 Las muestras se tomaron a las 72 horas de incubación para los recuentos celulares (véase las tablas 66-67). Las muestras diluidas de forma adecuada se mezclaron con azul de Trypan al 0,05% y se cargaron en un hemocitómetro Neubauer. El recuento de las células se hizo con 40 X aumentos.

Resultados

10 Un matraz de siembra se usó para inocular todos los matraces de ensayo del experimento nº 1 y nº 2. La densidad óptica (600 nm) del matraz de siembra medida era 5,14 y la concentración celular era  $4,65 \times 10^8$  células/ml (tablas 65-66). Por lo tanto, la concentración inicial de las células en los matraces de ensayo era aproximadamente  $4,65 \times 10^6$  células/ml.

Un segundo matraz de siembra se usó para inocular los matraces del experimento nº 3. La densidad óptica (600 nm) del matraz de siembra era 5,78 y la concentración celular era  $3,75 \times 10^8$  células/ml. Por lo tanto, la concentración inicial de las células en los matraces de ensayo era aproximadamente  $3,75 \times 10^6$  células/ml.

15 Tabla 66. Recuentos celulares en el tiempo de incubación de 72 horas

Muestra	Concentración celular ( x 10 <sup>8</sup> /ml)								
	0% xilosa	10% xilosa	25% xilosa	50% xilosa	100% xilosa	0% azúcar	10% azúcar	25% azúcar	50% azúcar
A132-10	0,37	0,63	3,72	4,92	4,05	0,26	0,22	0,26	1,54
A132-100	0,99	1,07	0,99	0,78	1,97	0,03*	0,33	0,44	1,81
G132-10	0,95	4,50	2,67	2,67	3,82	0,01*	0,17	0,49	1,92
G132-100	6,53	4,02	4,84	4,47	5,29	0,01*	0,33	0,89	2,22

\*Las muestras estaban muy contaminadas después de 72 horas de crecimiento. Esto se espera porque *Pichia* no crecía bien sin azúcar añadido, y los contaminantes (de las muestras no estériles) son capaces de crecer más que *Pichia*.

20 Tabla 67. Recuentos celulares en el tiempo de incubación de 48 horas después de adición (100% de xilosa y glucosa)

Muestra	Concentración celular ( x 10 <sup>8</sup> /ml)
A132-10	10,17
A132-1 GO	3,38
G132-10	3,94
G132-100	6,53



Ejemplo 31 - Ensayo de toxicidad de muestras lignocelulósicas contra *P. stipitis* y *S. cerevisiae*

Resumen

Se analizó en 37 muestras la toxicidad contra dos cultivos productores de etanol, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis*. En este estudio, se añadió glucosa a las muestras con el fin de distinguir entre la inanición de los cultivos y la toxicidad de las muestras.

5

Tabla 68. Condiciones para el ensayo de toxicidad

Variable	Organismo	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 24858	<i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124
Volumen de inoculación (ml)	0,5-1 (objetivo 6-7 x10 <sup>5</sup> células/ml)	1 (objetivo 3-4 x10 <sup>6</sup> células/ml)
Repetición del ensayo	Matraces individuales	
Temperatura de incubación (± 1 °C)	25°C	25°C
Velocidad del agitador (rpm)	200	125
Tipo de recipiente	Matraz Erlenmeyer de 500 ml	Matraz Erlenmeyer de 250 ml
Volumen de medio	100 ml	100 ml
Tiempo de incubación total (horas)	72	72
Análisis de etanol (horas)	0, 6, 12, 24, 36, 48, 72	0, 6, 12, 24, 36, 48, 72
Recuentos celulares (horas)	24, 72	24, 72
pH	0 horas	0 horas

Protocolo

Se indica un resumen del protocolo usado en la tabla 68. Se indica una descripción de los productos químicos usados en el ensayo de toxicidad en la tabla 69. Se realizaron dos matraces de control (sin muestra añadida) para cada microorganismo para cada semana de ensayo. Se analizaron un total de 82 matraces.

10

Durante los experimentos, no apareció etanol ni células en los matraces de *P. stipitis* que contenían las muestras C, C-1e, C-5e, y C-10e en las primeras 24 horas de incubación. Con el fin de confirmar los resultados, se repitió el ensayo. El segundo ensayo confirmó algo de inhibición del crecimiento de *P. stipitis* cuando las muestras C, C1E, C5E, y C10E se añadieron a los matraces.

15

Tabla 69. Productos químicos y materiales usados para el ensayo de toxicidad

Componente del medio	Fabricante	Referencia n°	Lote n°
Urea	ScholAR Chemistry	9472706	AD-7284-43
Base nitrogenada de levadura	Becton Dickinson	291940	7128171
Peptona	Becton Dickinson	211677	4303198
Xilosa	Alfa Aesar	A10643	10130919
Glucosa	Sigma	G-5400	107H0245
Extracto de levadura	Becton Dickinson	288620	4026828
Caldo YM	Becton Dickinson	271120	6278265

Tabla 70. Componentes YSI usados en el estudio de toxicidad

Componente	Catálogo nº
Membrana para etanol YSI	2786
Patrón de etanol YSI (3,2 g/l)	2790
Tampón de etanol YSI	2787

## Muestras de ensayo

5 Siete muestras de ensayo (todas con la designación C) se molieron usando un molinillo de café para muestras pequeñas. Las muestras se molieron hasta un tamaño de partículas uniforme (entre muestras) a simple vista. La muestra número C-100e se molió fácilmente a un tamaño de partículas pequeño.

10 Todas las muestras se añadieron a los matraces en una concentración de 50 gramos por litro con la excepción de las seis muestras P (25 gramos por litro). Estas muestras eran de color blanco a blanquecino y visualmente esponjosas y los matraces no se mezclaban adecuadamente (no hay suficiente líquido libre) en la concentración de 50 gramos por litro. Las muestras S se disolvieron fácilmente y en el futuro se podrían añadir a los matraces en una concentración mayor. Las muestras A y G se podrían añadir con 100 gramos por litro en el futuro.

Se llevaron a cabo ensayos usando los dos microorganismos como se describe a continuación.

*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858 (American Type Culture Collection)

15 Se preparó un banco de células de trabajo de *S. cerevisiae* ATCC 24858 a partir de un cultivo liofilizado rehidrato obtenido de la American Type Culture Collection. Crioviales que contienen cultivo de *S. cerevisiae* en glicerol al 15% en v/v se almacenan a -75°C. Una parte del material del banco de trabajo congelado se sembrará en estrías sobre un caldo para hongos (YM) + agar 20 g/l (pH 5,0) y se incubará a 30°C durante 2 días. Un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 50 ml de medio (glucosa 20 g/l, extracto de levadura 3 g/l y peptona 5,0 g/l, pH 5,0) se inoculó con una colonia de la placa de YM y se incubó durante 24 horas a 25°C y 200 rpm. Después de 23 horas de crecimiento,

20 se tomó una muestra y se analizó la densidad óptica (600 nm en un espectrofotómetro de UV) y pureza (tinción de Gram). Basándose en estos resultados, se escogió un matraz (llamado el matraz de siembra) con una DO de 9-15 y tinción de Gram transparente para inocular todos los matraces de ensayo. Después de 23 horas de cultivo, el matraz de siembra tenía una DO baja (5,14) y recuento celular ( $1,35 \times 10^8$  células/ml). Hay que indicar que la colonia tomada de la placa de siembra era menor de la habitual. Por lo tanto, se añadieron 0,5 ml de material de siembra

25 (contrariamente a lo planeado de 0,1 ml) a cada recipiente de ensayo.

Los recipientes de ensayo eran matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían 100 ml de medio estéril descrito antes. Todos los matraces se trataron en autoclave a 121°C y 1,05 kg/cm<sup>2</sup> (15 psi) antes de la adición de los materiales de ensayo. Los materiales de ensayo no se esterilizaron, ya que el tratamiento en autoclave cambiará el contenido de las muestras. Las muestras de ensayo se añadieron en el momento de la inoculación (en lugar de

30 antes de) para reducir la posibilidad de contaminación. Además de las muestras de ensayo, se añadieron a cada matraz 0,5-1,0 ml (0,5-1,0% en v/v) de material del matraz de siembra. Los matraces se incubaron como se ha descrito antes durante 72 horas.

*Pichia stipitis* (ARS Culture Collection)

35 Se preparó un banco de células de trabajo de *P. stipitis* NRRL Y-7124 a partir de cultivo liofilizado rehidratado de ARS Culture Collection. Crioviales que contenían cultivo de *P. stipitis* en glicerol al 15% en v/v se almacenan a -75°C. Una parte del banco de células de trabajo congelado se sembró por estrías en caldo para hongos (YM) + agar 20 g/l (pH 5,0) y se incubó a 30°C durante 2 días. Las placas se mantuvieron durante 5 días a 4°C antes de usar. Un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 100 ml de medio (glucosa 40 g/l, base nitrogenada de levadura 1,7 g/l, urea 2,27 g/l, peptona 6,56 g/l, xilosa 40 g/l, pH 5,0) se inoculó con una colonia y se incubó durante 24 horas

40 a 25°C y 125 rpm. Después de 23 horas de crecimiento, se tomó una muestra y se analizó la densidad óptica (600 nm en un espectrofotómetro de UV) y pureza (tinción de Gram). Basándose en estos resultados, se escogió un matraz (llamado el matraz de siembra) con una DO de 5-9 y con una tinción de Gram transparente para inocular todos los matraces de ensayo.

45 Los recipientes de ensayo eran matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 100 ml de medio estéril descrito antes. Todos los matraces se trataron en autoclave vacíos a 121°C y 1,05 kg/cm<sup>2</sup> (15 psi) y se añadió medio esterilizado por filtración (filtro de 0,22 µm) a los matraces antes de la adición de los materiales de ensayo. Los materiales de ensayo no se esterilizaron, ya que el tratamiento en autoclave cambiará el contenido de las muestras y la esterilización por filtración no es adecuada para la esterilización de sólidos. Las muestras de ensayo se añadieron en el momento de la inoculación (en lugar de antes de) para reducir la posibilidad de contaminación. Además de las

50 muestras de ensayo, se añadió a cada matraz 1 ml (1% en v/v) de material del matraz de siembra. Los matraces se

incubaron como se ha descrito antes durante 72 horas.

#### Análisis

5 Se tomaron muestras de los matraces de siembra justo antes de inoculación y de cada matraz de muestra a las 24 y 72 horas y se analizó la concentración celular usando recuentos directos. Muestras adecuadamente diluidas de *S. cerevisiae* y *P. stipitis* se mezclaron con azul de Trypan al 0,05%, se cargaron en un hemocitómetro Neubauer. Las células se contaron con 40 X aumentos.

10 Se tomaron muestras de cada matraz a las 0, 6, 12, 24, 36, 48 y 72 horas y se analizó la concentración de etanol usando un analizador bioquímico YSI basado en el ensayo de la alcohol deshidrogenasa (YSI, Interscience). Las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 20 min y el líquido sobrenadante se almacenó a -20°C. Las muestras se diluyeron a 0-3,2 g/l de etanol antes del análisis. Se analizó un patrón de etanol de 2,0 g/l aproximadamente cada 30 muestras para asegurar que se mantenía la integridad de la membrana durante el análisis.

#### Cálculos

15 Se usaron los siguientes cálculos para comparar los recuentos celulares y la concentración de etanol con los matraces de control.

$$\% \text{ de rendimiento} = (\text{concentración de etanol en el matraz de ensayo/etanol en el control}) * 100\%$$

$$\text{células} = (\text{número de células en el matraz de ensayo/número de células en el matraz de control}) * 100$$

#### Resultados

20 El matraz de siembra de *S. cerevisiae* tenía una densidad óptica (600 nm) de 5,14 y una concentración celular de  $1,35 \times 10^8$  células/ml. Una mitad del material del matraz de siembra se añadió a cada uno de los matraces de ensayo. Por lo tanto, la concentración celular de partida en cada matraz era  $6,75 \times 10^5$ /ml. Durante la segunda semana de ensayo, el matraz de siembra de *S. cerevisiae* tenía una densidad óptica (600 nm) de 4,87 y una concentración celular de  $3,15 \times 10^7$  células/ml. Se añadió 1 ml del material del matraz de siembra a cada uno de los matraces de ensayo. Por lo tanto, la concentración celular inicial en cada matraz era  $6,30 \times 10^5$ /ml. El pH de los matraces de siembra de *S. cerevisiae* en el tiempo de toma de muestra de 0 horas se presenta en la tabla 71. El pH del contenido de los matraces está dentro del pH óptimo para el crecimiento de *S. cerevisiae* (pH 4-6). No se requería ajuste del pH.

Tabla 71. pH de los matraces de *S. cerevisiae* en el tiempo de toma de muestra de 0 horas

Número de muestra	PH	Número de muestra	PH
P	5,04	C	5,46
P1E	4,99	C1E	5,54
P5E	5,04	C5E	5,50
P10E	4,98	C10E	5,33
P50E	4,67	C30E	5,12
P100E	4,43	C50E	4,90
G	5,45	C100E	4,66
G1E	5,47	ST	5,11
G5E	5,46	ST1E	5,06
G10E	5,39	ST5E	4,96
G50E	5,07	ST10E	4,94
A	5,72	ST30E	5,68
A1E	5,69	ST50E	4,48
A5E	5,62	ST100E	4,23
A10E	5,61	control A	5,02
A50E	5,74	control B	5,04
S*	5,10		
S1E	5,08		
S5E	5,07		
S10E	5,04		
S30E	4,84		
S50E	4,57		
S100E	4,33		

\*\*S" se refiere a sacarosa

\*\*C" se refiere a maíz

\*\*ST" se refiere a almidón

5

La concentración de etanol y el rendimiento en los matraces de *S. cerevisiae* se presentan en las tablas 72 y 73. Las mayores concentraciones de etanol fueron producidas por la serie S.

Tabla 72. Concentraciones de etanol en matraces de *S. cerevisiae*

Número de muestra	Concentración de etanol (g/l) a los siguientes tiempos (horas)						
	0	6	12	24	36	48	72
P	0,02	0,04	0,38	5,87	7,86	5,41	1,04
P1E	0,03	0,03	0,28	5,10	8,03	5,46	0,58
P5E	0,03	0,04	0,57	8,84	6,38	3,40	0,04
P10E	0,06	0,05	0,65	6,63	7,66	5,57	1,40
P50E	0,04	0,03	0,26	2,80	5,85	8,59	5,68
P100E	0,04	0,02	0,12	3,64	8,26	7,51	3,03
G	0,04	0,04	0,57	10,20	8,24	6,66	2,84
G1E	0,04	0,05	0,46	10,20	9,24	6,94	2,84
G5E	0,11	0,11	0,44	10,00	8,7	6,36	0,88
G10E	0,05	0,04	0,40	9,97	8,41	5,79	0,11
G50E	0,05	0,05	0,48	9,72	8,33	6,13	2,38
A	0,29	0,38	0,48	8,43	8,76	7,09	4,66
A1E	0,34	0,44	0,79	9,66	8,9	7,18	2,64
A5E	0,55	0,45	0,99	9,44	8,96	7,56	3,80
A10E	0,55	0,55	0,93	9,58	8,33	6,28	1,40
A50E	0,22	0,08	0,38	9,38	8,01	5,99	0,98
S	0,03	0,03	0,39	5,73	7,06	10,10	15,90
S1E	0,05	0,06	0,31	7,24	9,52	12,10	14,90
S5E	0,02	0,05	0,34	5,87	7,68	11,90	19,00
S10E	0,03	0,04	0,35	5,88	7,72	11,50	19,30
S30E	0,03	0,05	0,09	5,94	7,97	11,20	20,40
S50E*	0,13	0,19	0,47	5,46	7,96	13,00	18,30
S100E	0,11	0,10	0,21	7,00	10,6	13,80	12,70
C	0,01	0,04	0,32	8,47	7,57	5,48	6,40
C1E	0,00	0,06	0,37	8,93	7,86	5,99	1,37
C5E	0,03	0,05	0,48	9,32	7,92	5,69	1,41
C10E	0,02	0,04	0,52	9,14	7,67	5,34	0,35
C30E	0,02	0,05	0,28	9,15	8,15	5,84	2,47
C50E	0,03	0,06	0,44	9,31	7,79	5,78	1,79
C100E	0,03	0,06	0,58	9,06	6,85	5,95	1,09
ST	0,02	0,05	0,99	8,54	6,69	5,09	0,42
ST1E	0,03	0,04	0,70	8,87	7,29	4,81	1,04
ST5E	0,02	0,04	0,52	8,61	7,16	4,97	0,85
ST10E	0,02	0,05	0,33	8,97	7,05	5,26	0,68
ST30E	0,03	0,04	0,71	8,47	6,96	4,89	0,21
ST50E	0,04	0,07	0,34	8,46	8,19	7,04	3,20
ST100E	0,03	0,10	0,30	9,30	8,62	7,29	4,23
Control A	0,01	0,07	0,85	5,92	8,18	7,81	6,26
Control B	0,01	0,04	0,27	4,86	6,43	8,01	6,75
Control A*	0,04	0,21	1,36	5,19	7,31	7,55	5,16
Control B*	0,03	0,20	1,18	5,16	5,96	7,62	5,32

\*analizado la semana 2

Véase la tabla 72 para la clave del número de muestra

Tabla 73. Rendimiento en matraces de *S. cerevisiae*

Número de muestra	Rendimiento (%) a los siguientes tiempos (horas)			
	24	36	48	72
P	108,9	107,6	68,4	16,0
P1E	94,6	109,9	69,0	8,9
P5E	164,0	87,3	43,0	0,6
P10E	123,0	104,9	70,4	21,5
P50E	51,9	80,1	108,6	87,3
P100E	67,5	113,1	94,9	46,5
G	189,2	112,8	84,2	43,6
G1E	189,2	126,5	87,7	43,6
G5E	185,5	119,1	80,4	13,5
G10E	185,0	115,1	73,2	1,7
G50E	180,3	114,0	77,5	36,6
A	156,4	119,9	89,6	71,6
A1E	179,2	121,8	90,8	40,6
A5E	175,1	122,7	95,6	58,4
A10E	177,7	114,0	79,4	21,5
A50E	174,0	109,7	75,7	15,1
S	106,3	96,6	127,7	244,2
S1E	134,3	130,3	153,0	228,9
S5E	108,9	105,1	150,4	291,9
S10E	109,1	105,7	145,4	296,5
S30E	110,2	109,1	141,6	313,4
S50E*	105,5	119,9	171,3	349,2
S100E	129,9	145,1	174,5	195,1
C	157,1	103,6	69,3	98,3
C1E	165,7	107,6	75,7	21,0
C5E	172,9	108,4	71,9	21,7
C10E	169,6	105,0	67,5	5,4
C30E	169,8	111,6	73,8	37,9
C50E	172,7	106,6	73,1	27,5
C100E	168,1	93,8	75,2	16,7
ST	158,4	91,6	64,3	6,5
ST1E	164,6	99,8	60,8	16,0
ST5E	159,7	98,0	62,8	13,1
ST10E	166,4	96,5	66,5	10,4
ST30E	157,1	95,3	61,8	3,2
ST50E	157,0	112,1	89,0	49,2
ST100E	172,5	118,0	92,2	65,0
Control A	109,8	112,0	98,7	96,2
Control B	90,2	88,0	101,3	103,7
Control A*	100,3	110,1	99,5	98,5
Control B*	99,7	89,8	100,4	101,5

\*analizado la semana 2

5 La concentración celular y el % de células en los matraces de *S. cerevisiae* se presentan en la tabla 74. Se observaron recuentos de células altos en todos los matraces; sin embargo, no parecía que todas las células estuvieran haciendo etanol.

Tabla 74. Recuentos celulares y % de células de *S. cerevisiae*

Número de muestra	Recuento de células (células x 10 <sup>8</sup> /ml)		% de células (recuento/recuento del control)*100	
	24 horas	72 horas	24 horas	72 horas
P	0,62	0,96	97,7	139,0
P1E	0,35	1,18	54,1	170,9
P5E	1,13	1,93	177,3	279,5
P10E	0,59	1,42	91,8	205,6
P50E	0,32	1,40	49,4	202,8
P100E	0,45	1,94	70,6	281,0
G	0,74	3,48	116,5	504,0
G1E	0,68	3,65	107,1	528,6
G5E	0,62	3,87	96,5	560,5
G10E	0,70	2,73	109,5	395,4
G50E	0,46	2,10	71,8	304,1
A	0,55	3,53	86,0	511,2
A1E	0,83	3,45	130,7	499,6
A5E	0,67	3,53	104,8	511,2
A10E	0,53	1,95	83,6	282,4
A50E	0,66	1,62	103,5	234,6
S	0,44	1,11	69,5	160,8
S1E	0,44	1,10	68,2	159,3
S5E	0,23	0,99	36,5	143,4
S10E	0,39	0,73	61,2	105,4
S30E	0,31	0,71	48,3	102,1
S50E*	0,44	0,90	86,5	196,5
S100E	0,53	0,84	82,4	121,7
C	0,45	1,81	70,6	262,1
C1E	0,71	2,40	110,6	347,6
C5E	0,53	2,33	83,6	337,4
C10E	0,77	1,55	120,0	224,5
C30E	0,75	1,80	117,6	260,7
C50E	0,64	1,70	100,1	246,2
C100E	0,81	1,51	127,1	218,7
ST	0,75	1,75	117,6	253,4
ST1E	0,57	1,36	89,4	197,0
ST5E	0,58	1,49	90,7	215,8
ST10E	0,61	1,32	95,4	191,2
ST30E	0,59	0,60	91,8	86,9
ST50E	0,59	1,30	91,8	188,3
ST100E	0,41	1,24	63,5	179,6
Control A	0,81	0,79	127,1	114,1
Control B	0,47	0,59	72,9	85,9
Control A*	0,66	0,42	131,2	91,7
Control B*	0,35	0,50	69,0	108,1

Los matraces de siembra de *P. stipitis* tenían una densidad óptica (600 nm) de 5,01 y una concentración celular de 3,30 x 10<sup>8</sup> células/ml. Se añadió 1 ml del material del matraz de siembra a cada uno de los matraces de ensayo. Por lo tanto, la concentración de células inicial en cada matraz era 3,30 x 10<sup>6</sup>/ml. Durante la segunda semana de ensayo, el matraz de siembra de *P. stipitis* tenía una densidad óptica (600 nm) de 5,45 y una concentración celular de 3,83 x 10<sup>8</sup> células/ml. Se añadió 1 ml del material del matraz de siembra a cada uno de los matraces de ensayo. Por lo tanto, la concentración de células inicial en cada matraz era 3,83 x 10<sup>6</sup>/ml. El pH de los matraces de *P. stipitis* en el tiempo de toma de muestra de 0 horas se presenta en la tabla 75. El pH del contenido de los matraces estaba dentro del pH óptimo para el crecimiento de *P. stipitis* (pH 4-7). No se requería ajuste del pH.

Tabla 75. pH de matraces de *P. stipitis* en el tiempo de toma de muestra de 0 horas

Número de muestra	pH	Número de muestra	pH
P	4,91	C	5,36
P1E	4,87	C1E	5,30
P5E	4,90	C5E	5,29
P10E	4,78	C10E	5,06
P50E	4,46	C30E	4,89
P100E	4,24	C50E	4,70
G	5,45	C100E	4,59
G1E	5,43	ST	4,93
G5E	5,48	ST1E	4,90
G10E	5,32	ST5E	4,81
G50E	4,99	ST10E	4,83
A	5,69	ST30E	4,91
A1E	5,66	ST50E	4,24
A5E	5,60	ST100E	4,07
A10E	5,58	control A	4,93
A50E	5,69	control B	4,91
S	5,00		
S1E	4,94		
S5E	4,86		
S10E	4,78		
S30E	4,51		
S50E	4,27		
S100E	4,08		

5 La concentración de etanol y el rendimiento en los matraces de *P. stipitis* se presentan en las tablas 76 y 77. Las mayores concentraciones de etanol eran de la serie G y A. Los matraces C-30e, C-50e y C-100e también contenían concentraciones altas de etanol. La concentración celular y el % de células en los matraces de *P. stipitis* se presentan en la tabla 78. Se observaron concentraciones celulares bajas en los matraces con la designación S. También se observaron recuentos celulares bajos en los matraces que contenían las muestras C, C1E, C5E y C10E en el tiempo de toma de muestra de 24 horas.

10



Tabla 76. Concentraciones de etanol en matraces de *P. stipitis*

Número de muestra	Concentración de etanol (g/l) a los siguientes tiempos (horas)						
	0	6	12	24	36	48	72
P	0,01	0,05	0,26	4,98	8,57	14,10	17,00
P1E	0,02	0,03	0,04	4,24	9,03	12,40	17,30
P5E	0,02	0,03	0,42	6,72	12,40	15,60	18,60
P10E	0,02	0,02	0,01	1,38	8,69	13,00	17,00
P50E	0,01	0,02	0,02	0,03	3,77	10,50	16,90
P100E	0,02	0,03	0,02	3,75	10,50	15,60	18,80
G	0,02	0,08	0,20	10,80	17,70	19,40	25,40
G1E	0,04	0,12	0,50	12,20	19,60	23,80	28,60
G5E	0,07	0,14	0,73	12,50	19,10	24,50	27,50
G10E	0,04	0,19	0,42	10,20	19,10	22,90	28,20
G50E	0,05	0,22	0,25	8,73	18,40	22,20	28,00
A	0,13	0,28	0,82	16,10	19,40	19,30	18,60
A1E	0,22	0,59	1,08	16,10	22,40	27,60	27,70
A5E	0,32	0,43	0,43	10,60	22,10	27,10	28,10
A10E	0,33	0,61	1,15	14,90	22,00	27,10	27,90
A50E	0,30	0,10	0,47	13,40	20,20	24,80	27,10
S	0,01	0,01	0,26	3,68	7,50	10,20	13,30
S1E	0,02	0,02	0,22	4,98	9,22	11,60	14,20
S6E	0,02	0,02	0,19	4,25	8,50	11,70	14,70
S10E	0,03	0,02	0,17	2,98	8,87	11,90	14,7,0
S30E	0,08	0,05	0,03	2,96	8,73	12,60	16,50
S50E	0,08	0,05	0,04	2,24	6,13	7,95	12,50
S100E	0,11	0,10	0,08	3,36	7,82	10,50	13,90
C*	0,02	0,03	0,05	0,23	1,66	2,68	6,57
C1E*	0,03	0,03	0,03	0,07	0,95	1,85	10,20
C5E*	0,03	0,02	0,04	0,05	0,37	1,59	4,80
C10E*	0,03	0,04	0,04	0,05	3,91	15,20	28,30
C30E	0,01	0,03	0,60	12,30	21,20	26,00	27,20
C50E	0,02	0,02	0,45	12,30	19,50	23,80	29,20
C100E	0,05	0,04	0,38	11,40	18,70	22,90	27,70
ST	0,03	0,03	0,37	6,69	10,70	13,50	10,90
ST1E	0,01	0,00	0,48	5,24	9,37	12,50	15,70
ST5E	0,02	0,03	0,29	5,45	10,10	11,90	14,70
ST10E	0,02	0,02	0,42	5,60	9,44	12,20	14,90
ST30E	0,05	0,04	0,73	5,70	9,50	12,10	15,20
ST50E	0,02	0,05	0,19	5,16	9,47	12,70	15,20
ST100E*	0,07	0,15	0,11	4,98	10,70	15,40	18,80
Control A	0,02	0,03	0,37	4,05	7,50	9,24	11,50
Control B	0,02	0,02	0,30	4,22	7,44	9,44	11,50
Control A*	0,02	0,05	0,69	4,86	8,69	11,10	16,40
Control B*	0,02	0,05	0,74	5,96	10,80	13,00	14,00

\*analizado la semana 2

Tabla 77. Rendimiento en matraces de *P. stipitis*

Número de muestra	Rendimiento (%) a los siguientes tiempos (horas)			
	24	36	48	72
P	120,3	114,7	151,0	147,8
P1E	102,4	120,9	132,8	150,4
P5E	162,3	166,0	167,0	161,7
P10E	33,3	116,3	139,2	147,8
P50E	0,7	50,5	112,4	147,0
P100E	90,6	140,6	167,0	163,5
G	260,9	236,9	207,7	220,9
G1E	294,7	262,4	254,8	248,7
G5E	301,9	255,7	262,3	239,1
G10E	246,4	255,7	245,2	245,2
G50E	210,9	246,3	237,7	243,5
A	388,9	259,7	206,6	161,7
A1E	388,9	299,9	295,5	240,9
A5E	256,0	295,9	290,1	244,3
A10E	359,9	294,5	290,1	242,6
A50E	323,7	270,4	265,5	235,7
S	88,9	100,4	109,2	115,7
S1E	120,3	123,4	124,2	123,5
S5E	102,7	113,8	125,3	127,8
S10E	72,0	118,7	127,4	127,8
S30E	71,5	116,9	134,9	143,5
S50E	54,1	82,1	85,1	108,7
S100E	81,2	104,7	112,4	120,9
C*	4,2	17,0	22,2	43,2
C1E*	1,4	9,7	15,4	67,1
C5E*	0,9	3,8	13,2	31,6
C10E*	0,9	40,1	126,1	246,1
C30E	297,1	283,8	278,4	236,5
C50E	297,1	261,0	254,8	253,9
C100E	275,4	250,3	245,2	240,9
ST	161,6	143,2	144,5	94,8
ST1E	126,6	125,4	133,8	136,5
ST5E	131,6	135,2	127,4	127,8
ST10E	135,3	126,4	130,6	129,6
ST30E	137,7	127,2	129,6	132,2
ST50E	124,6	126,8	136,0	132,2
ST100E*	120,3	109,7	127,8	123,7
Control A	97,8	100,4	98,9	100,0
Control B	101,9	99,6	101,1	100,0
Control A*	89,8	89,1	92,1	107,9
Control B*	110,2	110,8	107,9	92,1

\*analizado la semana 2

Tabla 78. Recuentos celulares y % de células de *P. stipitis*

Número de muestra	Recuento de células (células x 10 <sup>8</sup> /ml)		% de células (recuento/recuento del control)*100	
	24 horas	72 horas	24 horas	72 horas
P	2,78	11,00	80,6	148,0
P1E	2,10	7,20	60,9	96,9
P5E	2,93	9,68	84,9	130,3
P10E	1,42	7,73	41,2	104,0
P50E	0,33	8,63	9,6	116,2
P100E	1,58	8,25	45,8	111,0
G	1,50	14,20	43,5	191,1
G1E	3,90	8,10	113,0	109,0
G5E	2,93	6,45	84,9	86,8
G10E	4,35	13,30	126,1	179,0
G50E	3,75	11,60	108,7	156,1
A	7,43	8,55	215,4	115,1
A1E	4,13	9,53	119,7	128,3
A5E	3,68	9,75	106,7	131,2
A10E	4,50	7,50	130,4	100,9
A50E	6,23	5,33	180,6	71,7
S	3,53	5,55	102,3	74,7
S1E	3,00	3,30	87,0	44,4
S5E	3,68	3,00	106,7	40,4
S10E	1,73	5,78	50,1	77,8
S30E	2,55	5,48	73,9	73,8
S50E	2,63	6,15	76,2	82,8
S100E	2,25	4,43	65,2	59,6
C*	0,00	0,26	0,00	7,2
C1E*	0,00	0,36	0,00	9,9
C5E*	0,00	0,08	0,00	2,1
C10E*	0,00	5,85	0,00	160,7
C30E	5,78	4,20	167,5	56,5
C50E	3,40	7,35	98,6	98,9
C100E	1,98	6,60	57,4	88,8
ST	2,55	7,65	73,9	103,0
ST1E	2,00	8,70	58,0	117,1
ST5E	1,85	6,75	53,6	90,8
ST10E	1,83	5,40	53,0	72,7
ST30E	2,78	6,15	80,6	82,8
ST50E	1,33	3,45	38,6	46,4
ST100E*	4,35	3,83	59,8	105,2
Control A	3,60	7,13	104,3	96,0
Control B	3,30	7,73	95,7	104,0
Control A*	7,50	3,23	103,0	88,7
Control B*	7,05	4,05	96,8	111,3

\*analizado la semana 2

Resumen de los resultados de toxicidad celular

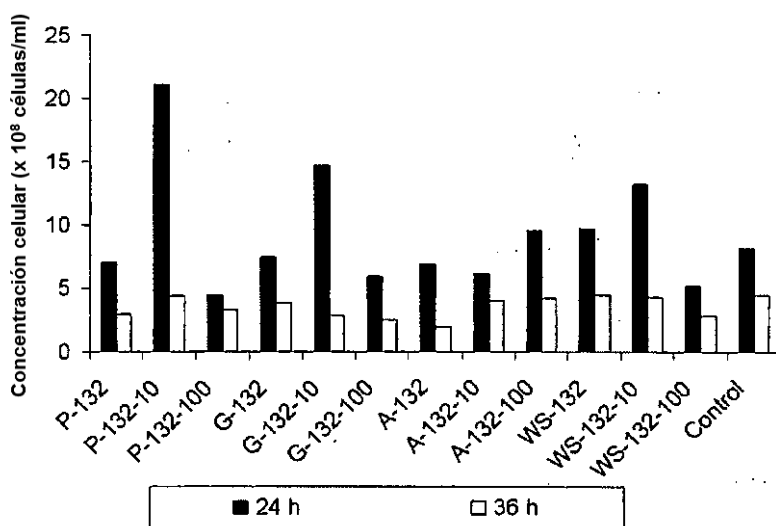
5 *Zymomonas mobilis*

Como se muestra en la gráfica 1A, se observaron números elevados de células (p. ej. mayores que el control) en las muestras que contenían P-132-10, G-132-10 y WS-132-10 en el tiempo de medición de 24 horas. Los números de células en presencia de todas las demás muestras eran comparables con el control. Esta observación indica que los sustratos no eran tóxicos hacia *Z. mobilis* durante hasta 24 horas después de la siembra.

10 En el tiempo de medición de 36 horas, se observó una disminución en el número de células (p. ej., debido a una

5 pérdida de células o muerte celular) para todas las muestras, incluyendo el control. La mayor disminución en el número de células se observó para aquellas muestras que contenían P-132-10, G-132-10. La causa probable de este efecto es común a todas las muestras, incluyendo el control. Por lo tanto, la causa de este efecto no son los sustratos de ensayo, puesto que estos varían en cada muestra, y no están presentes en el control. Las posibles explicaciones para esta observación incluyen las condiciones de cultivo inadecuadas (p. ej., temperatura, composiciones del medio) o concentraciones de etanol en la muestra.

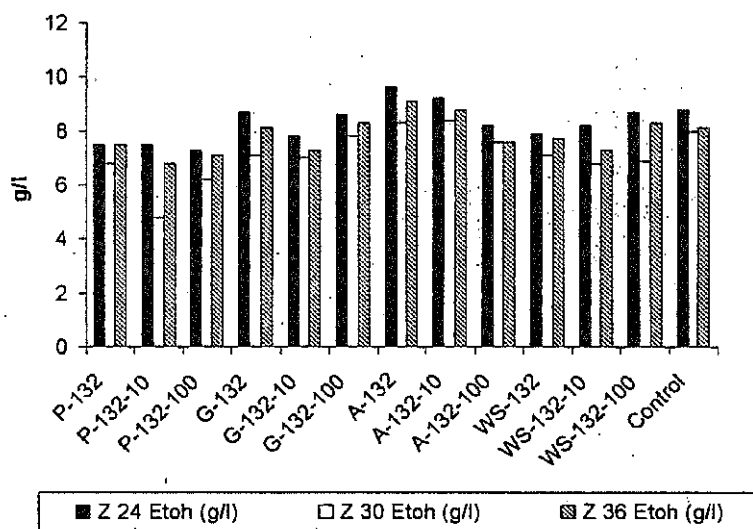
Gráfica 1A. Concentraciones celulares para *Z. mobilis*



10 Como se muestra en la gráfica 1B, todas las células producían cantidades comparables de etanol (p. ej., 5-10 g/l) en cada tiempo de medición, independientemente del sustrato. De acuerdo con los datos del número de células presentados en la gráfica 1A, la concentración de etanol en cada muestra se hizo máxima en el tiempo de medición de 24 horas. A diferencia de los datos del número de células, la concentración de etanol no disminuyó en los siguientes tiempos de medición. Esto se esperaba puesto que el etanol no se eliminó del sistema. Además, estos datos sugieren que la producción de etanol en estas muestras puede haber sido resultado de la fermentación de glucosa en los medios de cultivo. Ninguno de los sustratos ensayados parecía aumentar la producción de etanol.

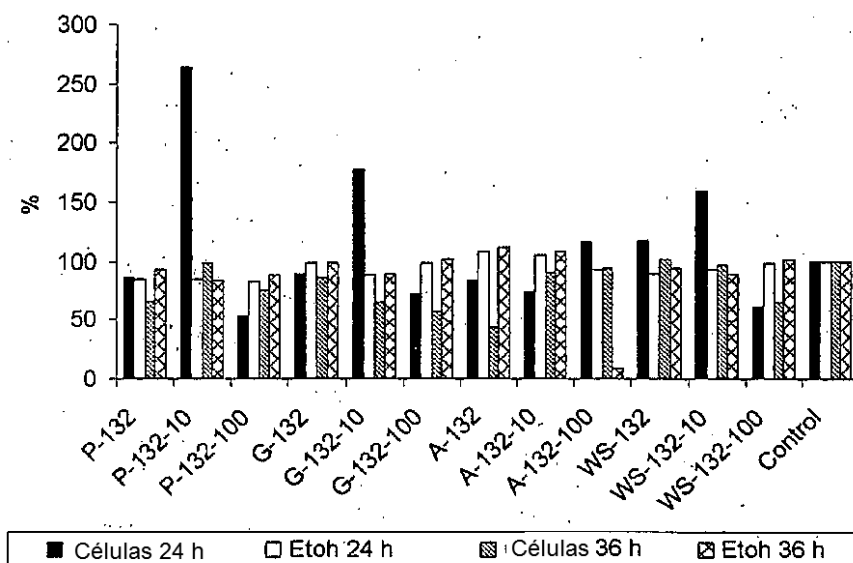
15

Gráfica 1B. Concentraciones de etanol para *Z. mobilis*



20 Juntas, las gráficas 1A y 1B sugieren que las concentraciones de etanol por encima de aproximadamente 6 g/l pueden ser tóxicas para *Z. mobilis*. Este dato también se presenta como un porcentaje normalizado frente al control, como se muestra en la gráfica 1C.

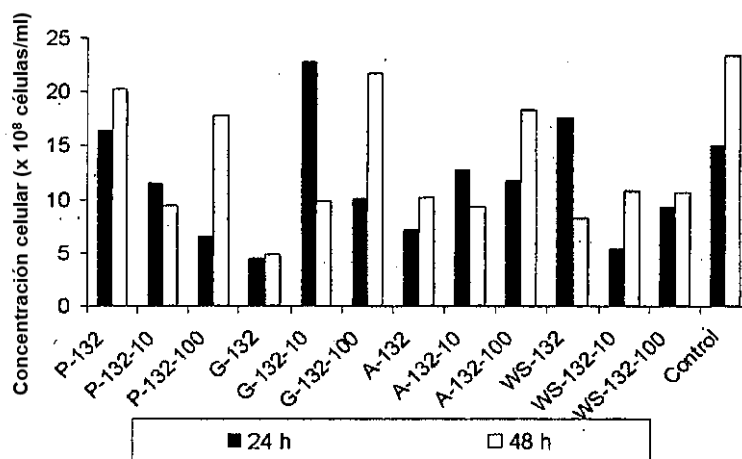
Gráfica 1C. % de Crecimiento y producción de etanol para *Z. mobilis*



*Pichia stipitis*

5 Como se muestra en la gráfica 2A, los números de células eran comparables con el control. Además, aunque estaba presente un número de células ligeramente reducido en las muestras que contenían G-132 y WS-132, no se observaron números de células reducidos para G-132-10, G-132-100, A-132-10 o A-132-100. Por lo tanto, no es probable que los sustratos G o A sean tóxicos. Más bien, es probable que los números de células reducidos observados para G-132 y WS-132 hayan sido causados por una anomalía experimental o por la presencia de sustrato no procesado que impide de alguna forma el crecimiento celular. En conjunto, estos datos sugieren que la glucosa presente en el control y las muestras experimentales, es probable que sea suficiente para promover el crecimiento óptimo de *P. stipitis*, y que la presencia de un sustrato adicional en la muestra no aumente esta tasa de crecimiento. Estos resultados también sugieren que ninguna de las muestras es tóxica para *P. stipitis*.

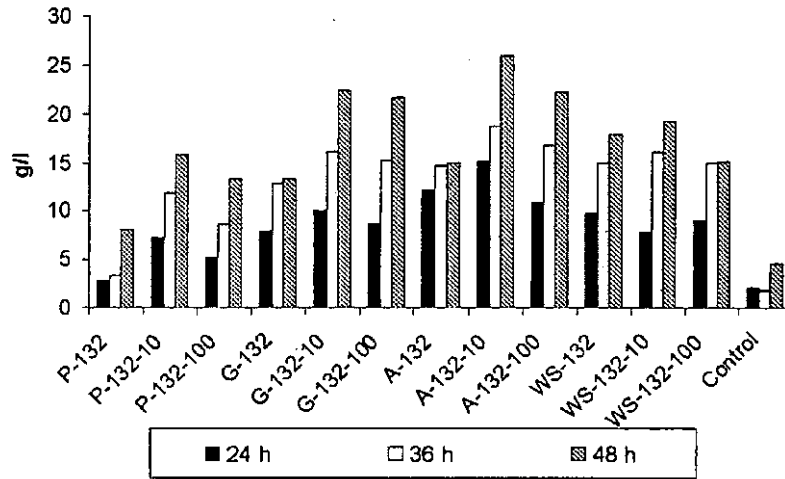
Gráfica 2A. Concentraciones celulares para *P. stipitis*



15 Como se muestra en la gráfica 2B, a pesar de los números de células similares dados en la gráfica 2B, se observó una producción de etanol muy aumentada en todas las muestras que contenían un sustrato experimental. Las concentraciones de etanol aumentaban a lo largo del tiempo para cada uno de los tres puntos de medición ensayados. La mayor concentración de etanol se observó para A-132-10 en el punto de medición de 48 horas (p. ej., aproximadamente 26,0 g/l). Comparando las concentraciones de sustrato con los niveles más altos de producción de etanol con los datos del número de células presentados en la gráfica 2B, puede verse que no parece que *P. stipitis* sea sensible a las concentraciones crecientes de etanol. Además, no parece que la producción de etanol esté relacionada con el número de células, sino que más bien parece que está relacionada con el tipo de sustrato

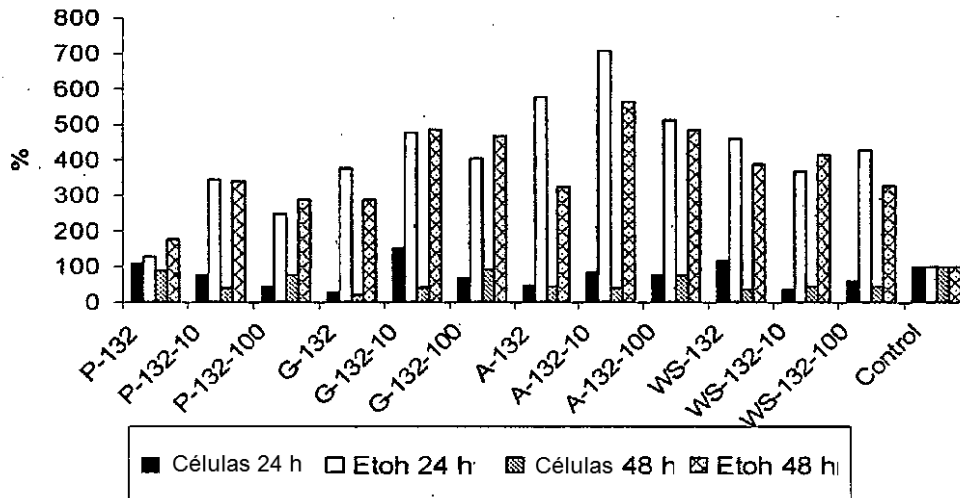
presente en la muestra.

Gráfica 2B. Concentraciones de etanol para *P. stipitis*



5 Juntos, los resultados presentados en las gráficas 2A y 2B sugieren que los sustratos experimentales no producen aumento de crecimiento de *P. stipitis*, sin embargo, aumentan mucho la cantidad de etanol producida por este tipo de célula. Este dato también se presenta como un porcentaje normalizado frente al control, como se muestra en la gráfica 2C.

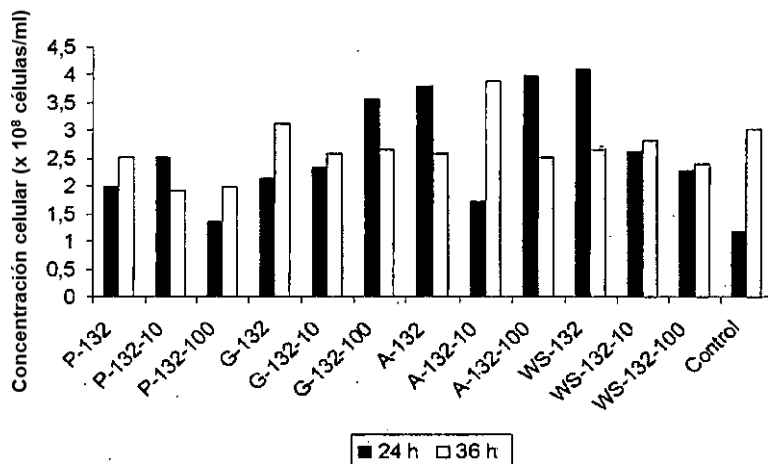
Gráfica 2C. % de crecimiento y producción de etanol para *P. stipitis*



10 *Saccharomyces cerevisiae*

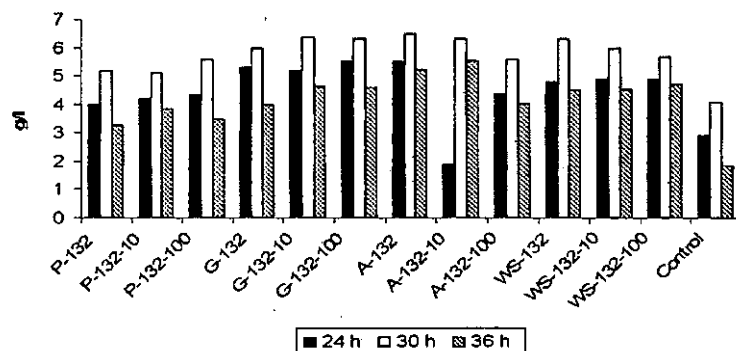
Como se muestra en la gráfica 3A, G-132-100, A-132, A-132-10, A-132-100, y WS-132 promovían ligeramente los números de células elevados comparados con el control. No se observaron reducciones significativas en el número de células para ninguna muestra. Estos resultados sugieren que ninguna de las muestras es tóxica en *S. cerevisiae*.

Gráfica 3A. Concentraciones celulares para *S. cerevisiae*



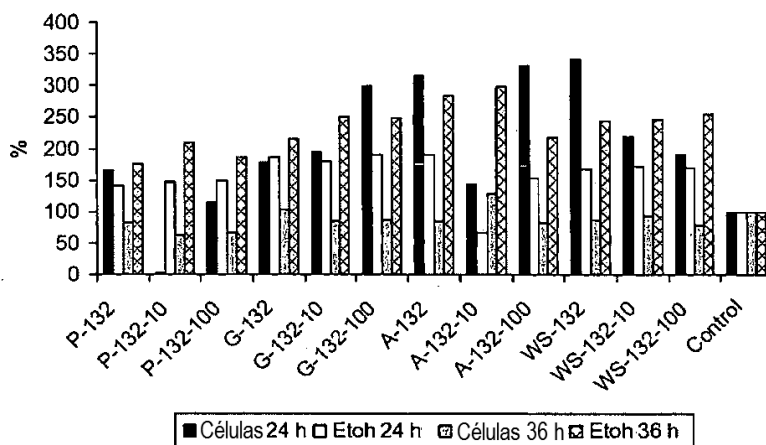
5 Como se muestra en la gráfica 3B, se observó producción aumentada de etanol en las células tratadas con cada tipo de célula comparadas con el control. La comparación de las muestras que contenían la mayor cantidad de etanol con los datos de número de células presentados en la gráfica 3A sugiere que las concentraciones de etanol de más de 5 g/l han tenido un efecto adverso en el número de células. Sin embargo, esta observación no es el caso para todas las muestras.

Gráfica 3B. Concentraciones de etanol para *S. cerevisiae*



10 Este dato también se presenta como un porcentaje normalizado frente al control, como se muestra en la gráfica 3C.

Gráfica 3C. % de crecimiento y producción de etanol para *S. cerevisiae*



En conclusión, ninguna de las muestras ensayadas parecía ser tóxica en *Z. mobilis*, *P. stipitis* o *S. cerevisiae*. Además, *P. stipitis* parecía ser la más eficaz de los tres tipos de células para producir etanol a partir de los sustratos

experimentales ensayados.

Ejemplo de referencia 32 - Producción de alcohol usando pretratamiento de irradiación-ultrasonidos

5 El tamaño óptimo de las instalaciones de conversión de biomasa está afectado por factores que incluyen la economía de escala y el tipo y disponibilidad de biomasa usada como materia prima. Los tamaños crecientes de instalaciones tienden a aumentar la economía de escala asociada con los procedimientos de la instalación. Sin embargo, el tamaño de instalación creciente también tiende a aumentar los costes (p. ej., costes de transporte) por unidad de materia prima de biomasa. Los estudios que analizan estos factores sugieren que el tamaño adecuado para las instalaciones de conversión de biomasa puede estar en el intervalo de 2000 a 10.000 toneladas secas de materia prima de biomasa. La instalación descrita a continuación tiene un tamaño para procesar 2000 toneladas de materia prima de biomasa seca al día.

15 La figura 39 muestra un procedimiento esquemática de un sistema de conversión de biomasa configurado para procesar mijo. El subsistema de preparación de la alimentación procesa materia prima de biomasa bruta para separar objetos extraños y proporcionar partículas de tamaño regular para el procesamiento posterior. El subsistema de pretratamiento cambia la estructura molecular (p. ej., reduce el peso molecular medio y la cristalinidad) de la materia prima de biomasa por irradiación de la materia prima de biomasa, mezcla de la materia prima de biomasa irradiada con agua para formar una suspensión, y aplicación de energía ultrasónica a la suspensión. La irradiación y los ultrasonidos convierten los componentes celulósicos y lignocelulósicos de la materia prima de biomasa en materiales fermentables. El subsistema del procedimiento primario fermenta la glucosa y otros azúcares de bajo peso molecular presentes después del pretratamiento para formar alcoholes.

20 Preparación de la alimentación

La tasa de alimentación del modelo seleccionado para la instalación es 2.000 toneladas secas al día de biomasa de mijo. La alimentación del modelo es mijo troceado y/o cizallado.

25 La materia prima de biomasa, en forma de balas de mijo, es recibida en la instalación en remolques de camiones. Cuando se reciben los camiones, son pesados y descargados por carretillas elevadoras. Algunas balas son enviadas a almacenamiento en las instalaciones, mientras que otras son recogidas directamente por las cintas transportadoras. Desde aquí, las balas son transportadas a un sistema de desembalado automático que corta el plástico que envuelve y/o red que rodea las balas. La materia prima de biomasa después es transportada para pasar un separador magnético para separar fragmentos de metal, después de lo cual es introducida en los trenes de desmenuzadora-cizalladora donde el material se reduce de tamaño. Finalmente, la materia prima de biomasa es transportada al subsistema de pretratamiento.

30 En algunos casos, las balas de mijo están envueltas con red de plástico para asegurar que no se rompen cuando se manipulan, y también pueden estar envueltas en película de plástico para proteger la bala de la intemperie. Las balas son cuadradas o redondas. Las balas se reciben en la instalación desde almacenamiento fuera de la instalación en grandes remolques de camiones.

35 Puesto que el mijo solo está disponible de forma estacional, es necesario el almacenamiento a largo plazo para proporcionar alimentación a la instalación todo el año. El almacenamiento a largo plazo probablemente consistirá en 161,87- 202,34 hectáreas (400-500 acres) de filas apiladas no cubiertas de balas en un sitio (o múltiples sitios) razonablemente cerca de la instalación de etanol. Se proporciona almacenamiento a corto plazo en la instalación equivalente a 72 horas de producción en una zona de almacenamiento exterior. Las balas y los caminos de acceso a los alrededores así como las cintas transportadores estarán en una losa de hormigón. Se usa una losa de hormigón debido al volumen del tráfico requerido para suministrar la gran cantidad de materia prima de biomasa requerida. Una losa de hormigón minimizará la cantidad de agua estancada en la zona de almacenamiento, así como reducirá la exposición de la materia prima de biomasa a la suciedad. El material almacenado proporciona un suministro a corto plazo para fines de semana, vacaciones, y cuando se interrumpe el suministro directo normal del material al procedimiento.

40 Las balas son descargadas mediante carretillas elevadoras y se ponen directamente en cintas transportadoras de balas o en la zona de almacenamiento a corto plazo. Las balas también son recuperadas del almacenamiento a corto plazo por carretillas elevadoras y son cargadas en las cintas transportadoras de balas.

50 Las balas viajan a una de las dos estaciones de desembalado de balas. Las balas desembaladas se rompen usando una barra esparcidora y después son descargadas en una cinta transportadora, que pasa por un separador magnético para separar el metal antes del troceado. Se proporciona un imán de partículas de hierro para atrapar metal magnético suelto y un tamiz abierto separa el material de tamaño grano y extraño delante de los múltiples trenes de desmenuzadora-cizalladora, que reducen la materia prima de biomasa al tamaño adecuado para el pretratamiento. Los trenes de desmenuzadora-cizalladora incluyen desmenuzadoras y cortadoras de cuchillas rotativas. Las desmenuzadoras reducen el tamaño de la materia prima de biomasa bruta y alimentan el material resultante a las cortadoras de cuchillas rotativas. Las cortadoras de cuchillas rotativas cizallan simultáneamente la materia prima de biomasa y criban el material resultante.



Los silos de almacenamiento se proporcionan para limitar el tiempo de parada del sistema en general debido al mantenimiento necesario de y/o irregularidades del equipamiento del subsistema de preparación de la alimentación. Cada silo puede contener aproximadamente 1557,43 m<sup>3</sup> (55.000 pies cúbicos) de materia prima de biomasa (~3 horas de operación de la instalación).

5 Pretratamiento

Una cinta transportadora lleva la materia prima de biomasa desde el subsistema de preparación de la alimentación 110 al subsistema de pretratamiento 114. Como se muestra en la figura 40, en el subsistema de pretratamiento 114, la materia prima de biomasa se irradia usando emisores de haces de electrones, se mezcla con agua para formar una suspensión y se somete a la aplicación de energía ultrasónica. Como se ha discutido antes, la irradiación de la materia prima de biomasa cambia la estructura molecular (p. ej., reduce el peso molecular medio y la cristalinidad) de la materia prima de biomasa. La mezcla de la materia prima de biomasa irradiada en una suspensión y la aplicación de energía ultrasónica a la suspensión cambia además la estructura molecular de la materia prima de biomasa. La aplicación de la radiación y ultrasonidos en secuencia puede tener efectos sinérgicos en cuanto que parece que la combinación de las técnicas logra mayores cambios en la estructura molecular (p. ej., reduce el peso molecular medio y la cristalinidad) que pueda lograr por sí sola cualquiera de las técnicas eficazmente. Sin querer estar ligados por la teoría, además de reducir la polimerización de la materia prima de biomasa rompiendo enlaces intramoleculares entre segmentos de los componentes celulósicos y lignocelulósicos de la materia prima de biomasa, la irradiación puede hacer a la estructura física de la materia prima de biomasa en conjunto más quebradiza. Después de mezclar la materia prima de biomasa quebradiza en una suspensión, la aplicación de energía ultrasónica cambia más la estructura molecular (p. ej., reduce el peso molecular medio y la cristalinidad) y también puede reducir el tamaño de las partículas de materia prima de biomasa.

Irradiación con haz de electrones

La cinta transportadora 491 que lleva la materia prima de biomasa en el subsistema de pretratamiento distribuye la materia prima de biomasa en múltiples corrientes de alimentación (p. ej., 50 corrientes de alimentación) dirigiendo cada una a emisores de haces de electrones 492 separados. En esta realización, la materia prima de biomasa se irradia mientras está seca. Cada corriente de alimentación se lleva en una cinta transportadora separada a un emisor de haz de electrones asociado. Cada cinta transportadora de alimentación de la irradiación puede tener aproximadamente 1 metro de ancho. Antes de llegar al emisor de haz de electrones, se induce una vibración localizada en cada cinta transportadora para distribuir uniformemente la materia prima de biomasa seca a lo largo de la anchura de la sección transversal de la cinta transportadora.

El emisor de haz de electrones 492 (p. ej., dispositivos de irradiación de haz de electrones disponibles en el comercio en Titan Corporation, San Diego, CA) está configurado para aplicar una dosis de 100 kiloGray de electrones aplicados con una potencia de 300 kW. Los emisores de haz de electrones son dispositivos de haces de barrido con una anchura de barrido de 1 metro para que se corresponda con la anchura de la cinta transportadora. En algunas realizaciones, se usan emisores de haz de electrones con anchuras de haz fijas, grandes. Factores que incluyen la anchura de la cinta/haz, dosis deseada, densidad de la materia prima de biomasa y la potencia aplicada, gobiernan el número de emisores de haz de electrones necesario para que la instalación procese 2.000 toneladas al día de alimentación seca.

Sonicación

La materia prima de biomasa irradiada se mezcla con agua para formar una suspensión antes de aplicar la energía ultrasónica. Puede haber un sistema de ultrasonidos separado asociado con cada corriente de alimentación de haz de electrones o se pueden agregar varias corrientes de haces de electrones como alimentación para un solo sistema de ultrasonidos.

En cada sistema de ultrasonidos, la materia prima de biomasa irradiada se alimenta a un depósito 1214 a través de una primera tolva de alimentación 1232 y se alimenta agua en el depósito 1214 a través de una segunda tolva de alimentación 1234. Válvulas adecuadas (manuales o automáticas) controlan el flujo de materia prima de biomasa y el flujo de agua para producir una relación deseada de materia prima de biomasa a agua (p. ej., 10% en volumen de material celulósico). Cada depósito 1214 incluye un mezclador 1240 para agitar el contenido del volumen 1236 y dispersar la materia prima de biomasa por toda el agua.

En cada sistema de ultrasonidos, la suspensión se bombea (p. ej., usando una bomba de impulsor de vórtice empotrado 1218) desde el depósito 1214 y a través de la celda de flujo 1224 que incluye un transductor ultrasónico 1226. En algunas realizaciones, la bomba 1218 está configurada para agitar la suspensión 1216 de modo que la mezcla de materia prima de biomasa y agua sea sustancialmente uniforme en la entrada 1220 de la celda de flujo 1224. Por ejemplo, la bomba 1218 puede agitar la suspensión 1216 para crear un flujo turbulento que persiste a través de las tuberías entre la primera bomba y la entrada 1220 de la celda de flujo 1224.

Dentro de la celda de flujo 1224, el transductor ultrasónico 1226 transmite energía ultrasónica a la suspensión 1216 cuando la suspensión fluye a través de la celda de flujo 1224. El transductor ultrasónico 1226 convierte la energía eléctrica en energía mecánica de alta frecuencia (p. ej., energía ultrasónica), que después es suministrada a la

suspensión a través del impulsor 48. Los transductores ultrasónicos están disponibles en el comercio (p. ej., de Hielscher USA, Inc. of Ringwood, New. Jersey), que son capaces de suministrar una potencia continua de 16 kW.

5 La energía ultrasónica que viaja a través del impulsor 1248 en el volumen del reactor 1244 crea una serie de compresiones y rarefacciones en la corriente del proceso 1216 con una intensidad suficiente para crear cavitación en la corriente del proceso 1216. La cavitación disgrega los componentes de la materia prima de biomasa incluyendo, por ejemplo, el material celulósico y lignocelulósico disperso en la corriente del proceso 1216 (p. ej., suspensión). La cavitación también produce radicales libres en el agua de la corriente del proceso 1216 (p. ej., suspensión). Estos radicales libres actúan para romper más el material celulósico en la corriente del proceso 1216. En general, se aplican aproximadamente 250 MJ/m<sup>3</sup> de energía ultrasónica a la corriente del proceso 1216 que contiene fragmentos de virutas de álamo. Se pueden aplicar otros niveles de energía ultrasónica (entre aproximadamente 5 y aproximadamente 4000 MJ/m<sup>3</sup>, p. ej., 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000, o 3000) a otras materias primas de biomasa. Después de exposición a energía ultrasónica en el volumen del reactor 1244, la corriente del proceso 1216 sale de la celda de flujo 24 a través de la salida 1222.

15 La celda de flujo 1224 también incluye un intercambiador de calor 1246 en comunicación térmica con al menos una parte del volumen del reactor 1244. El fluido de enfriamiento 1248 (p. ej., agua) fluye al intercambiador de calor 1246 y absorbe el calor generado cuando la corriente del proceso 1216 (p. ej., suspensión) se trata con ultrasonidos en el volumen de reactor 1244. En algunas realizaciones, el flujo del fluido de enfriamiento 1248 al intercambiador de calor 1246 se controla para mantener una temperatura aproximadamente constante en el volumen del reactor 1244. Además o alternativamente, la temperatura del fluido de enfriamiento 1248 que fluye al intercambiador de calor 1246 se controla o mantiene a una temperatura aproximadamente constante en el volumen del reactor 1244.

20 La salida 1242 de la celda de flujo 1224 está dispuesta cerca de la parte inferior del depósito 1214 para inducir una alimentación por gravedad de la corriente del proceso 1216 (p. ej., suspensión) fuera del depósito 1214 hacia la entrada de una segunda bomba 1230 que bombea la corriente del proceso 1216 (p. ej., suspensión) hacia el subsistema del procedimiento primario.

25 Los sistemas de ultrasonidos pueden incluir un solo camino del flujo (como se ha descrito antes) o múltiples caminos de flujo paralelos, cada uno con una unidad de ultrasonidos individual asociada. También se pueden disponer múltiples unidades de ultrasonidos en serie para aumentar la cantidad de energía ultrasónica aplicada a la suspensión.

#### Procedimientos primarios

30 Un filtro de tipo tambor rotatorio de vacío separa sólidos de la suspensión antes de la fermentación. El líquido del filtro es enfriado por bombeo antes de entrar en los fermentadores. Los sólidos filtrados se hacen pasar por el sistema de postprocesamiento para procesarlos más.

35 Los tanques de fermentación son recipientes de acero inoxidable, de baja presión, grandes, con fondos cónicos y agitadores de baja velocidad. Se pueden disponer en serie múltiples tanques de fermentación de la primera etapa. La temperatura en los tanques de fermentación de la primera etapa se controla a 30°C usando intercambiadores de calor externos. Se añade levadura al tanque de fermentación de la primera etapa en la cabeza de cada serie de tanques y se lleva a través de los otros tanques en la serie.

40 La fermentación de la segunda etapa consiste en dos fermentadores continuos en serie. Ambos fermentadores son agitados continuamente con mezcladores mecánicos de baja velocidad. La temperatura se controla con agua enfriada en intercambiadores externos con recirculación continua. Las bombas de recirculación son de la cavidad progresiva debido a la alta concentración de sólidos.

El gas residual de los tanques de fermentación y los fermentadores se combina y se lava en una columna de agua a contracorriente antes de ser ventilados a la atmósfera. El gas residual se lava para recuperar etanol en lugar de para controlar emisiones de aire.

#### 45 Postprocesamiento

##### Destilación

50 Se usan la destilación y la adsorción en tamices moleculares para recuperar etanol de la cerveza de fermentación bruta y producir 99,5% de etanol. La destilación se lleva a cabo en dos columnas, la primera llamada la columna de cerveza, separa el CO<sub>2</sub> disuelto y la mayor parte del agua, y la segunda concentra el etanol a una composición casi azeotrópica.

Toda el agua de la mezcla casi azeotrópica se separa por adsorción en tamices moleculares en fase de vapor. La regeneración de las columnas de adsorción requiere que se recicle una mezcla de etanol y agua a la destilación para la recuperación.

Las ventilaciones de la fermentación (que contienen principalmente CO<sub>2</sub>, pero también algo de etanol) así como la

ventilación de la columna de cerveza son depuradas en un depurador de agua, recuperando casi todo el etanol. El efluente del depurador se alimenta a la primera columna de destilación junto con la cerveza de fermentación.

5 Las partes finales de la primera destilación contienen todos los sólidos insolubles no convertidos y disueltos. Los sólidos insolubles se desaguan mediante un filtro con presión y se envían a una cámara de combustión. El líquido del filtro de presión que no se recicla se concentra en un evaporador de efecto múltiple usando calor residual de la destilación. El jarabe concentrado del evaporador se mezcla con los sólidos que se van a enviar a la cámara de combustión, y el condensado evaporado se usa como agua de reciclado relativamente limpia para el procedimiento.

10 Debido a que la cantidad de agua de los residuos de destilación que se puede reciclar es limitada, se incluye un evaporador en el procedimiento. La cantidad total del agua del filtro de presión que se recicla directamente se ajusta al 25%. Las sales orgánicas como el acetato o lactato de amonio, componentes del licor de maceración no usados por el organismo, o compuestos inorgánicos en la biomasa terminan en esta corriente. Reciclar demasiado este material puede producir niveles de fuerza iónica y presiones osmóticas que pueden ser perjudiciales para la eficacia del organismo fermentador. Para el agua que no se recicla, el evaporador concentra los sólidos disueltos en un jarabe que se puede enviar a la cámara de combustión, minimizando la carga de tratamiento de las aguas residuales.

#### Tratamiento de las aguas residuales

20 La sección de tratamiento de las aguas residuales trata el agua del procedimiento para volver a usarla para reducir los requisitos de agua que componen la instalación. Las aguas residuales inicialmente se criban para separar partículas grandes que son recogidas en una tolva y se envían a un vertedero. Al cribado le sigue la digestión anaerobia y digestión aerobia para digerir la materia orgánica en la corriente. La digestión anaerobia produce una corriente de biogas que es rica en metano que se alimenta a la cámara de combustión. La digestión aerobia produce una corriente de agua relativamente limpia para volver a usar en el procedimiento, así como un lodo que está compuesto principalmente de masas celulares. El lodo también se quema en la cámara de combustión. Este esquema de cribado/digestión anaerobia/digestión aerobia es convencional dentro de la industria actual del etanol y se pueden obtener en el mercado de proveedores instalaciones en el intervalo de 3,8 - 19 millones de litros por día (1-5 millones de galones por día).

#### Cámara de combustión, caldera y trubogenerador

30 El propósito del subsistema de cámara de combustión, caldera y turbogenerador es quemar diferentes corrientes de subproductos y la generación de electricidad. Por ejemplo, algo de la lignina, celulosa y hemicelulosa permanece sin convertirse a través del pretratamiento y procedimientos primarios. La mayor parte de las aguas residuales del procedimiento se concentran en un jarabe con alto contenido de sólidos. La digestión anaerobia del agua residual restante produce un biogas con alto contenido en metano. La digestión aerobia produce una pequeña cantidad de biomasa residual (lodo). El quemado de estas corrientes de subproductos para generar vapor y electricidad permite que la instalación sea autosuficiente en energía, reduce los costes de desechar los residuos sólidos y genera ingresos mediante la venta del exceso de electricidad.

35 Se alimentan tres corrientes de combustible primario (sólidos postdestilados, biogas y jarabe del evaporador) a una cámara de combustión de lecho fluidizado circulante. También se envía la pequeña cantidad de biomasa residual (lodo) del tratamiento de las aguas residuales a la cámara de combustión. Un ventilador mueve el aire en la cámara de combustión. El agua tratada entra en el circuito intercambiador de calor en la cámara de combustión y es evaporada y supercalentada a vapor a 510°C (950°F) y 86 atm (1265 psia). El gas de combustión de la cámara de combustión precalienta el aire de combustión de entrada, después entra en una cámara de filtros para separar partículas que van al vertedero. Este gas sale por un conducto de gases.

40 Se usan una turbina y generador de múltiples etapas para generar electricidad. El vapor se extrae de la turbina en tres condiciones diferentes para la inyección en el reactor de pretratamiento y el intercambio de calor en la destilación y evaporación. El vapor que queda se condensa con agua de enfriamiento y se devuelve al sistema de agua alimentada a la caldera junto con el condensado de los diferentes intercambiadores de calor en el procedimiento. El agua bien tratada se usa como componente para sustituir el vapor usado en la inyección directa.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un método que comprende:
- 5 convertir un azúcar de bajo peso molecular en una mezcla que comprende una biomasa, un microorganismo y un disolvente o sistema disolvente, en un combustible, que además comprende irradiar la biomasa antes de mezclar con radiación ionizante con una dosis total de al menos 5 Mrad, en donde la conversión comprende fermentación en donde la biomasa no es consumida durante la fermentación, y en donde la biomasa comprende un material celulósico o lignocelulósico.
- 2.- El método de la reivindicación 1, en donde la conversión comprende permitir que el microorganismo convierta al menos una parte del azúcar de bajo peso molecular en etanol.
- 10 3.- El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el microorganismo comprende una levadura, en particular una levadura seleccionada del grupo que consiste en *S. cerevisiae* y *P. stipitis* o en donde el microorganismo comprende una bacteria, p. ej., *Zymomonas mobilis*.
- 4.- El método de la reivindicación 1, en donde la irradiación se lleva a cabo usando un haz de partículas, tal como un haz de electrones.
- 15 5.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la biomasa tiene una densidad aparente menor de aproximadamente  $0,5 \text{ g/cm}^3$  antes de la adición a la mezcla, y opcionalmente, en donde la biomasa es fibra.
- 6.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende preparar físicamente la biomasa, p. ej., por cizalladura, o por reducción del tamaño de la biomasa por muela abrasiva, corte o desgarrado mecánico, trituración por rectificadora, aplastamiento, o molienda por abrasión con aire.
- 20 7.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la biomasa tiene una superficie específica BET mayor que  $0,25 \text{ m}^2/\text{g}$ .
- 8.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la biomasa tiene una relación de longitud a diámetro de al menos 5.
- 25 9.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la biomasa se selecciona del grupo que consiste en papel, productos de papel, residuos de papel, madera, tableros de partículas, serrín, residuos agrícolas, aguas residuales, ensilado, hierbas, cáscaras de arroz, bagazo, algodón, yute, cáñamo, lino, bambú, sisal, abacá, paja, mazorcas de maíz, rastrojo de maíz, mijos, alfalfa, heno, fibra de coco, algodón, algas marinas, algas, y mezclas de los mismos.
- 30 10.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la biomasa tiene fibras internas y en donde la materia prima de biomasa se ha cizallado en una medida que sus fibras internas están sustancialmente expuestas.
- 11.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la biomasa tiene una porosidad mayor que 50 por ciento, p. ej., mayor que 70 por ciento.
- 35 12.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa de conversión presenta un porcentaje de rendimiento de al menos 140 por ciento, p. ej., al menos 170 por ciento.
- 13.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el combustible comprende un alcohol.
- 14.- El método de la reivindicación 13, en donde el alcohol comprende etanol.

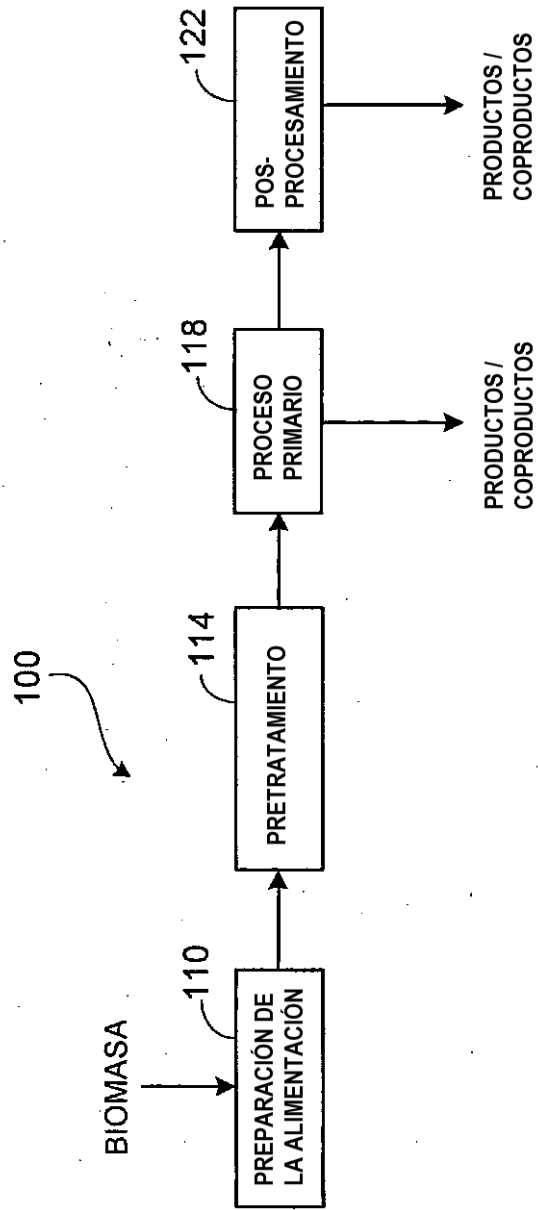


FIG. 1

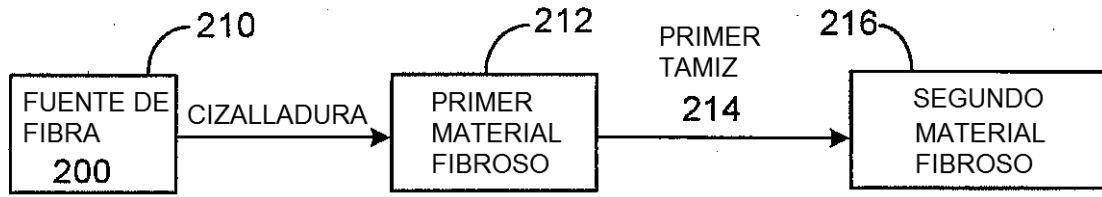


FIG. 2

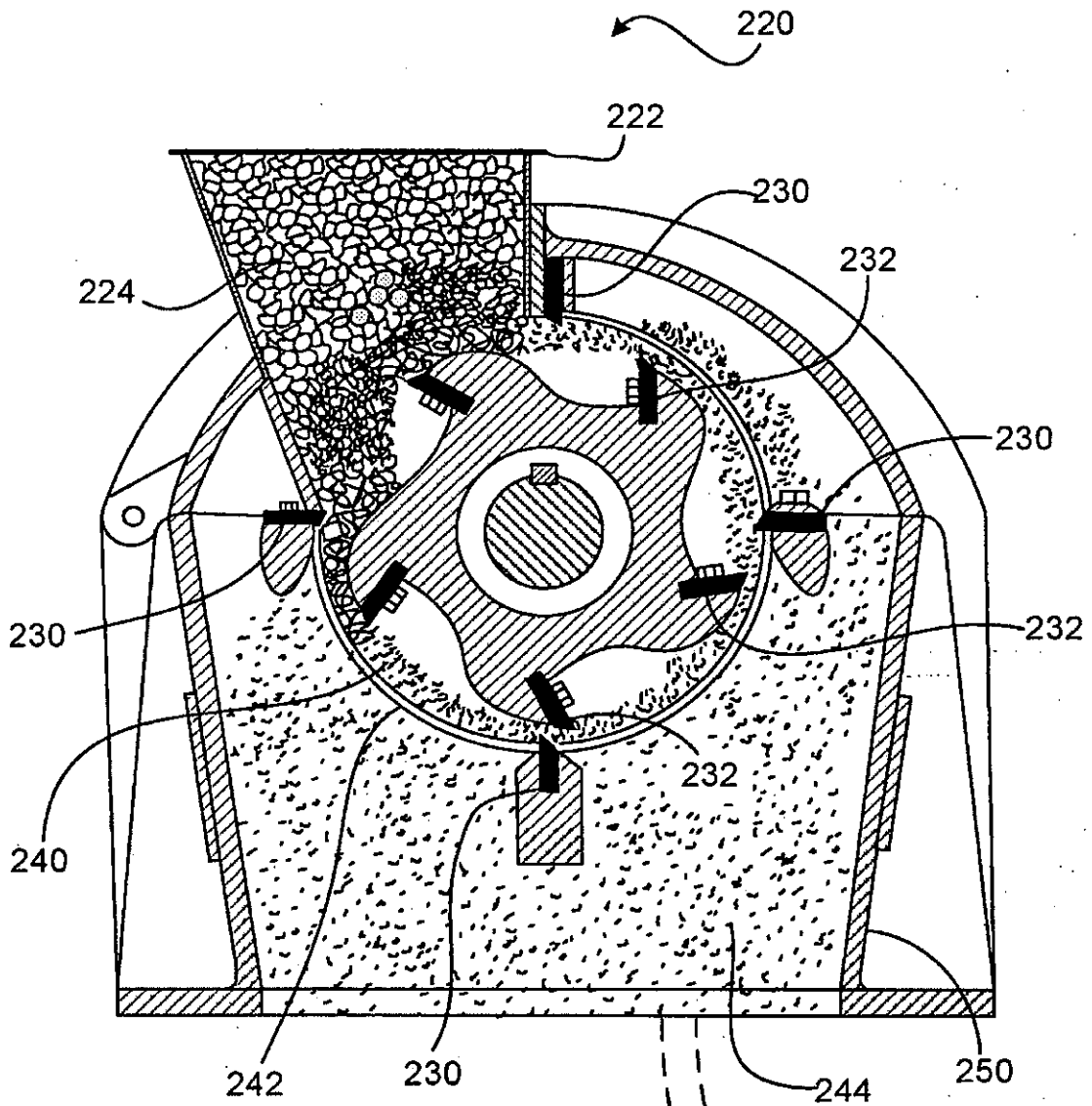


FIG. 3

FUENTE DE  
VACÍO  
252

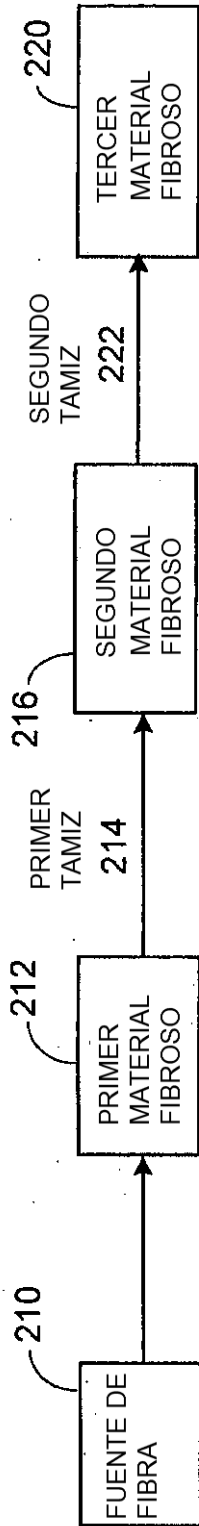


FIG. 4



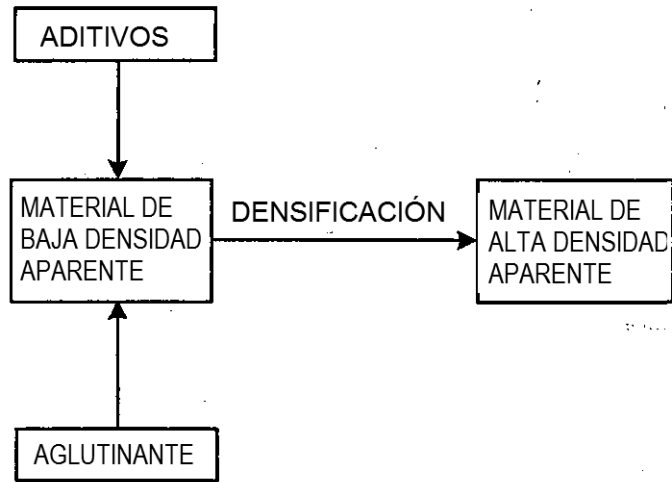


FIG. 5

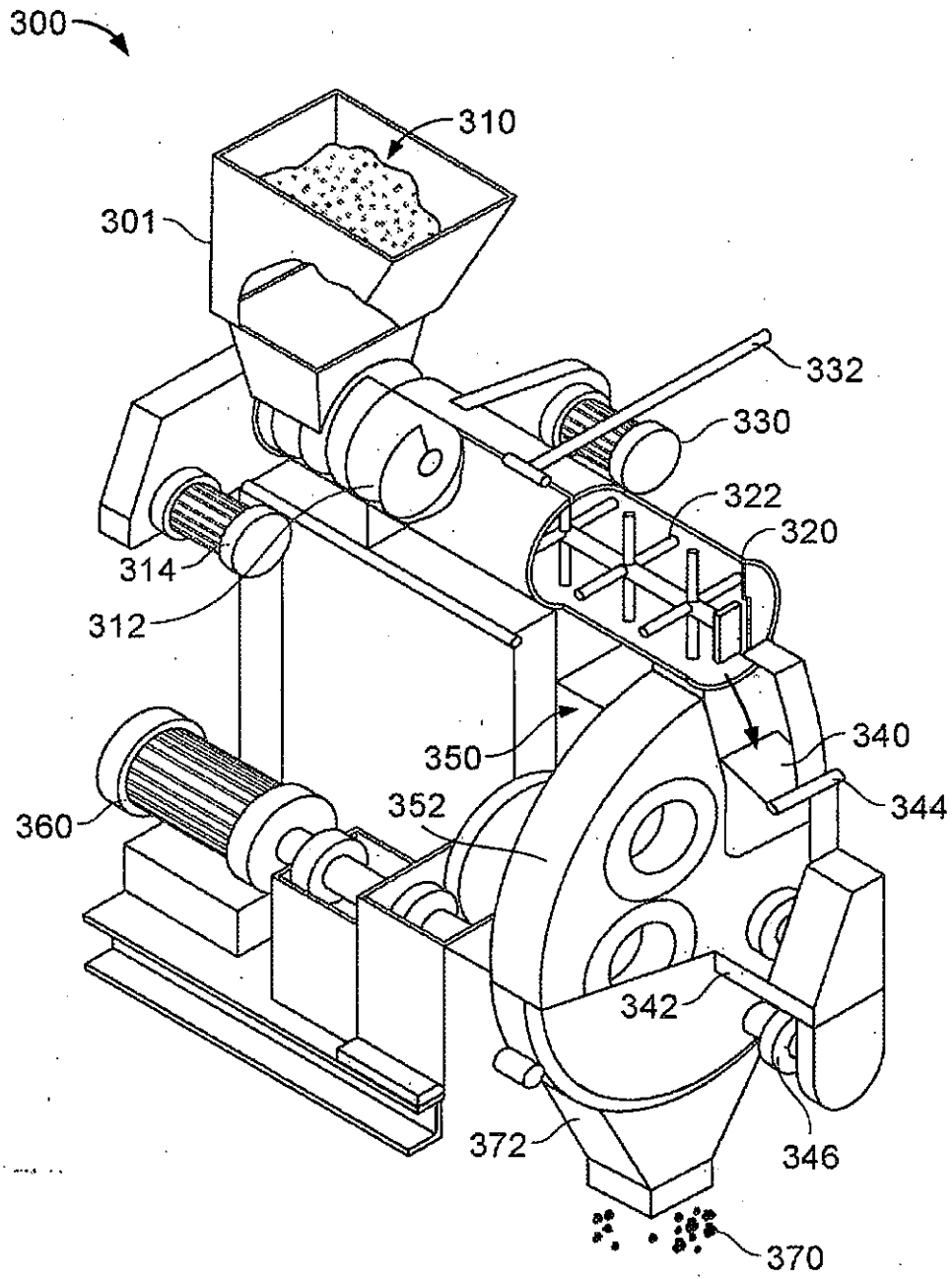


FIG. 6

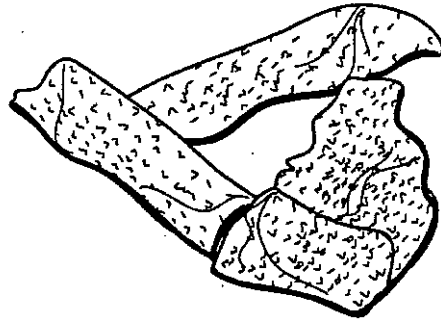


FIG. 7A

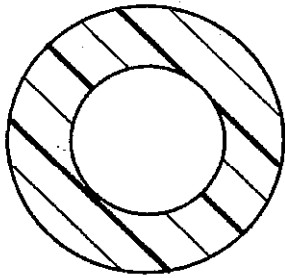


FIG. 7B

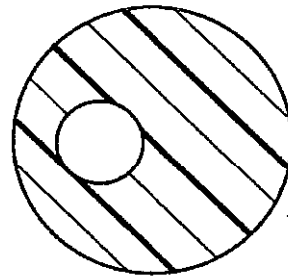


FIG. 7C

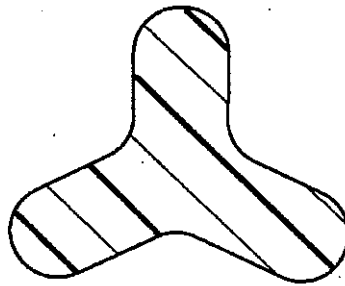


FIG. 7D

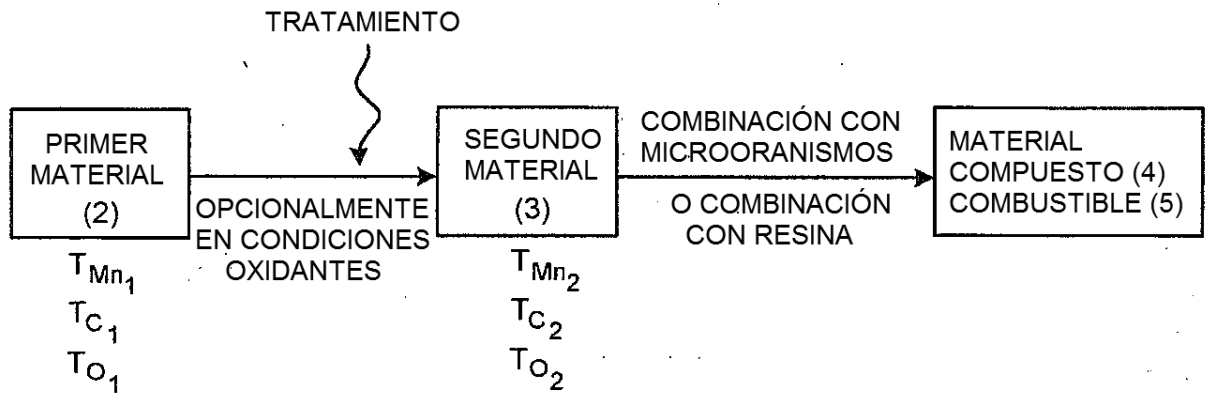


FIG. 8

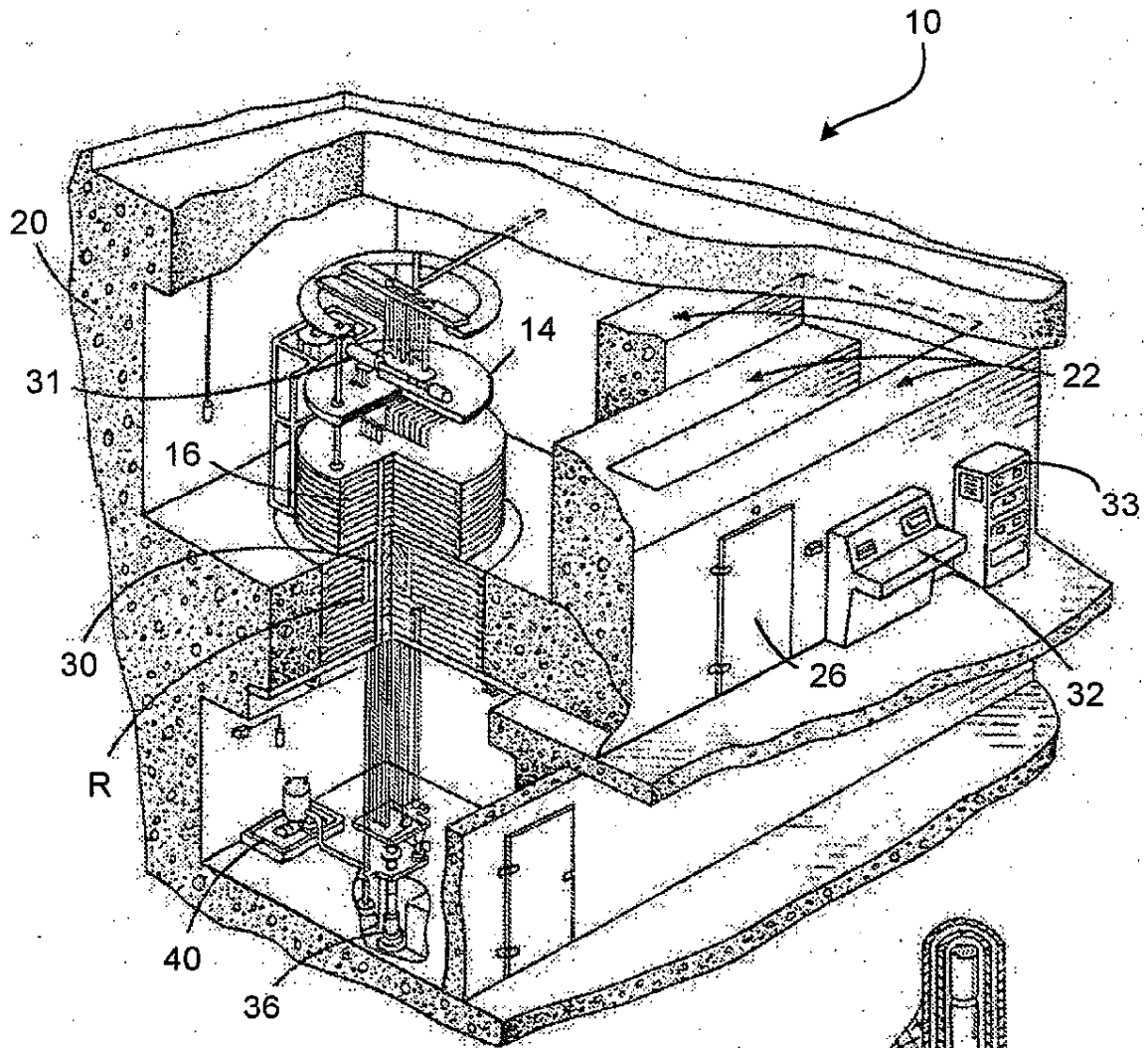


FIG. 9

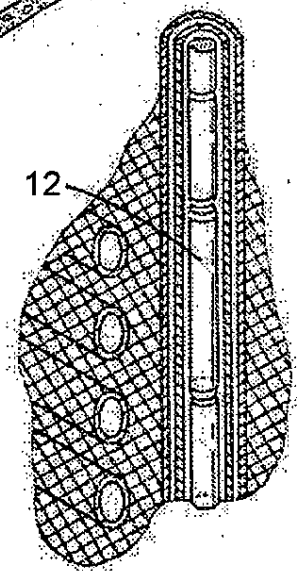


FIG. 10

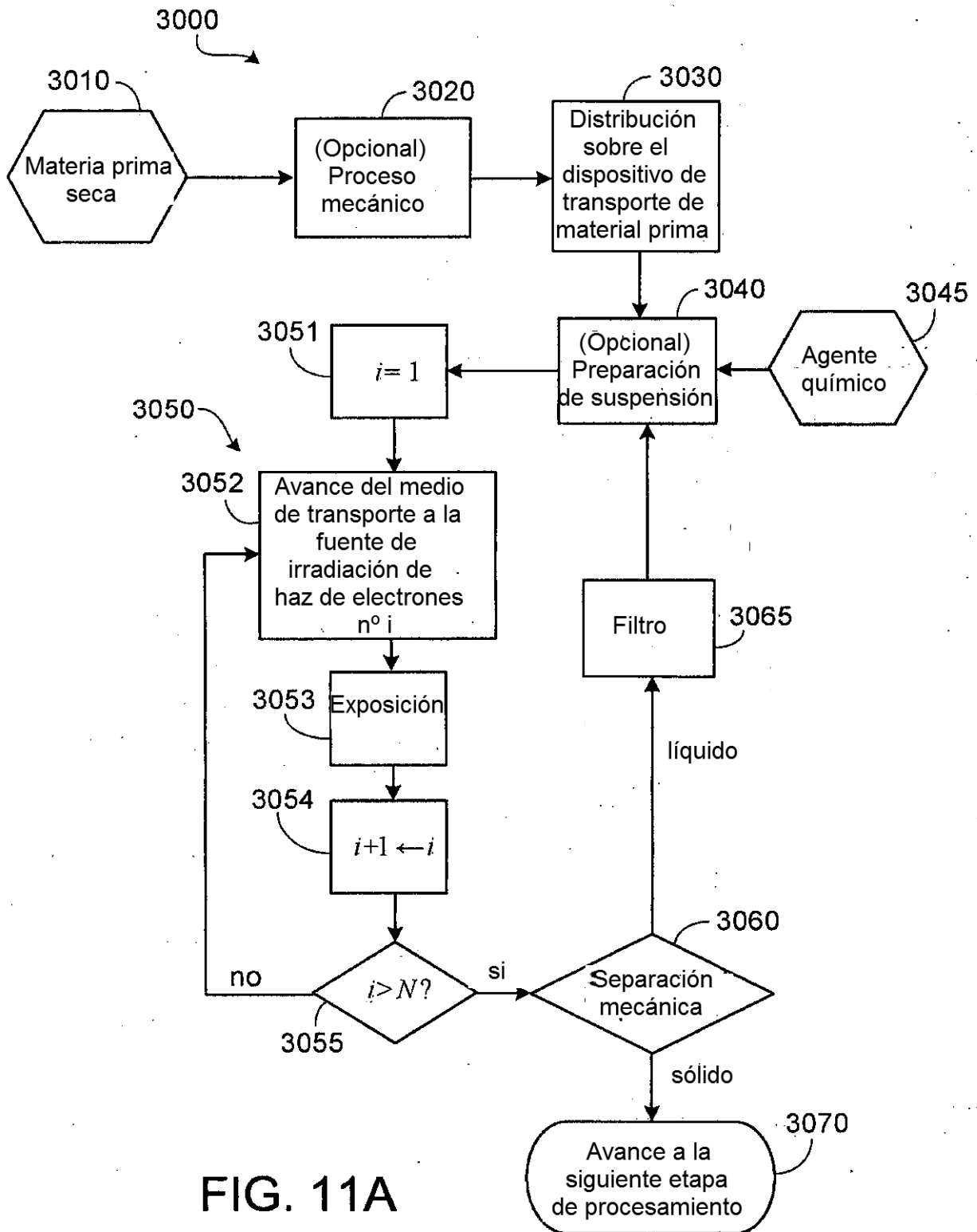


FIG. 11A

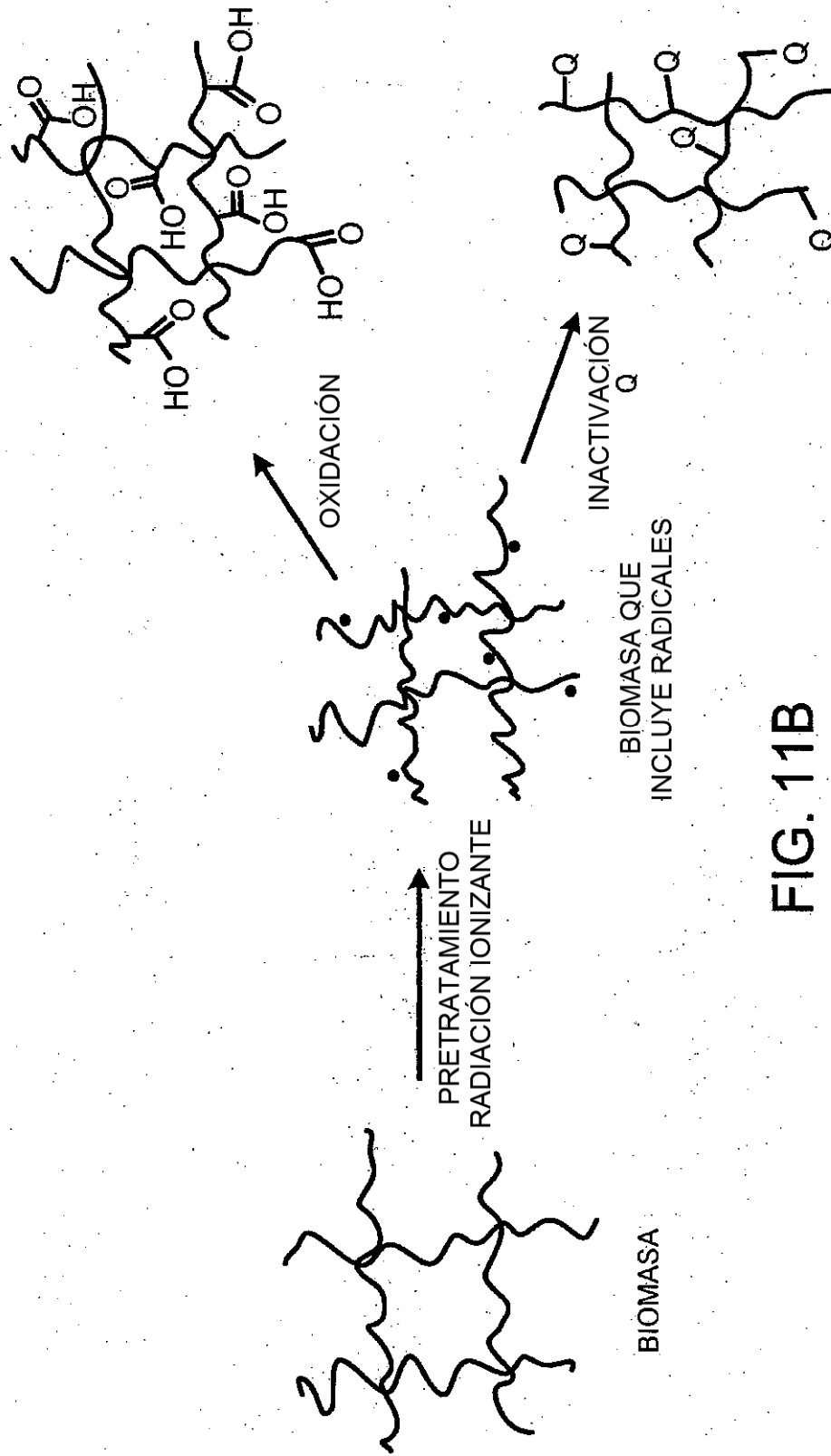


FIG. 11B

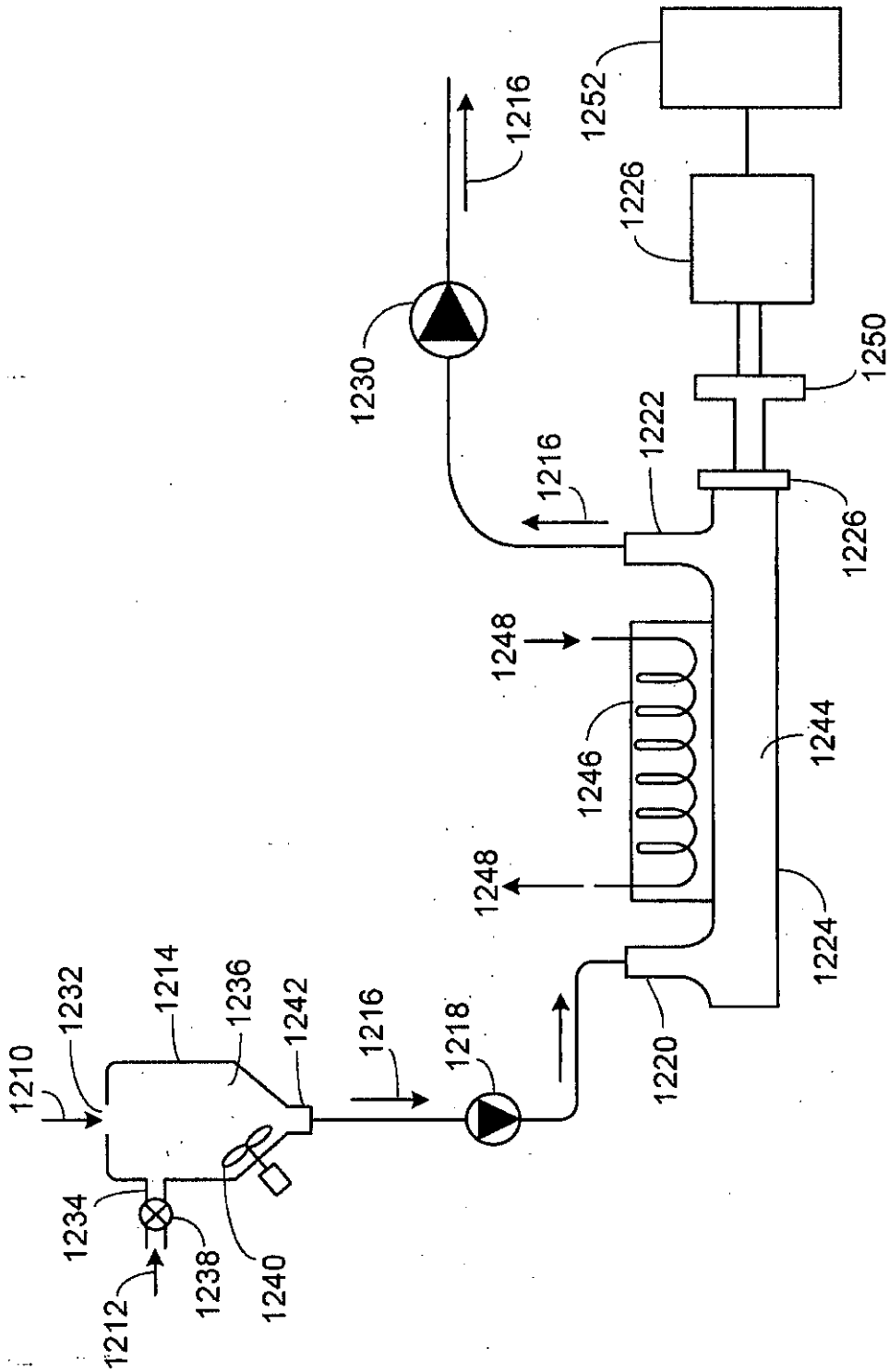


FIG. 12



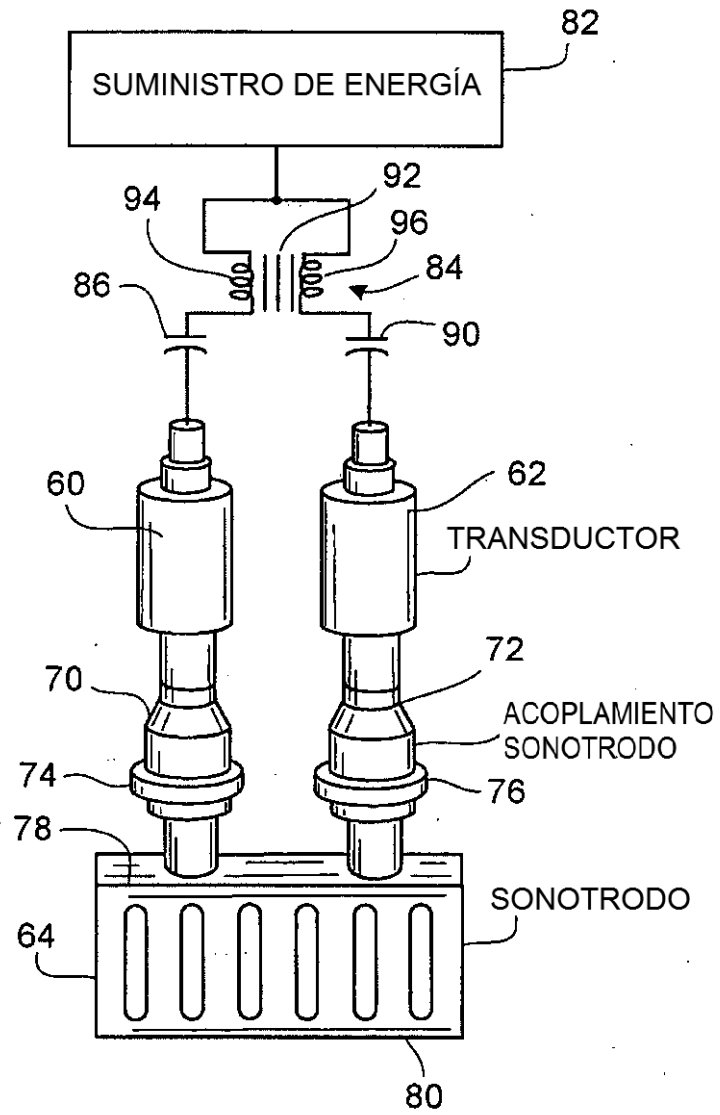


FIG. 13

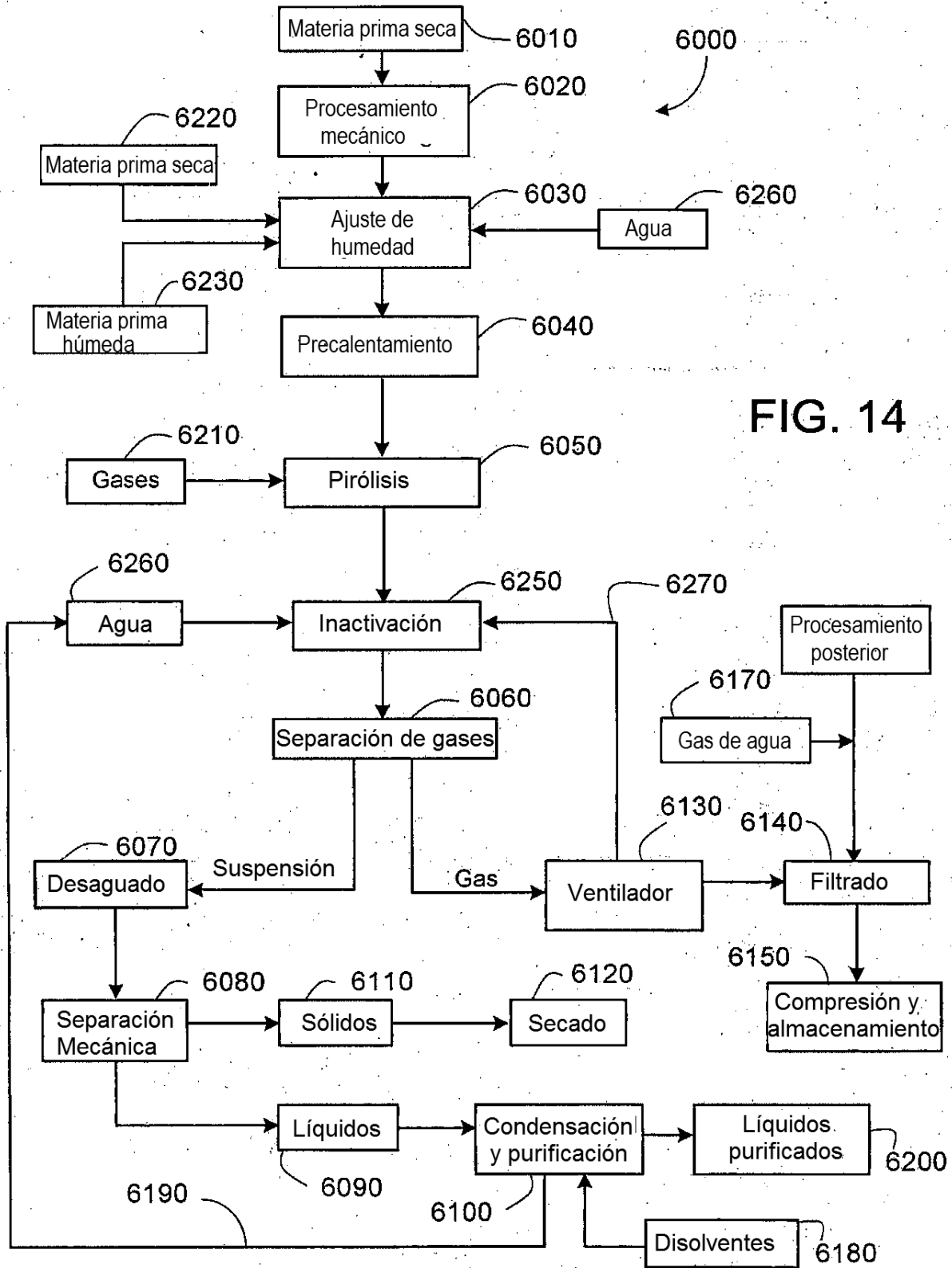


FIG. 14

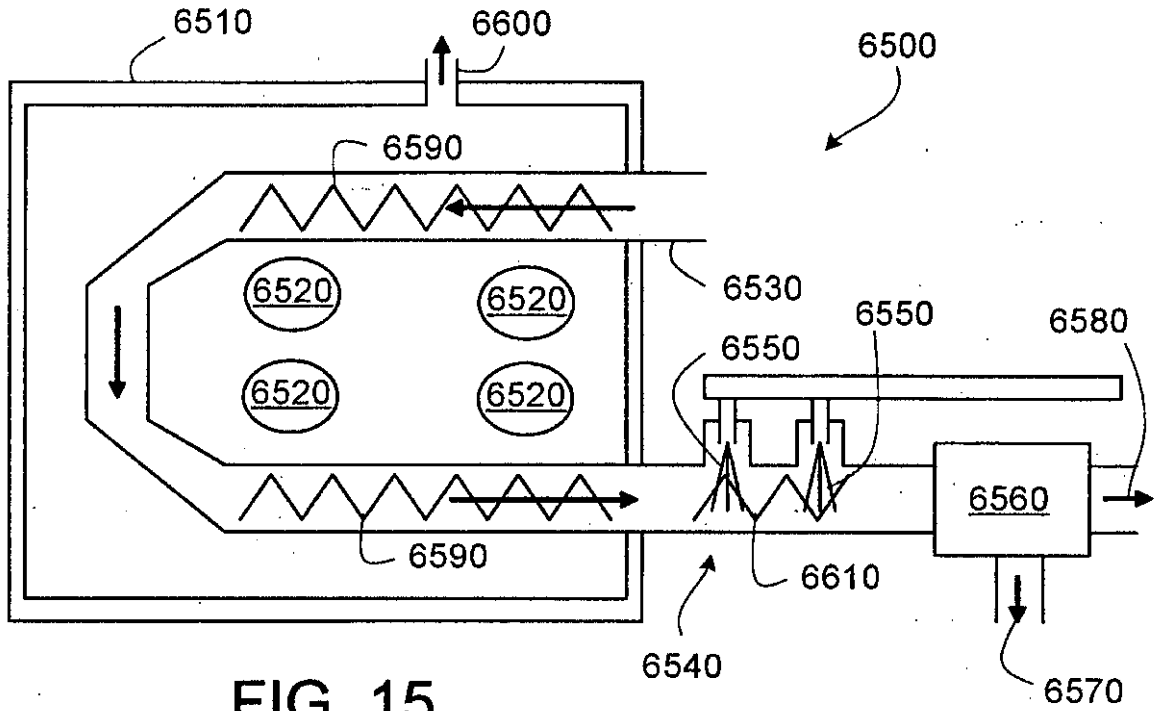


FIG. 15

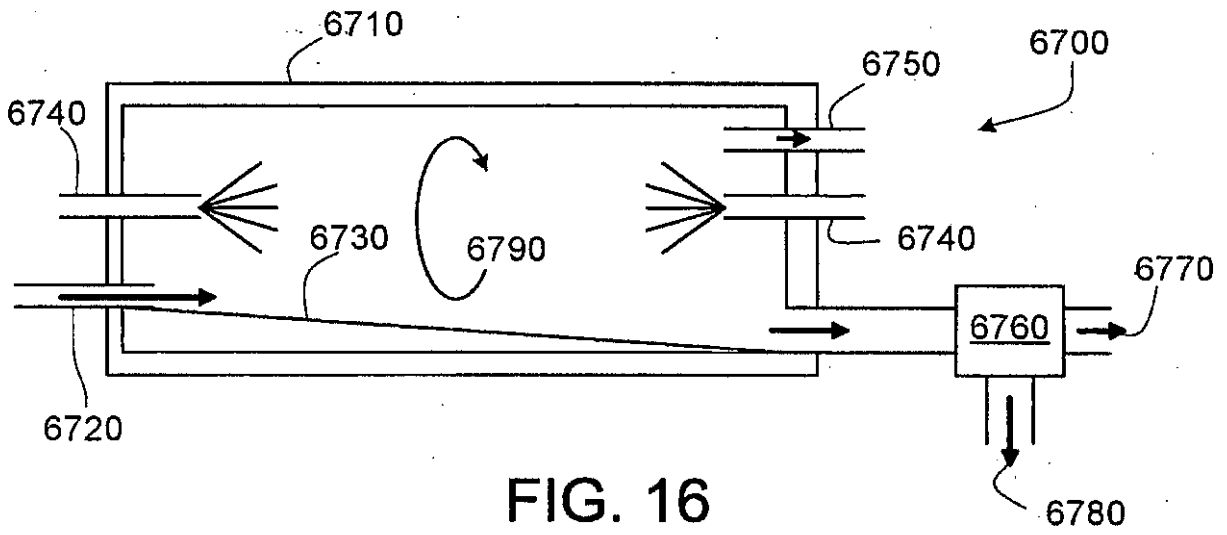


FIG. 16

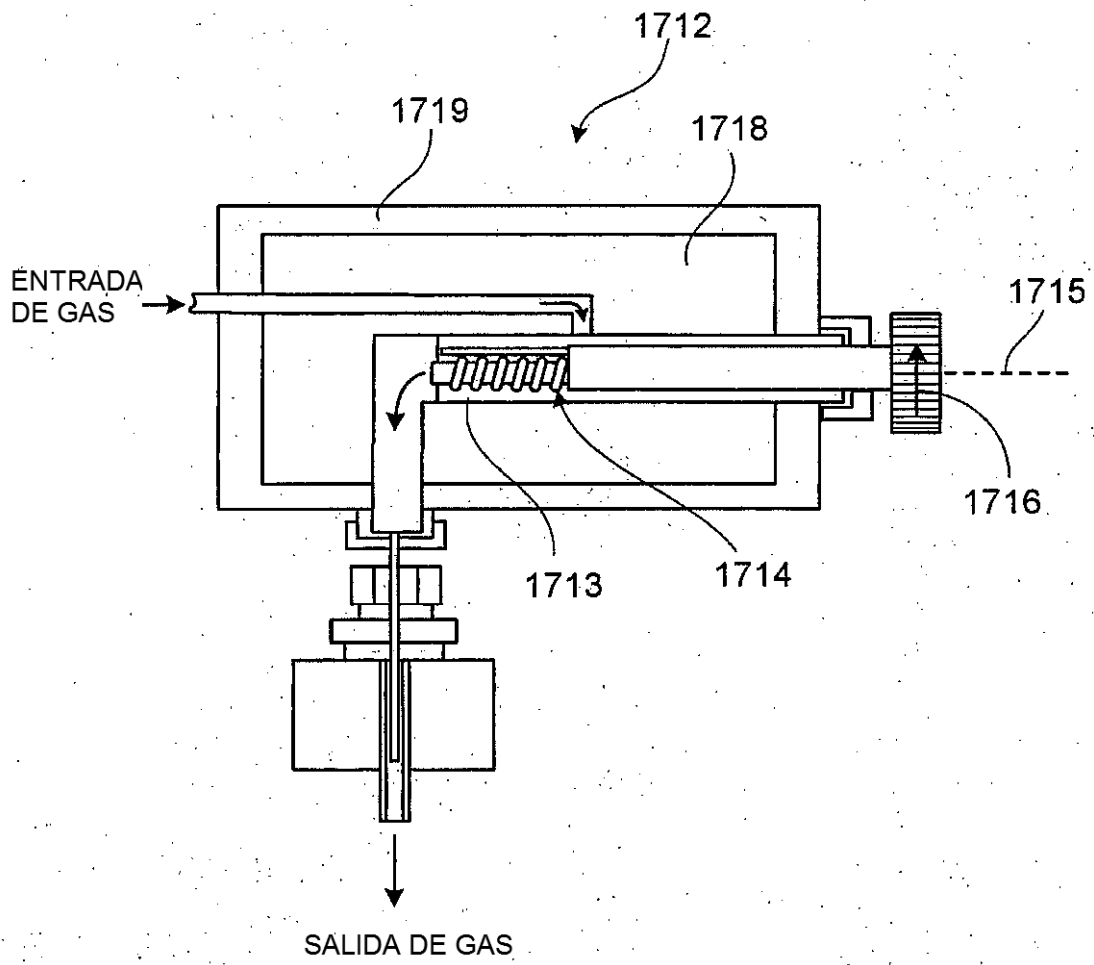


FIG. 17

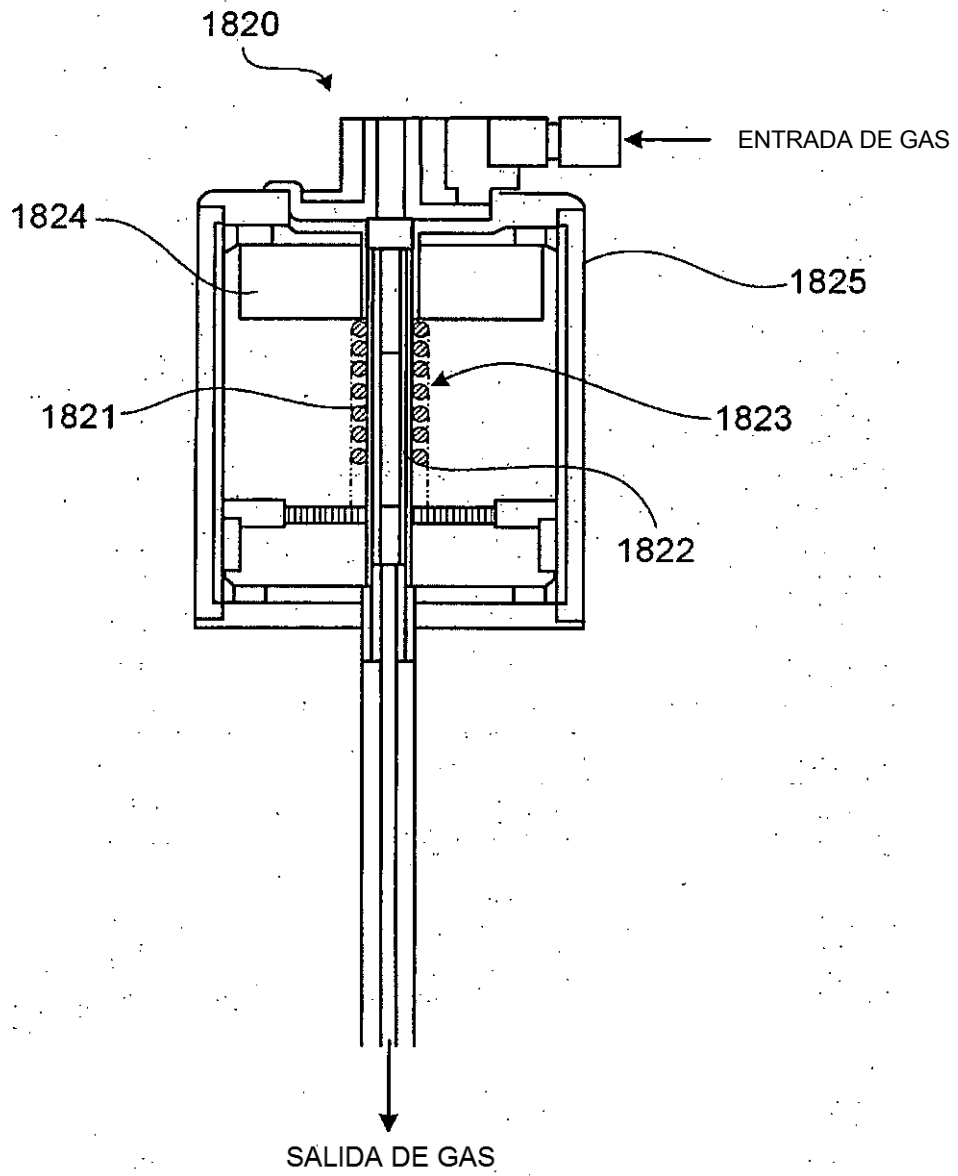


FIG. 18

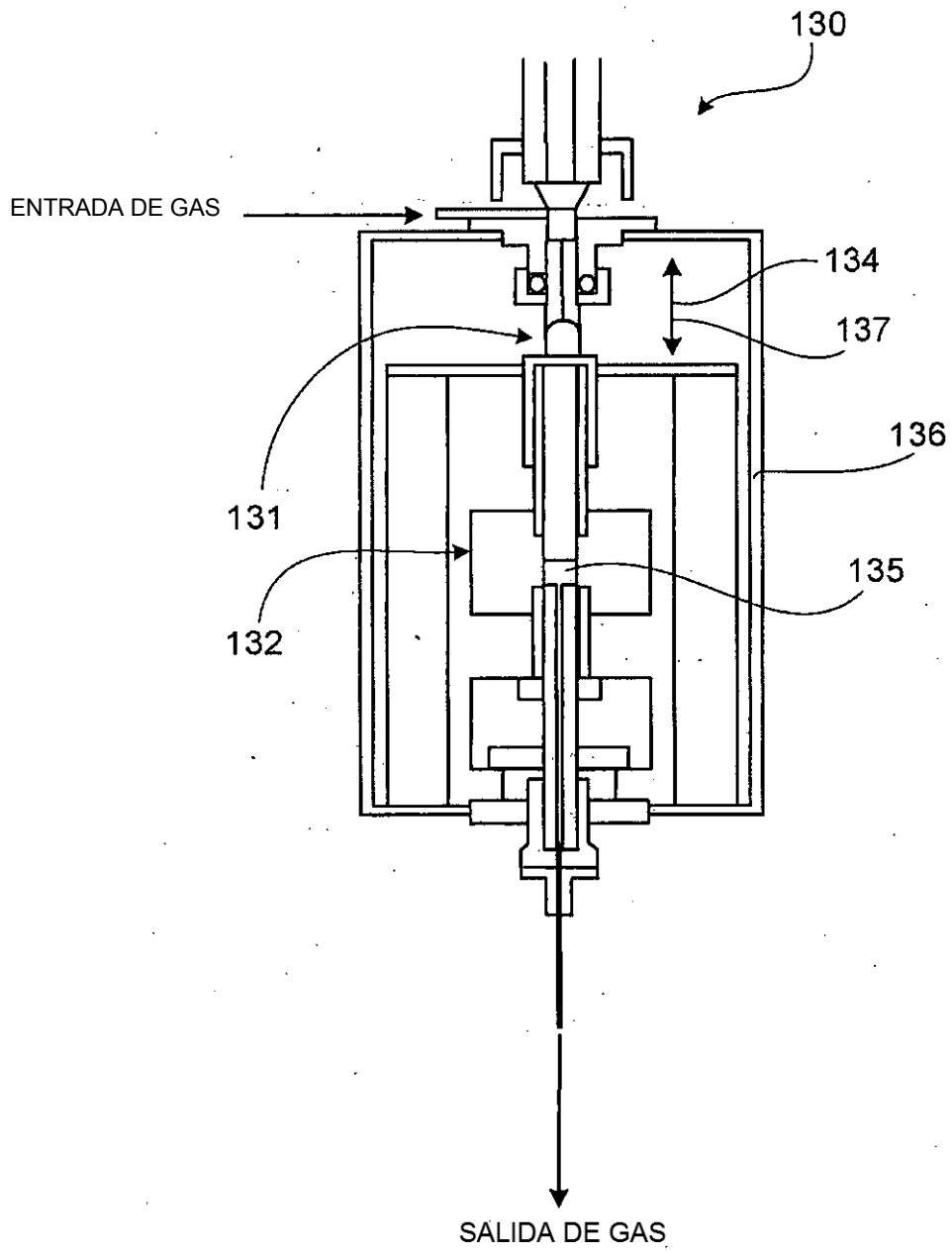


FIG. 19

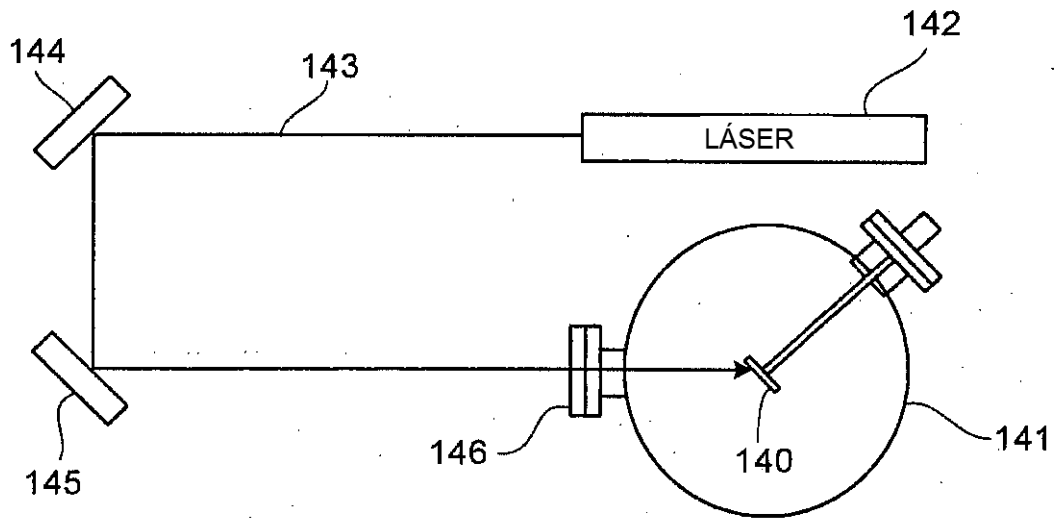


FIG. 20

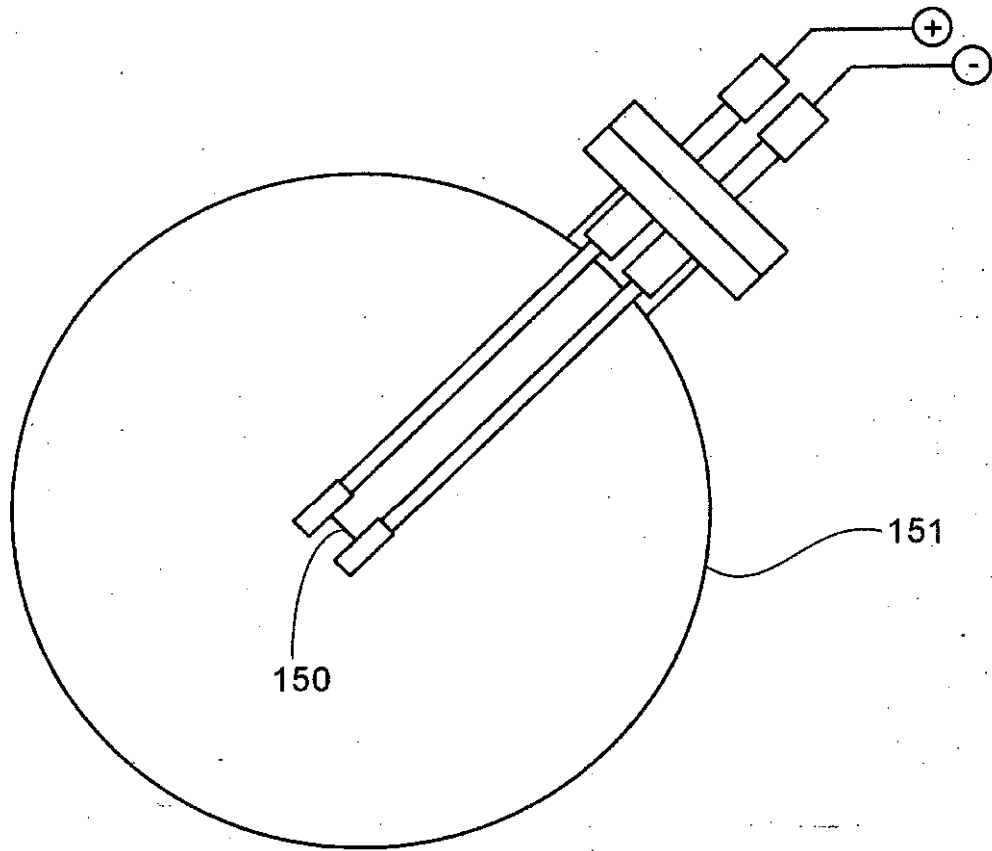


FIG. 21



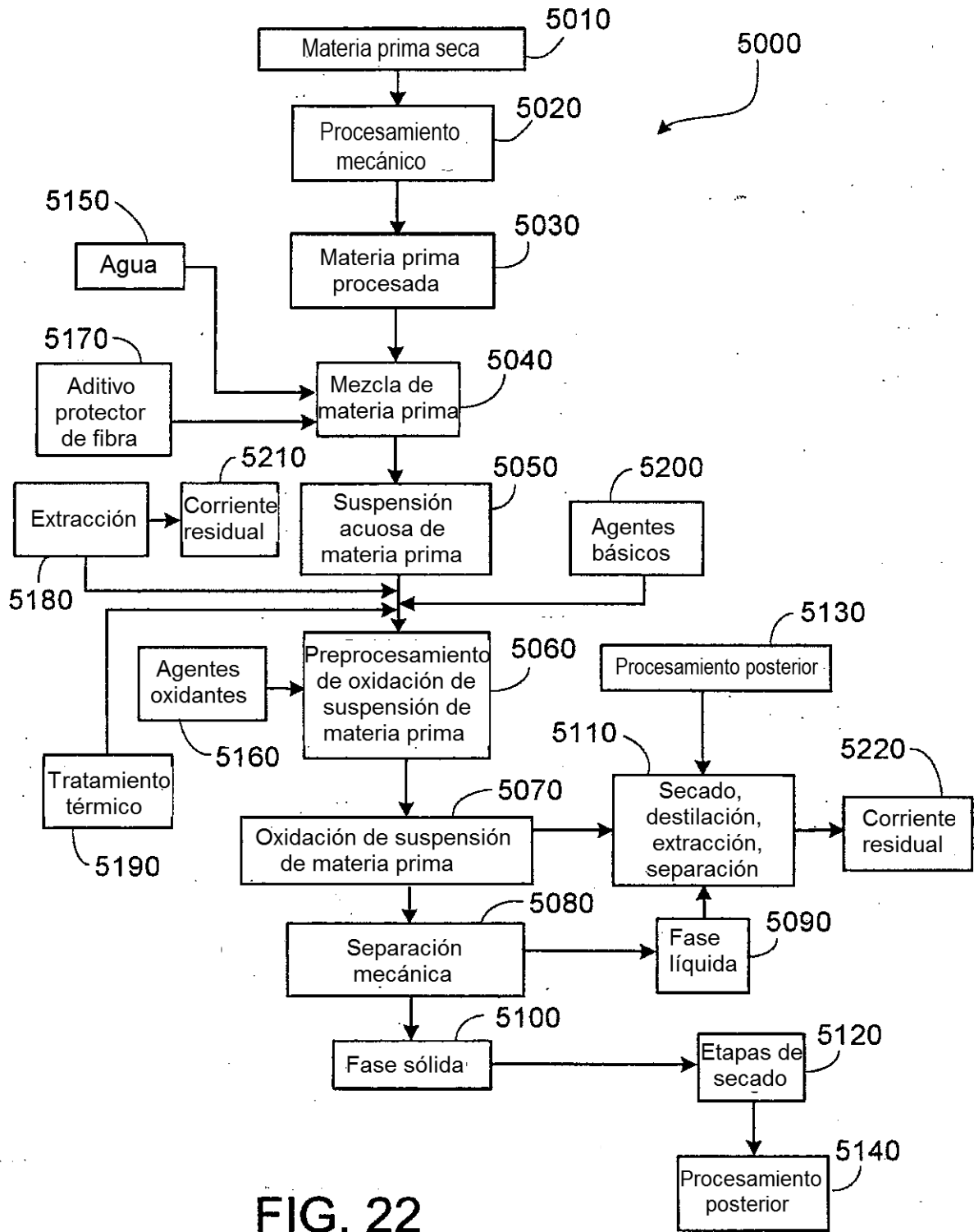


FIG. 22

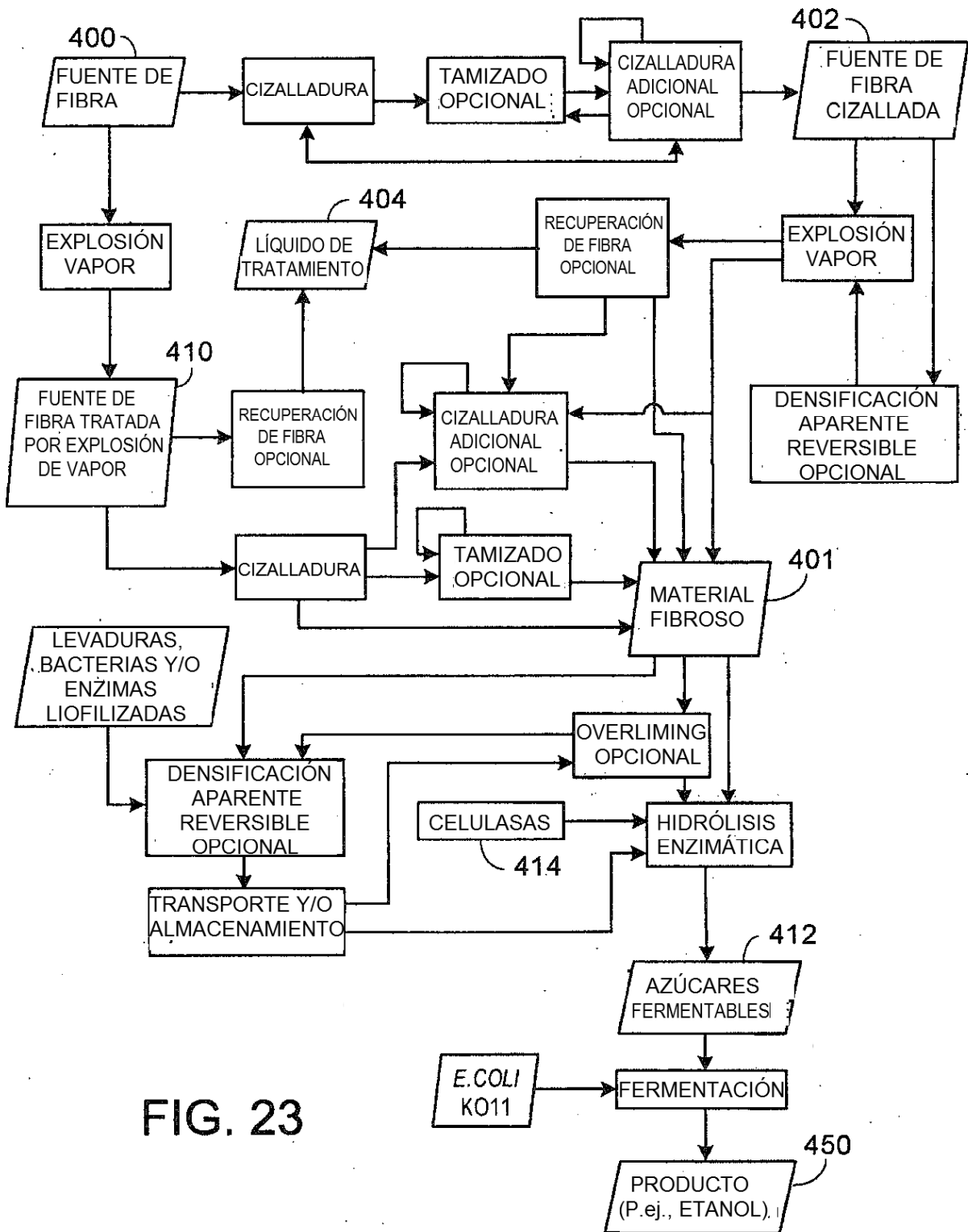


FIG. 23

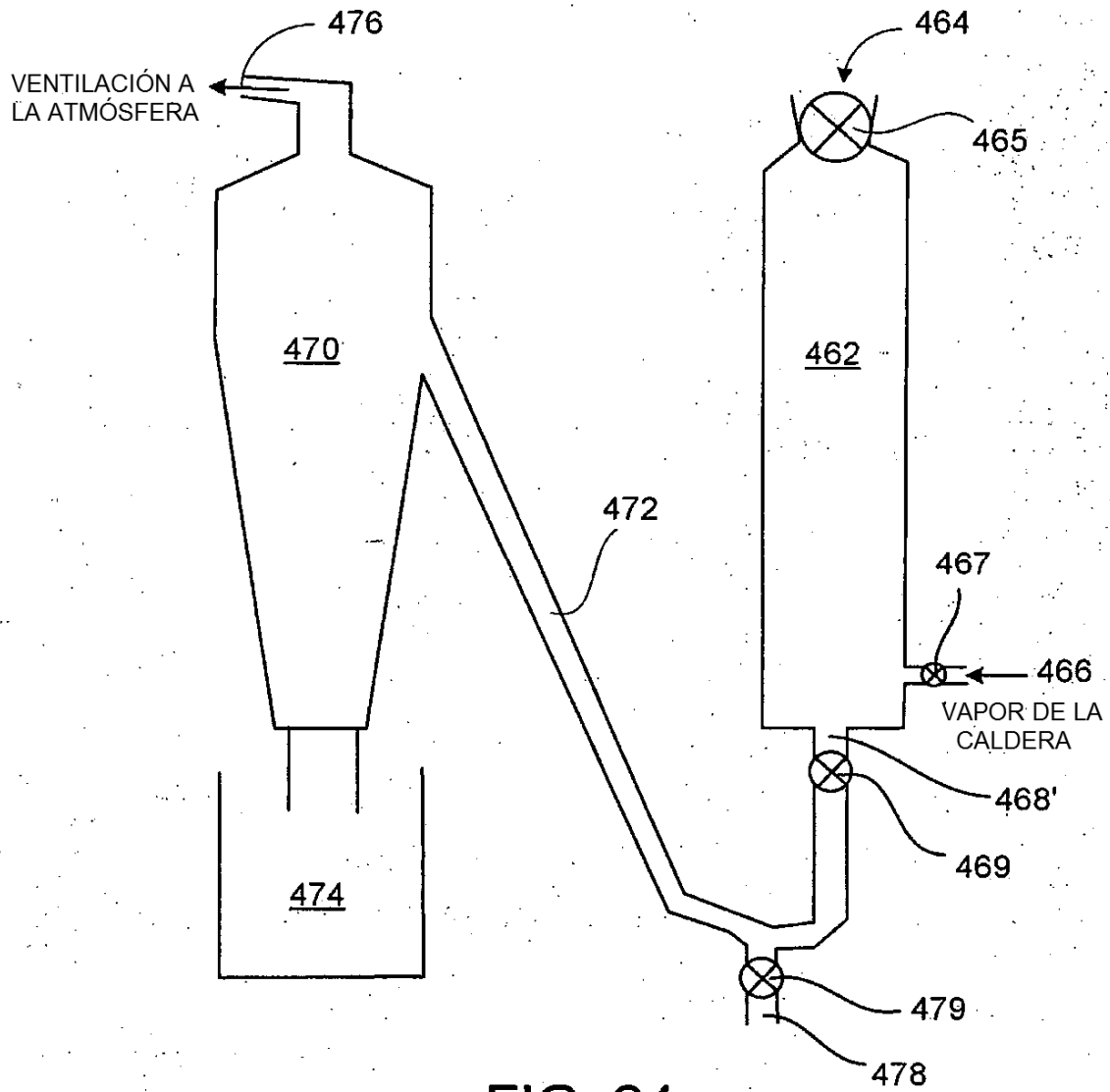


FIG. 24

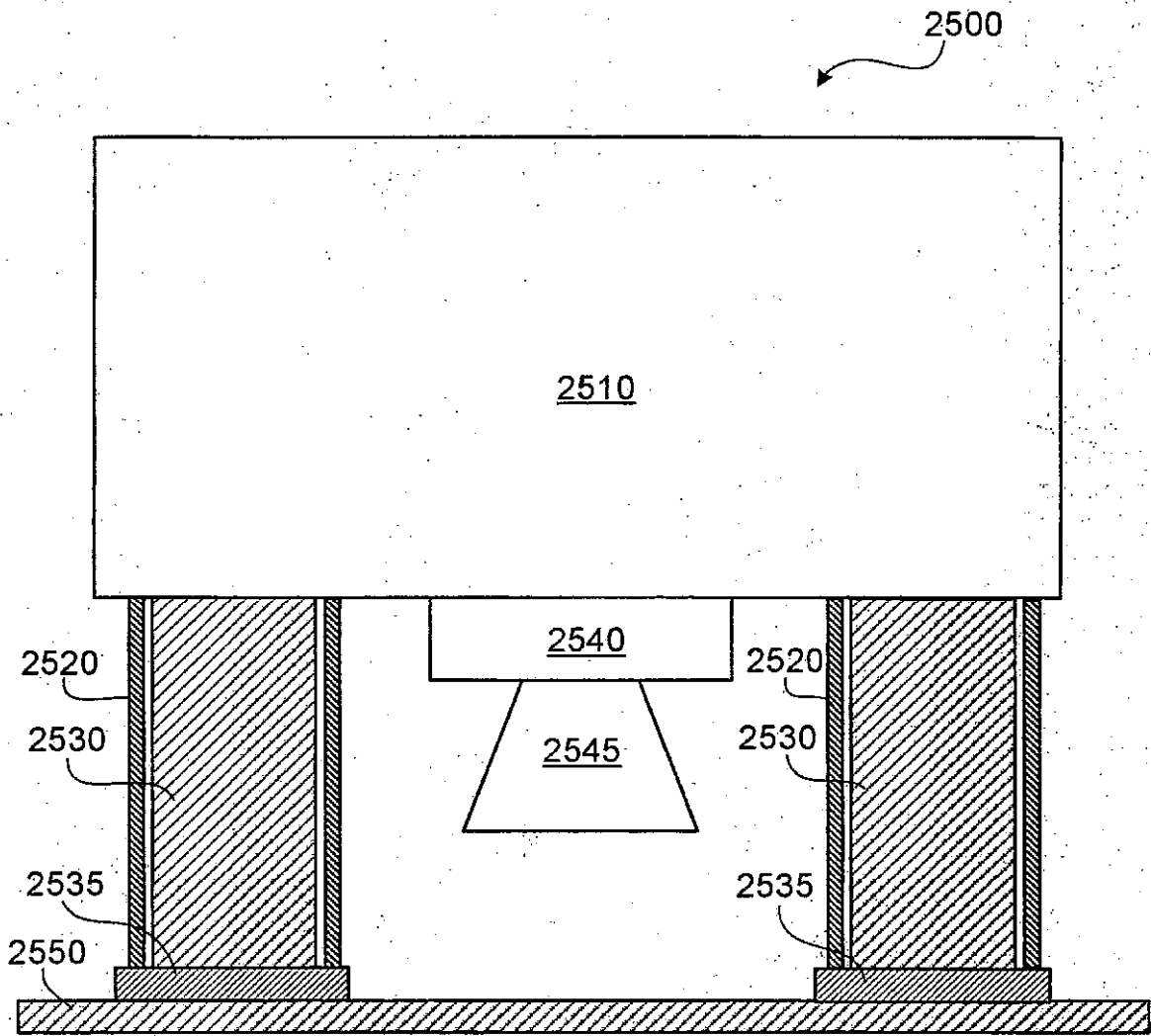


FIG. 25



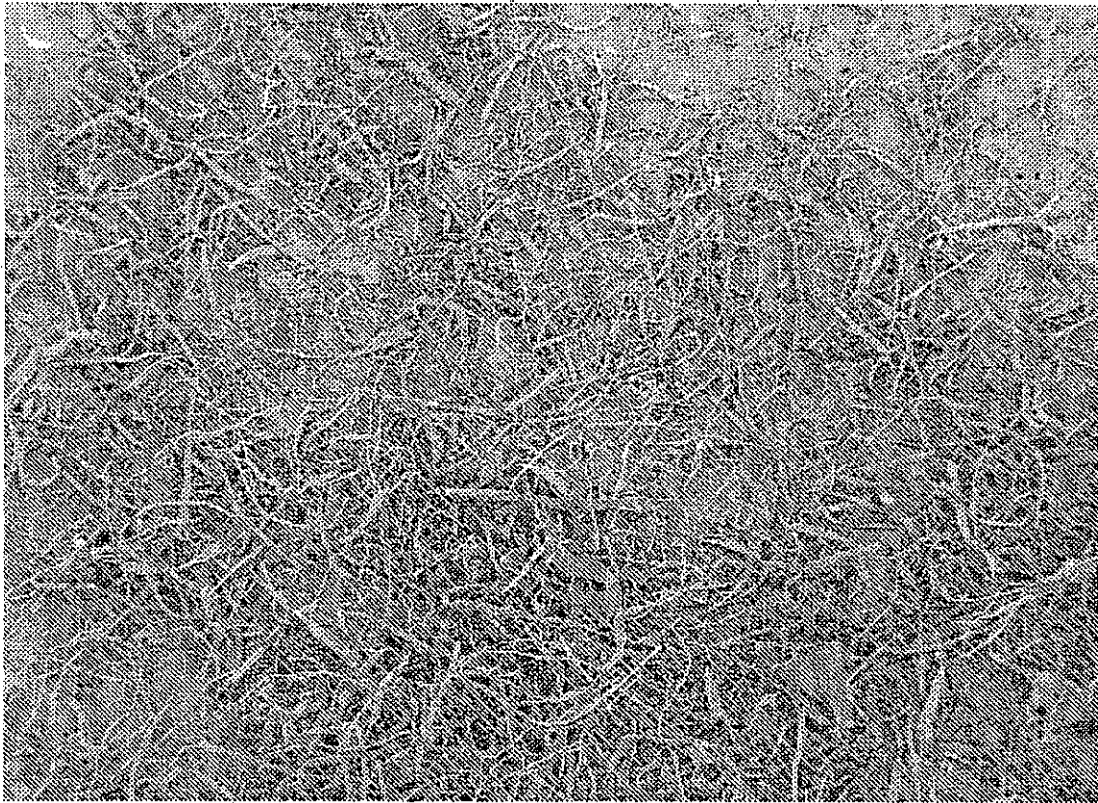
X25 1mm

**FIG. 26**



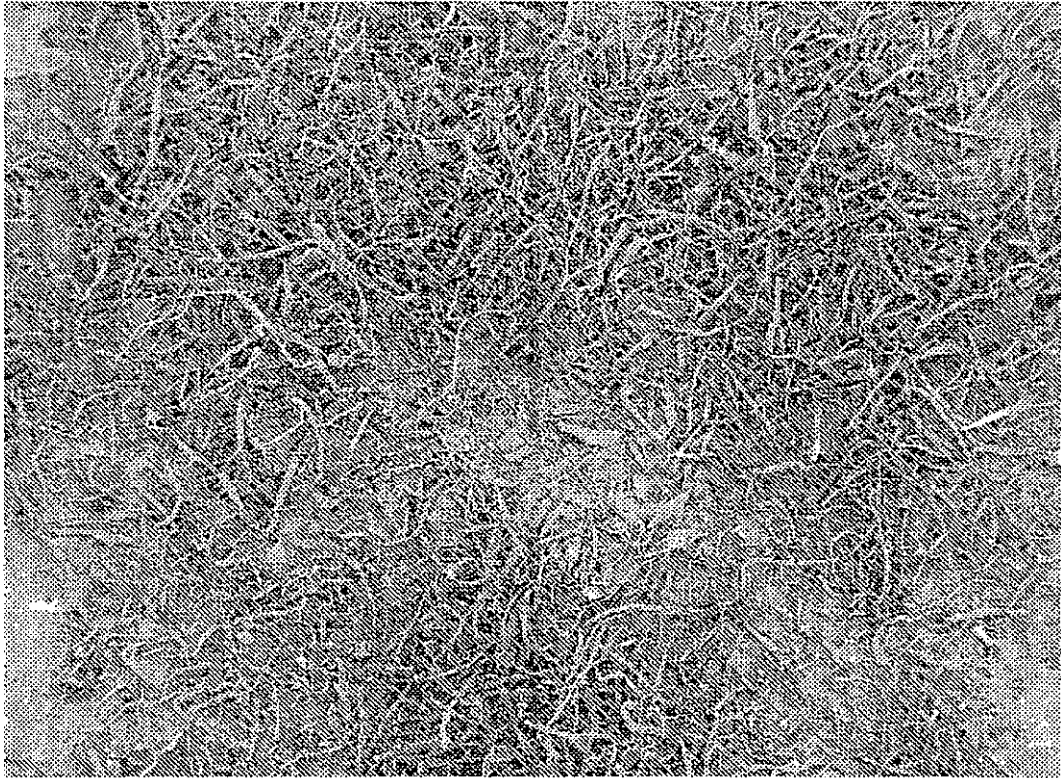
X25 1mm

FIG. 27



X25 1mm

**FIG. 28**



X25 1mm

FIG. 29



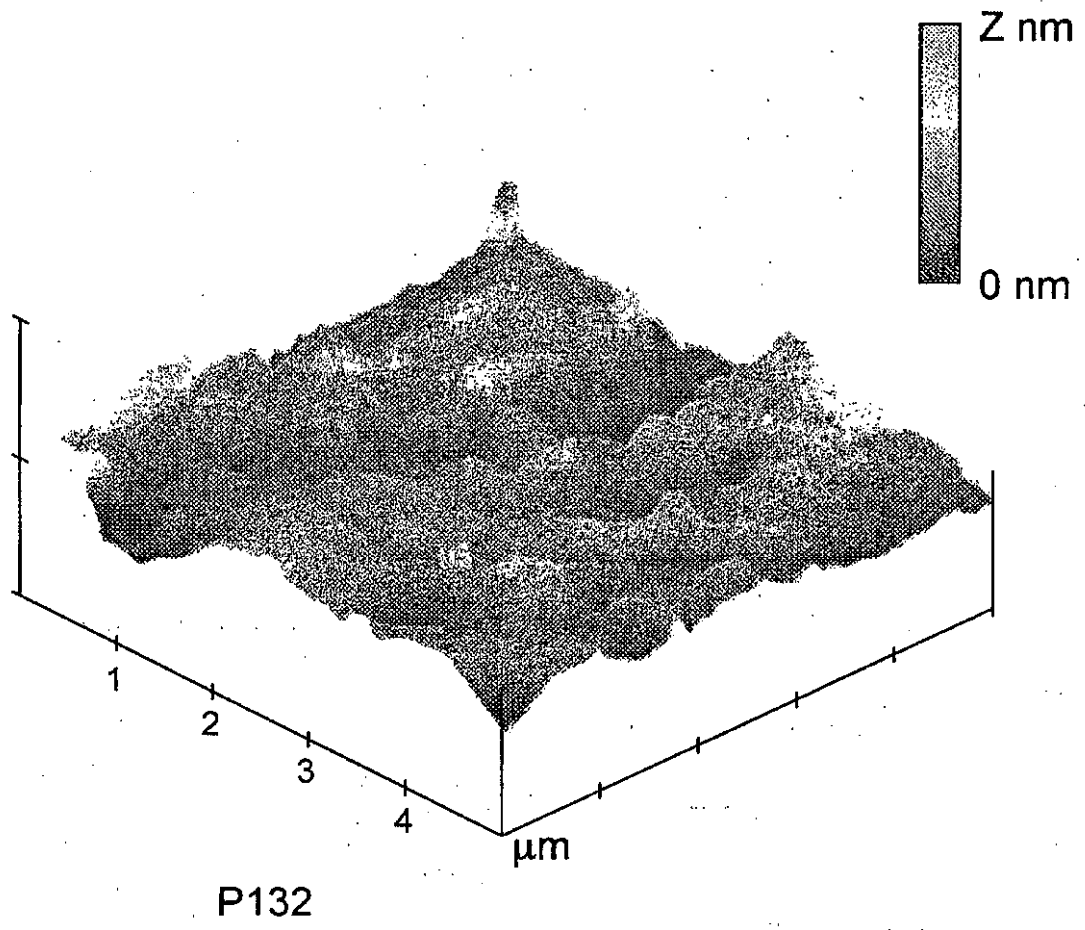


FIG. 29A

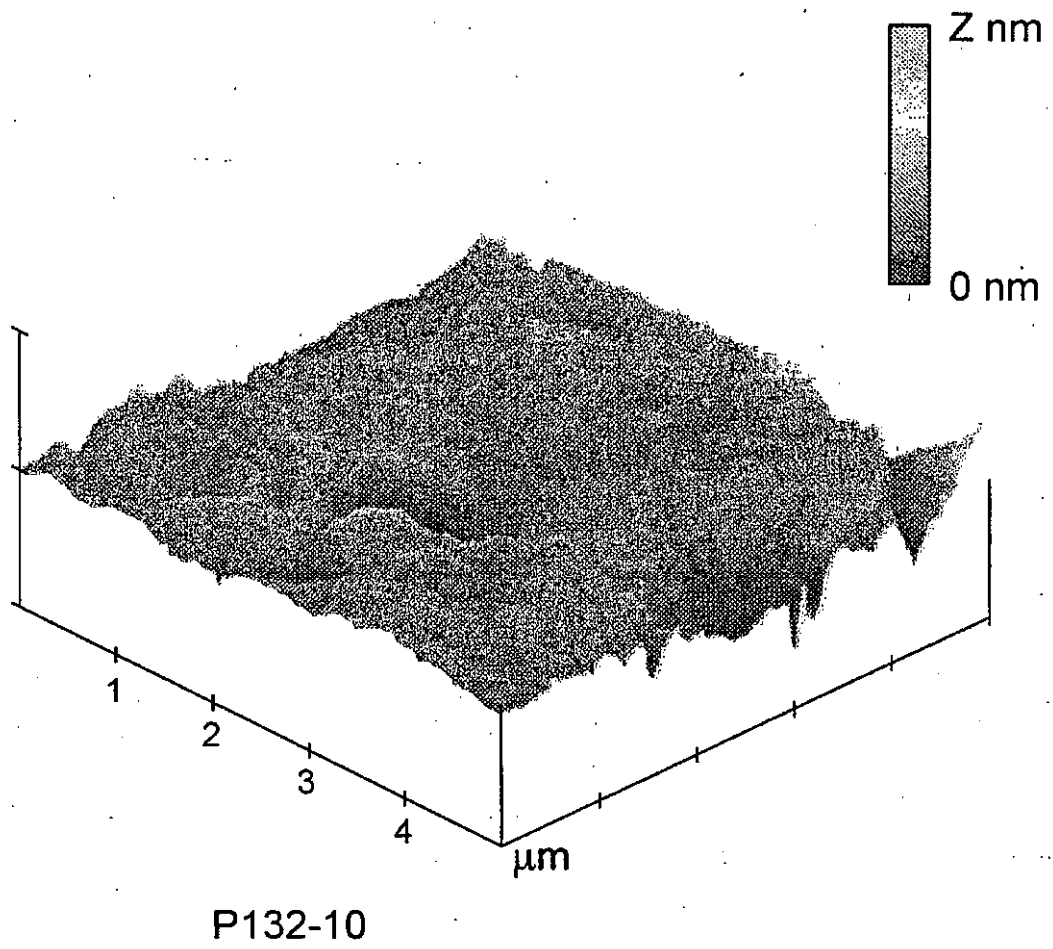
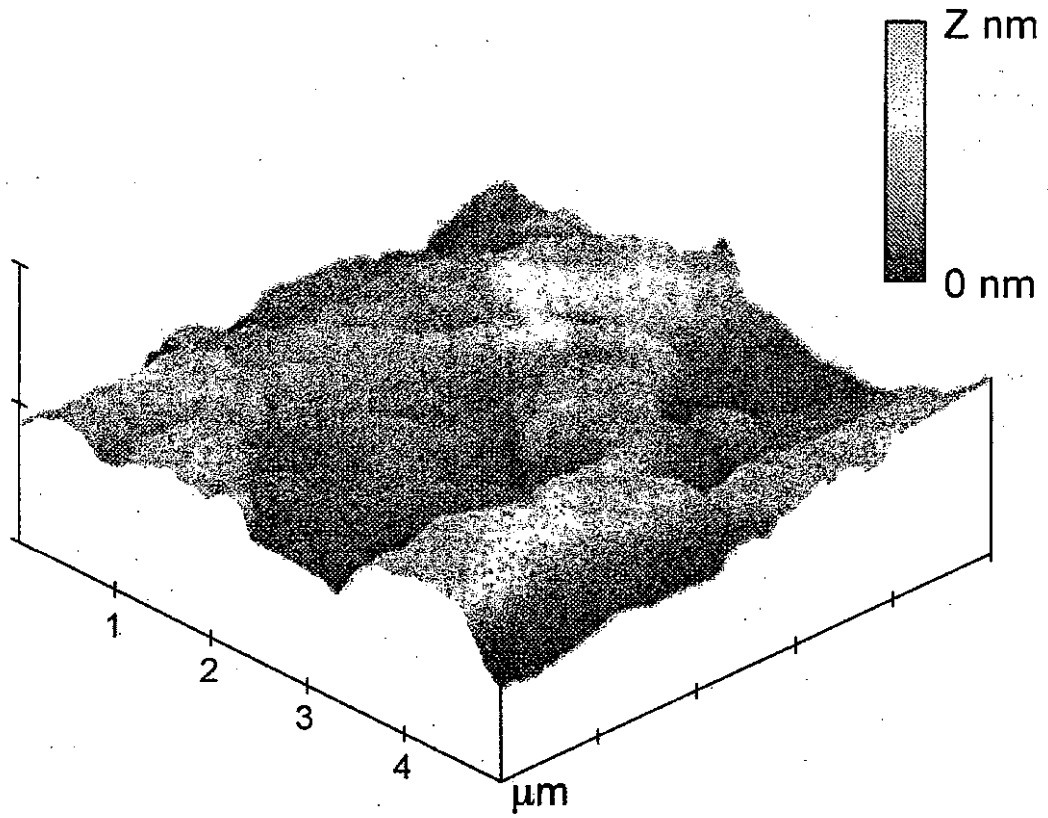


FIG. 29B



P132-100

FIG. 29C

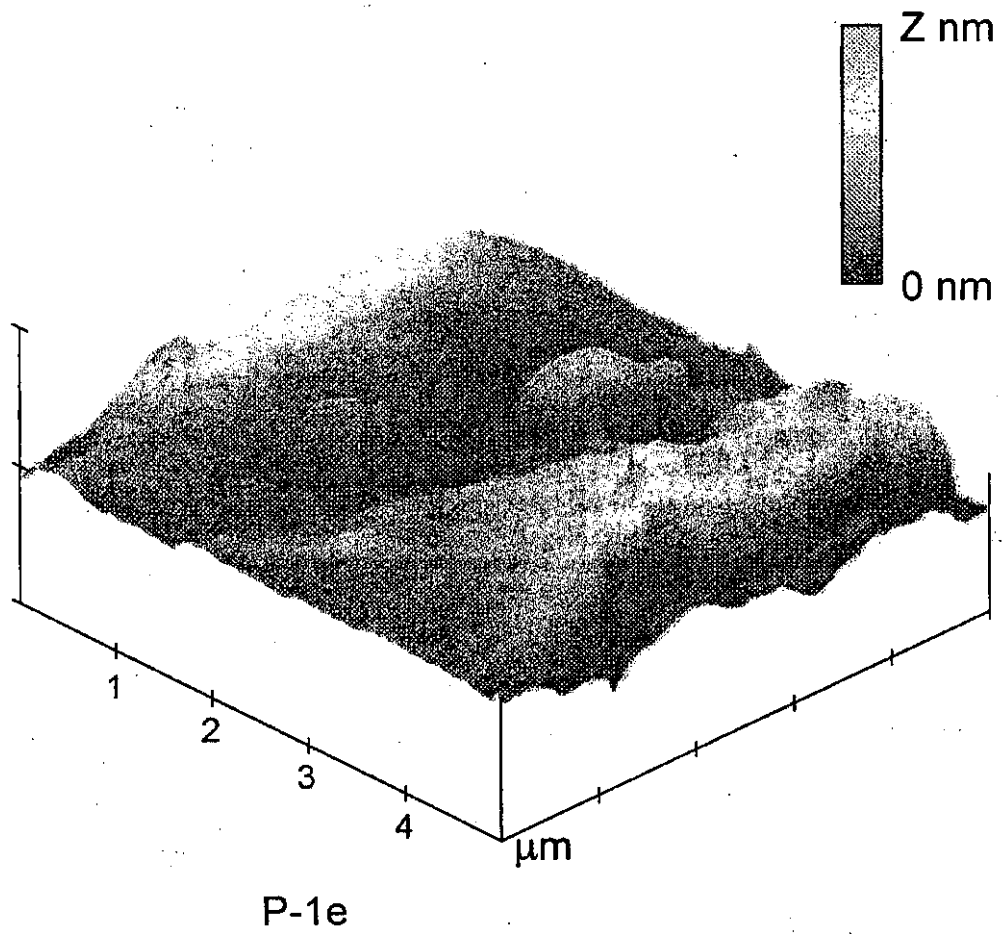


FIG. 29D

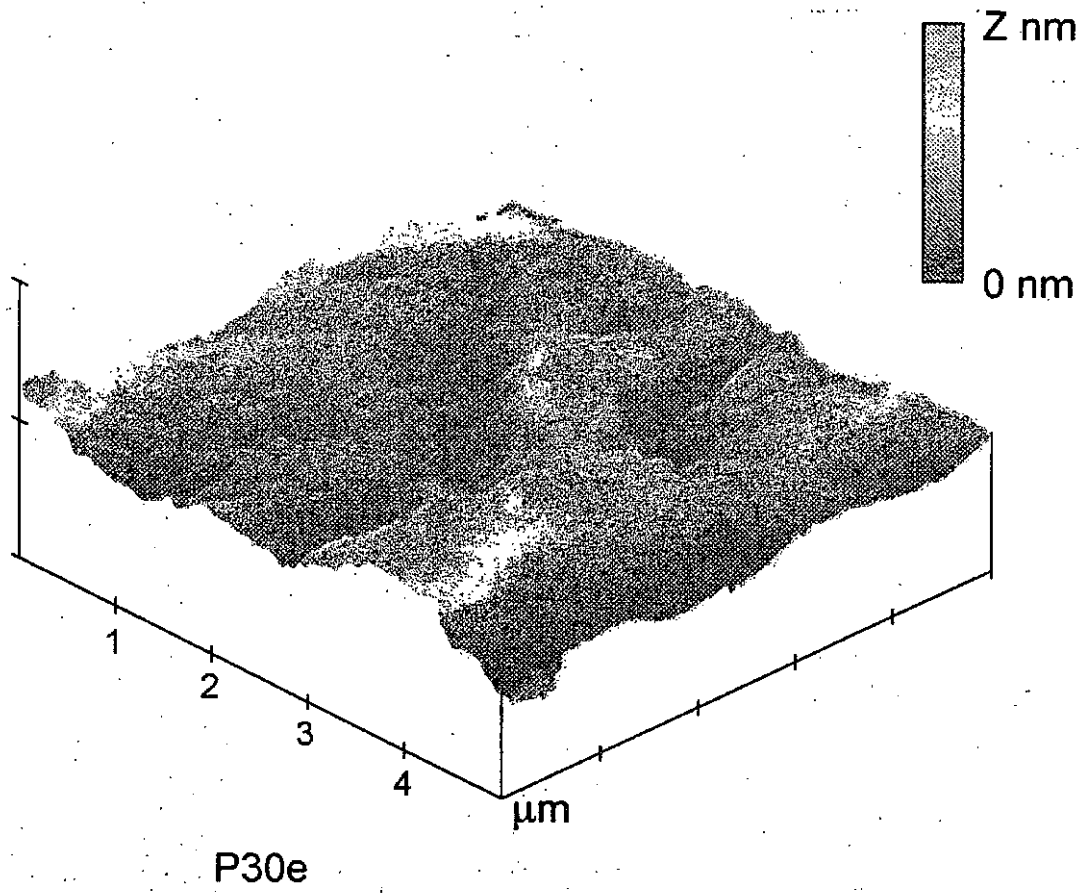


FIG. 29E

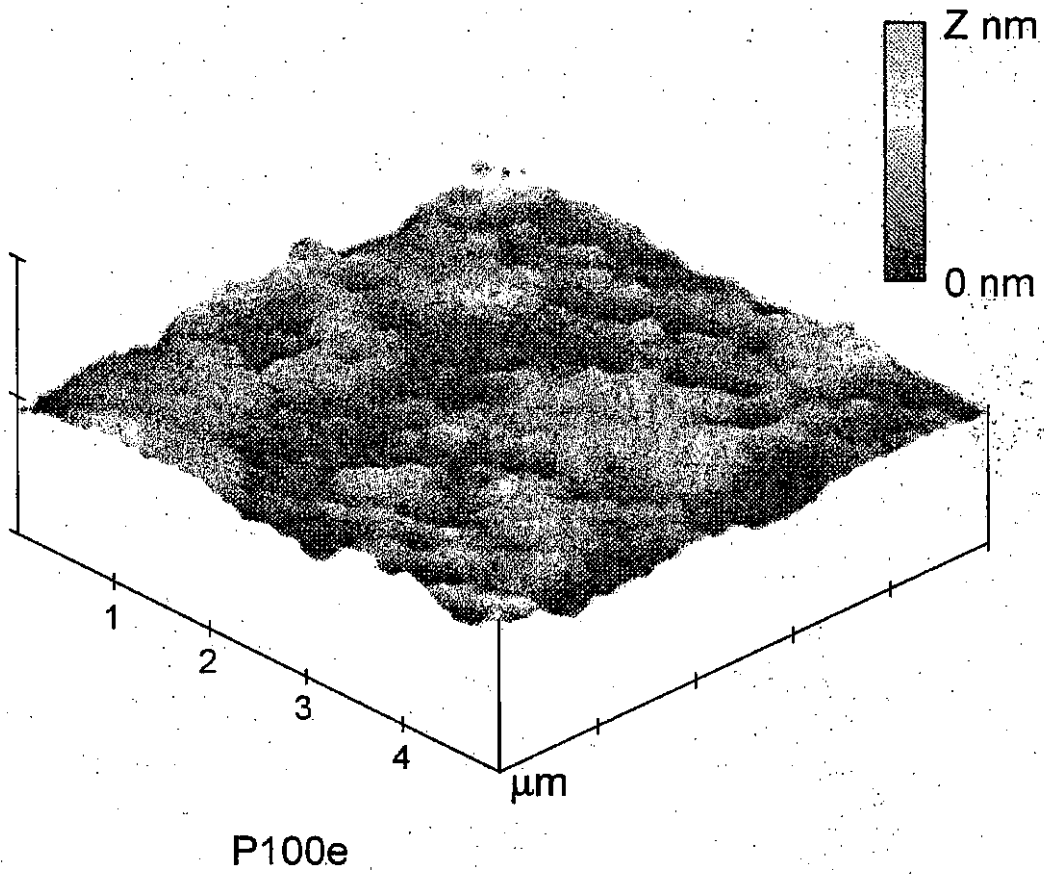


FIG. 29F

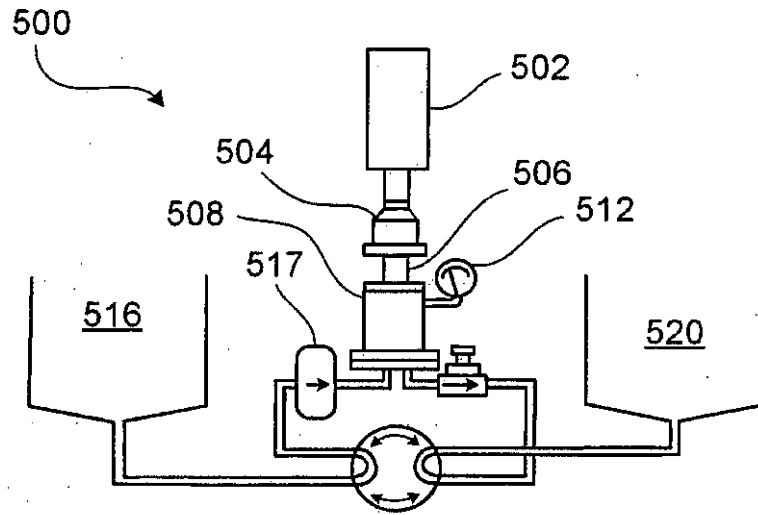


FIG. 30

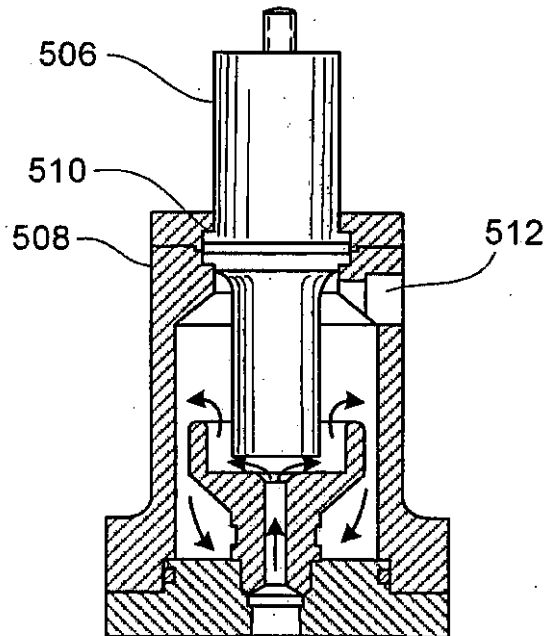
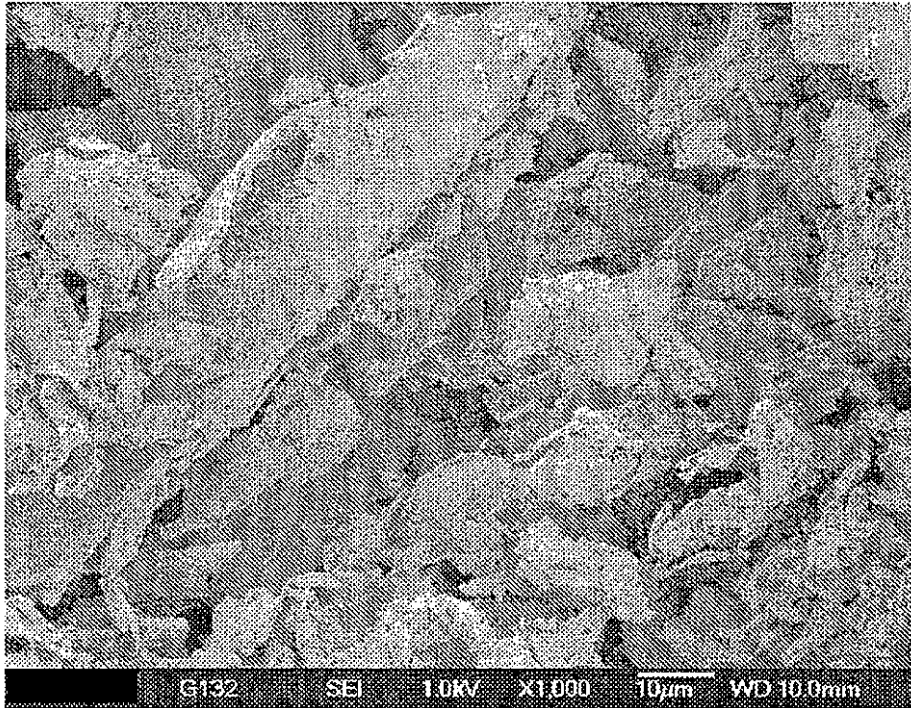
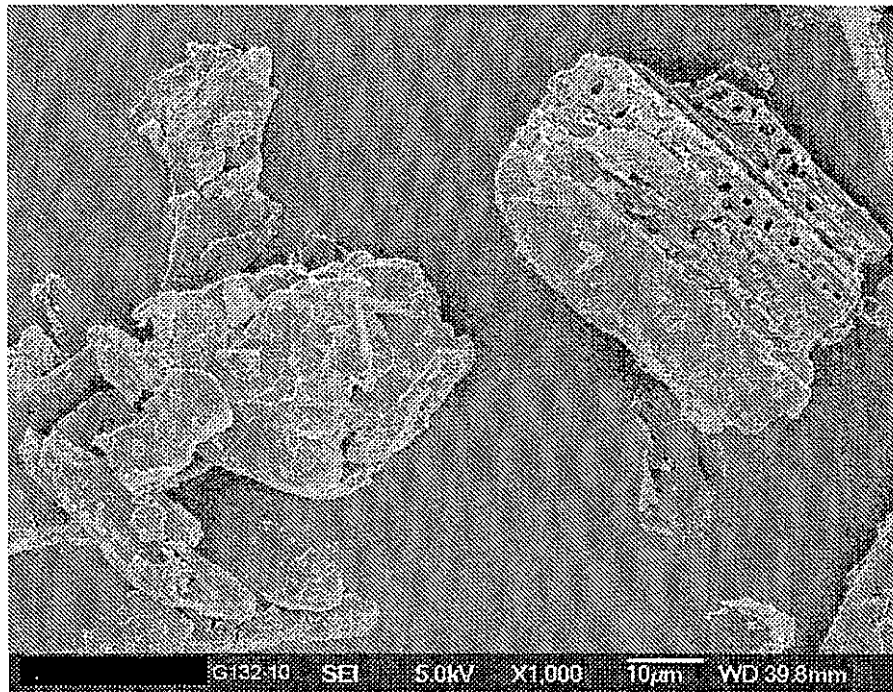


FIG. 31

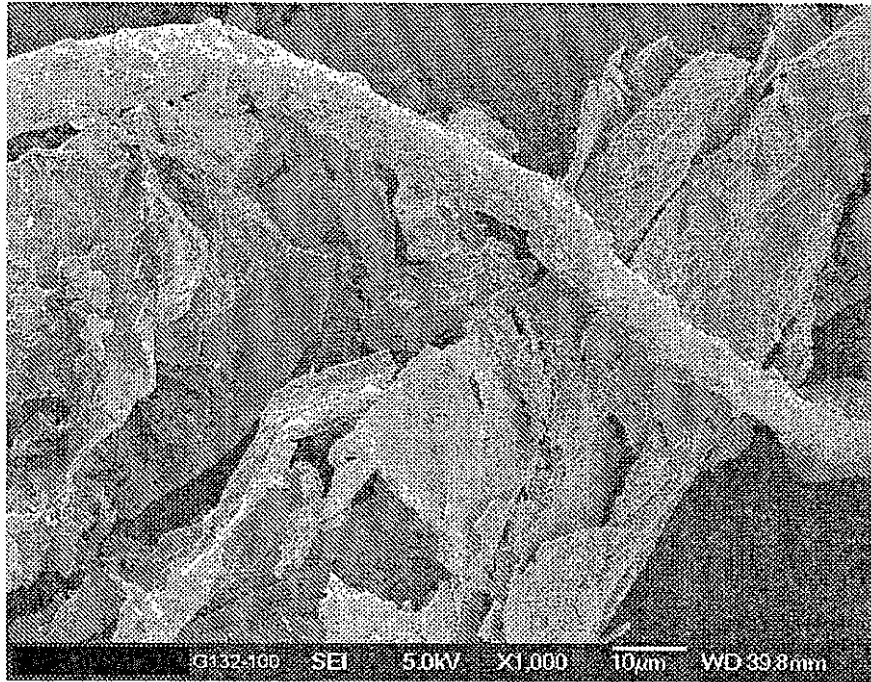


**FIG. 32**

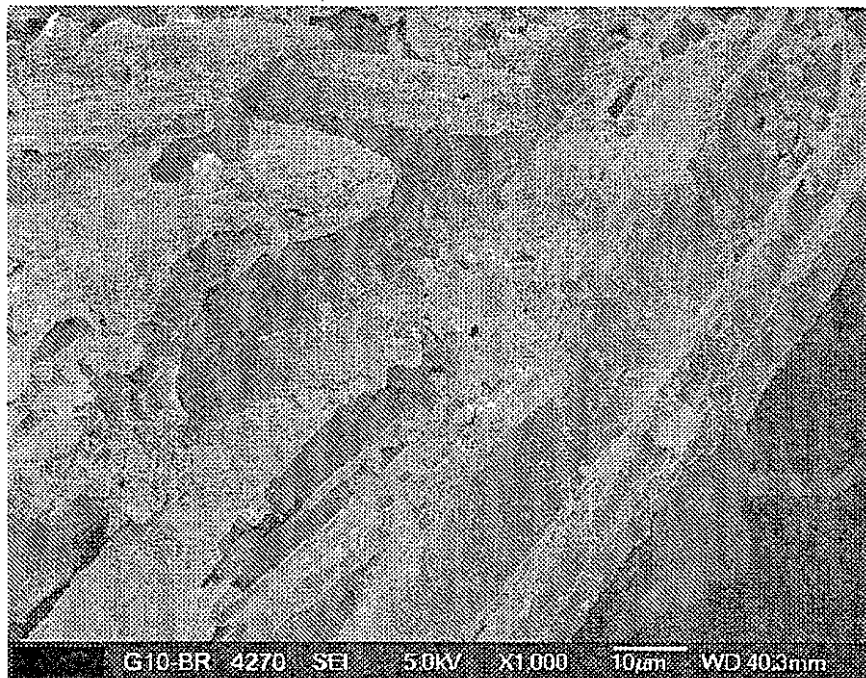


**FIG. 33**





**FIG. 34**



**FIG. 35**

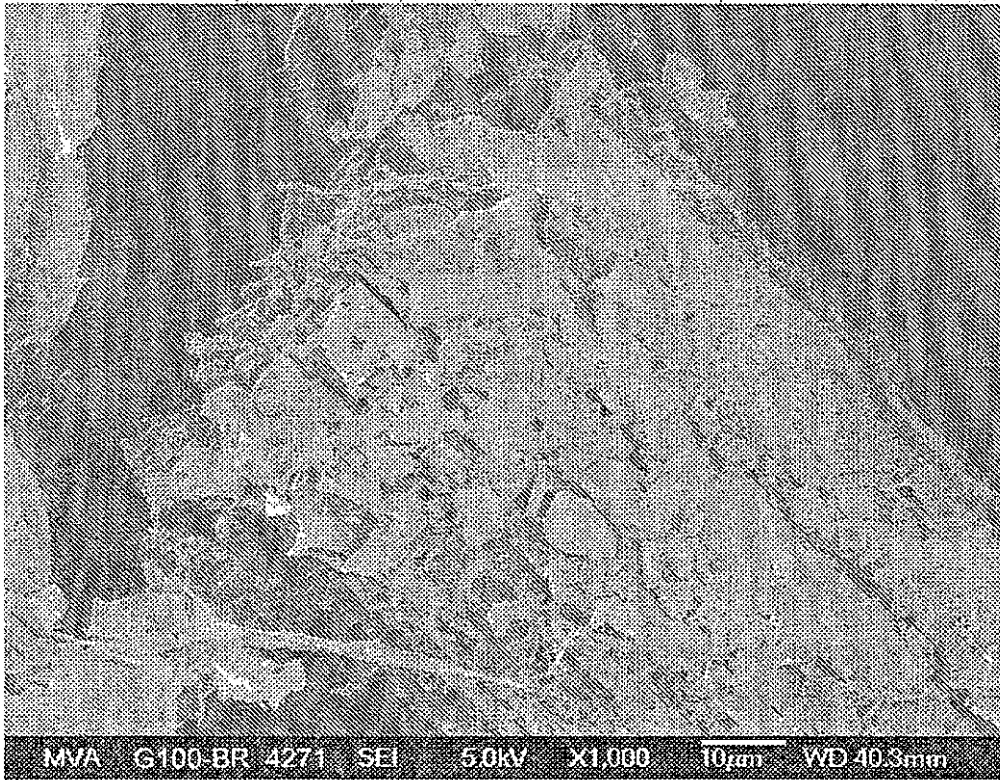
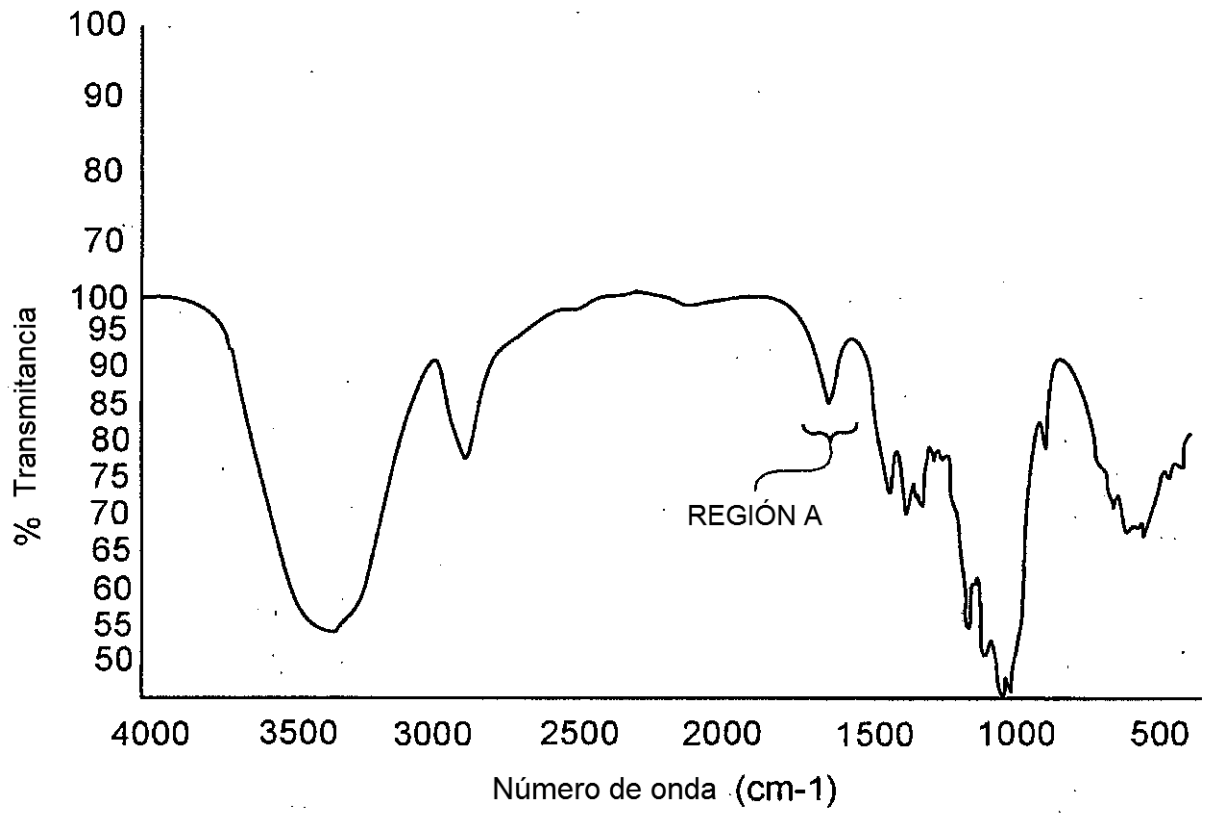
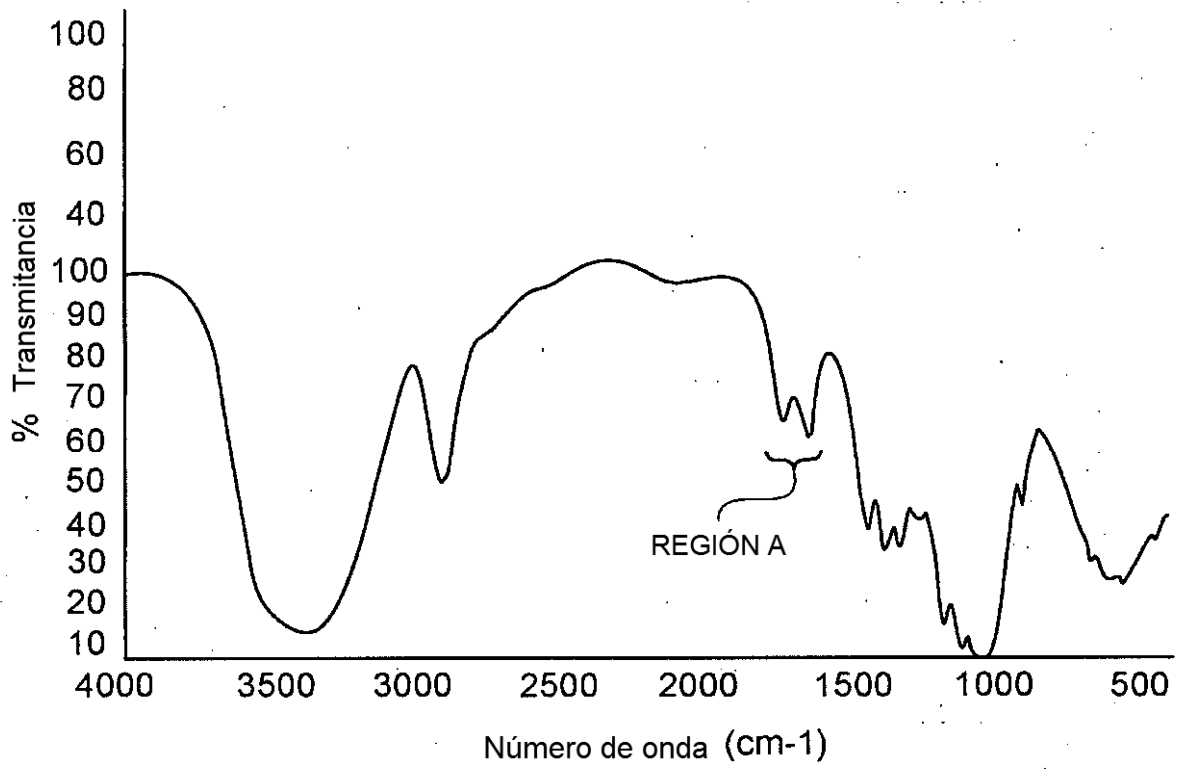


FIG. 36



**FIG. 37**



**FIG. 38**

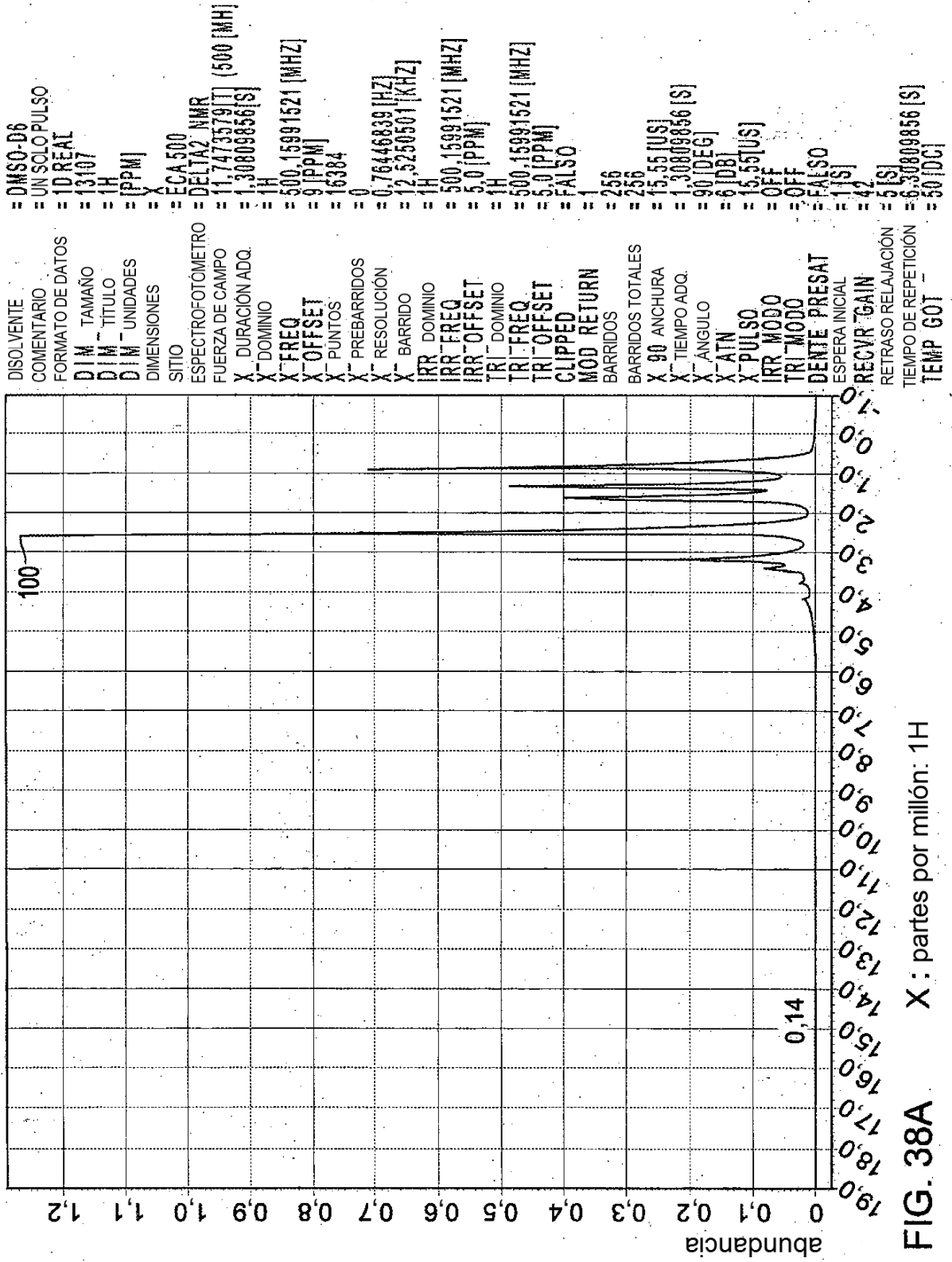


FIG. 38A X: partes por millón: 1H

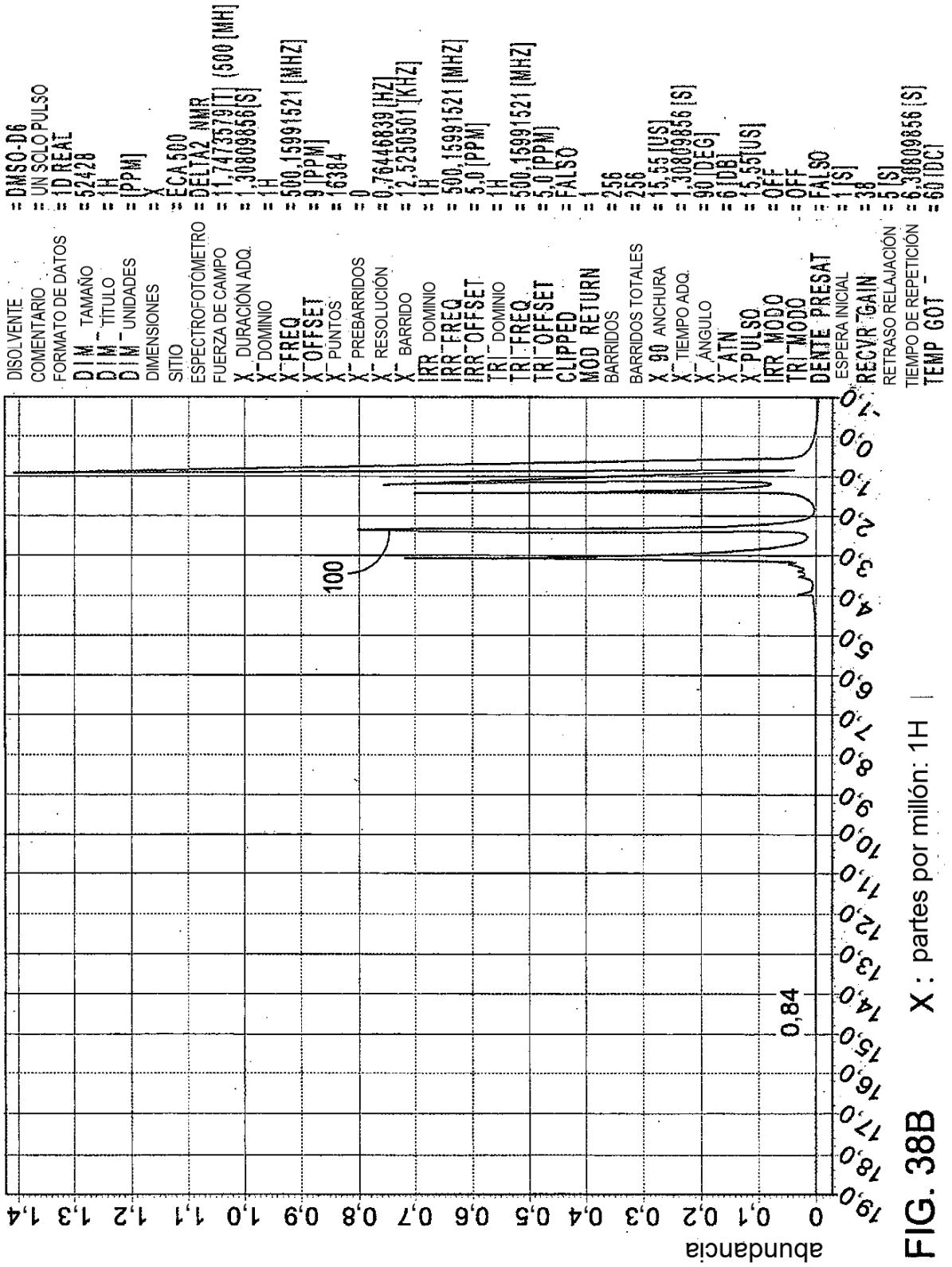
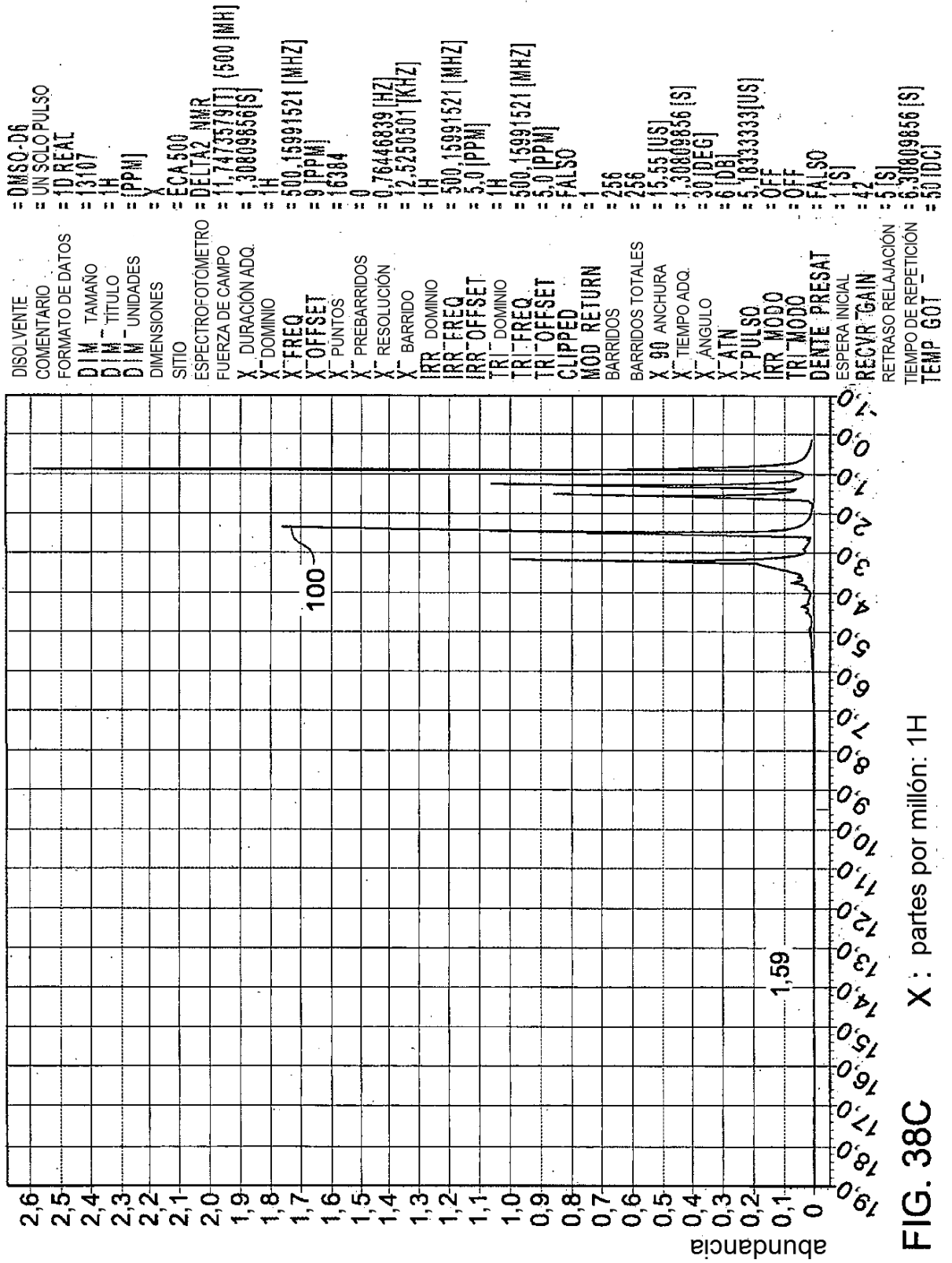


FIG. 38B X : partes por millón: 1H |



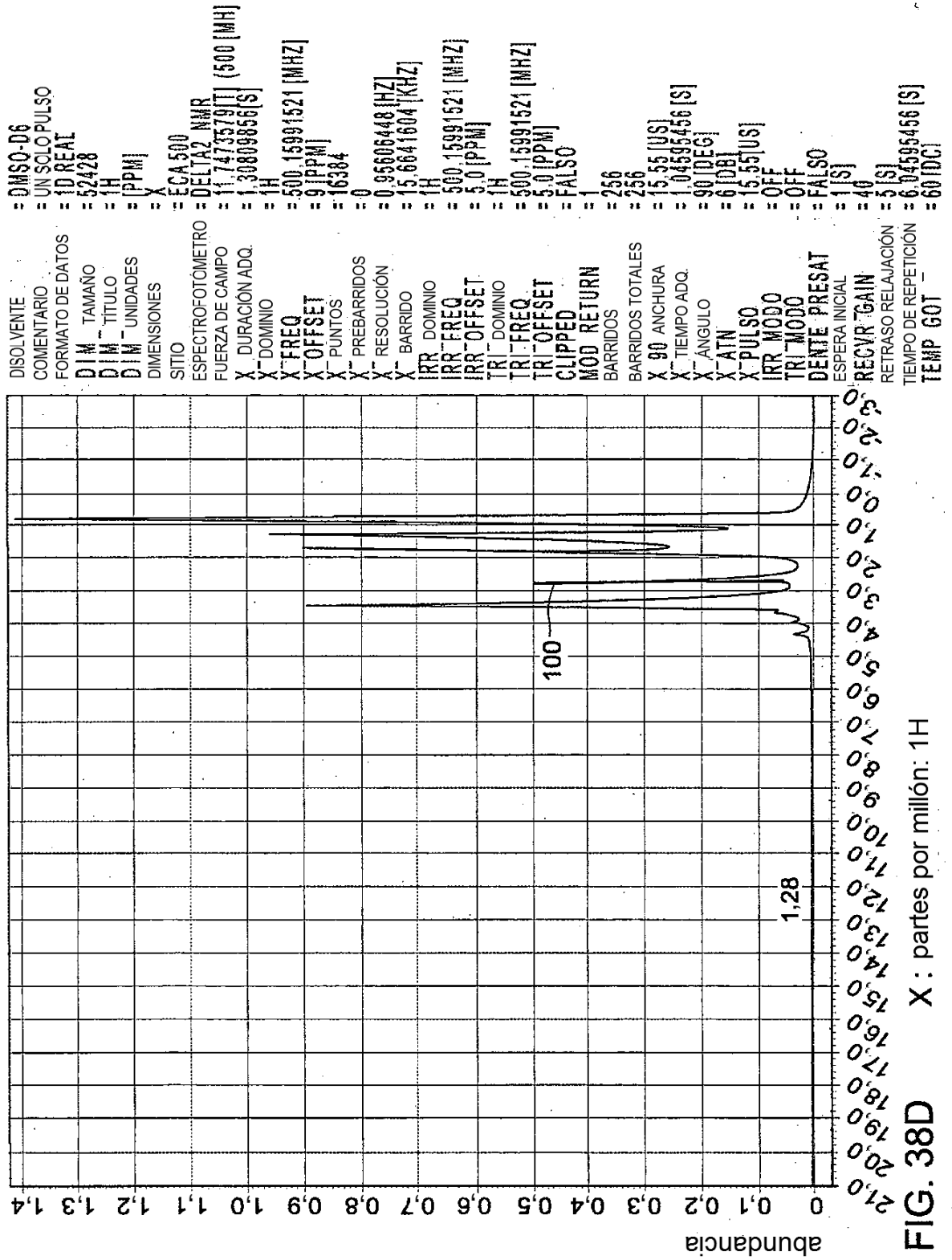


FIG. 38D X : partes por millón: 1H



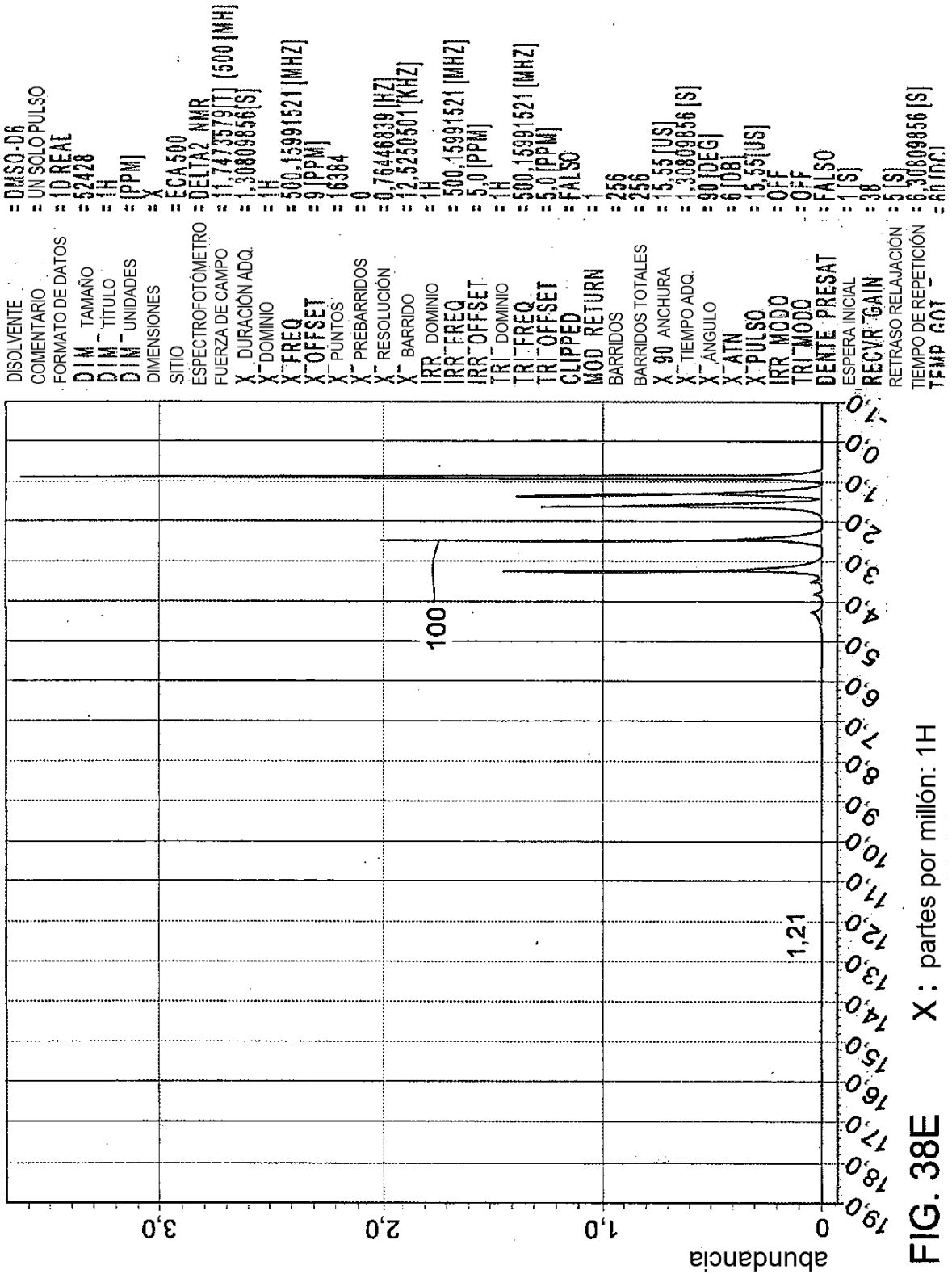


FIG. 38E X: partes por millón: 1H

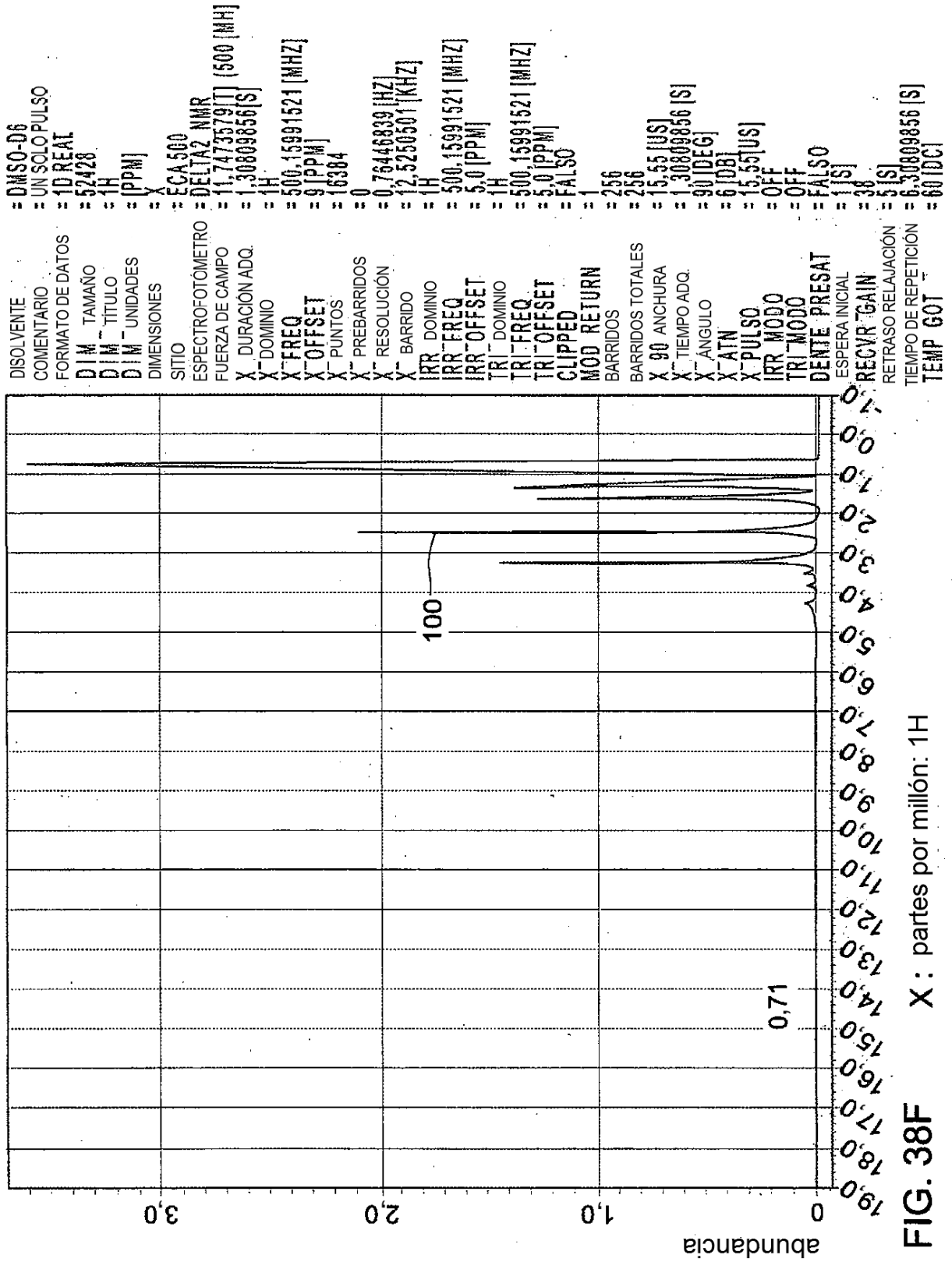


FIG. 38F X: partes por millón: 1H

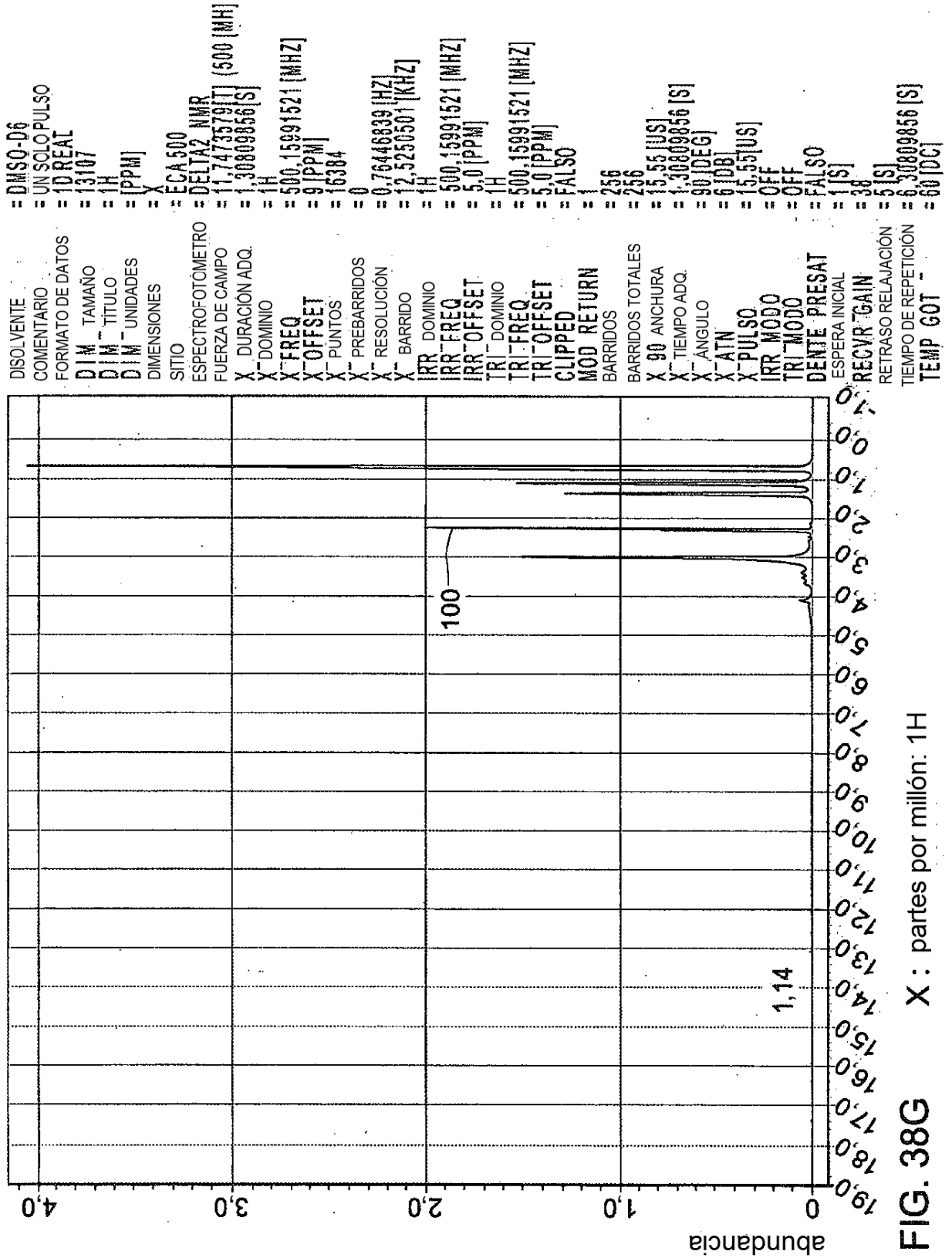


FIG. 38G X : partes por millón: 1H

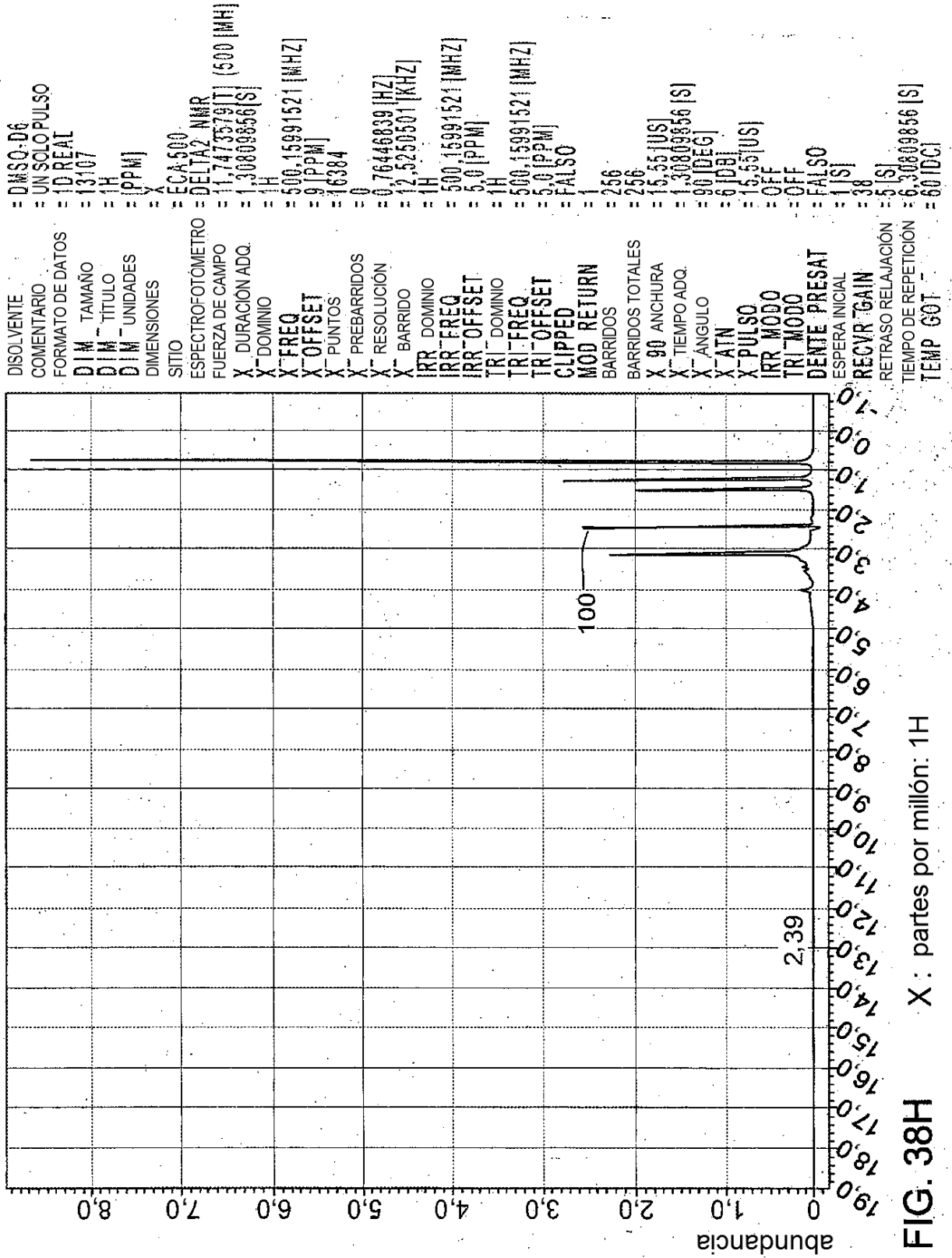


FIG. 38H X: partes por millón: 1H

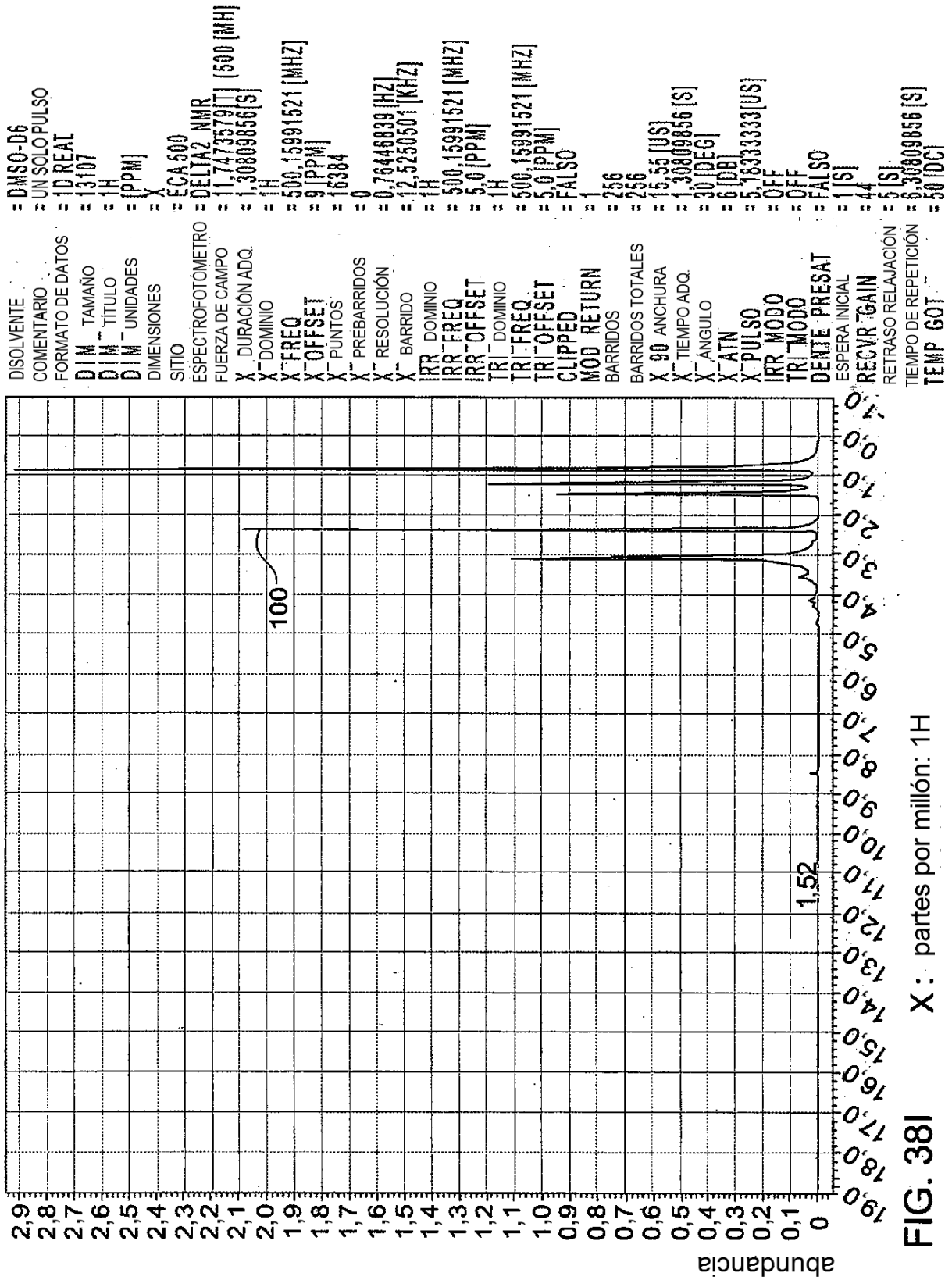


FIG. 381 X: partes por millón: 1H

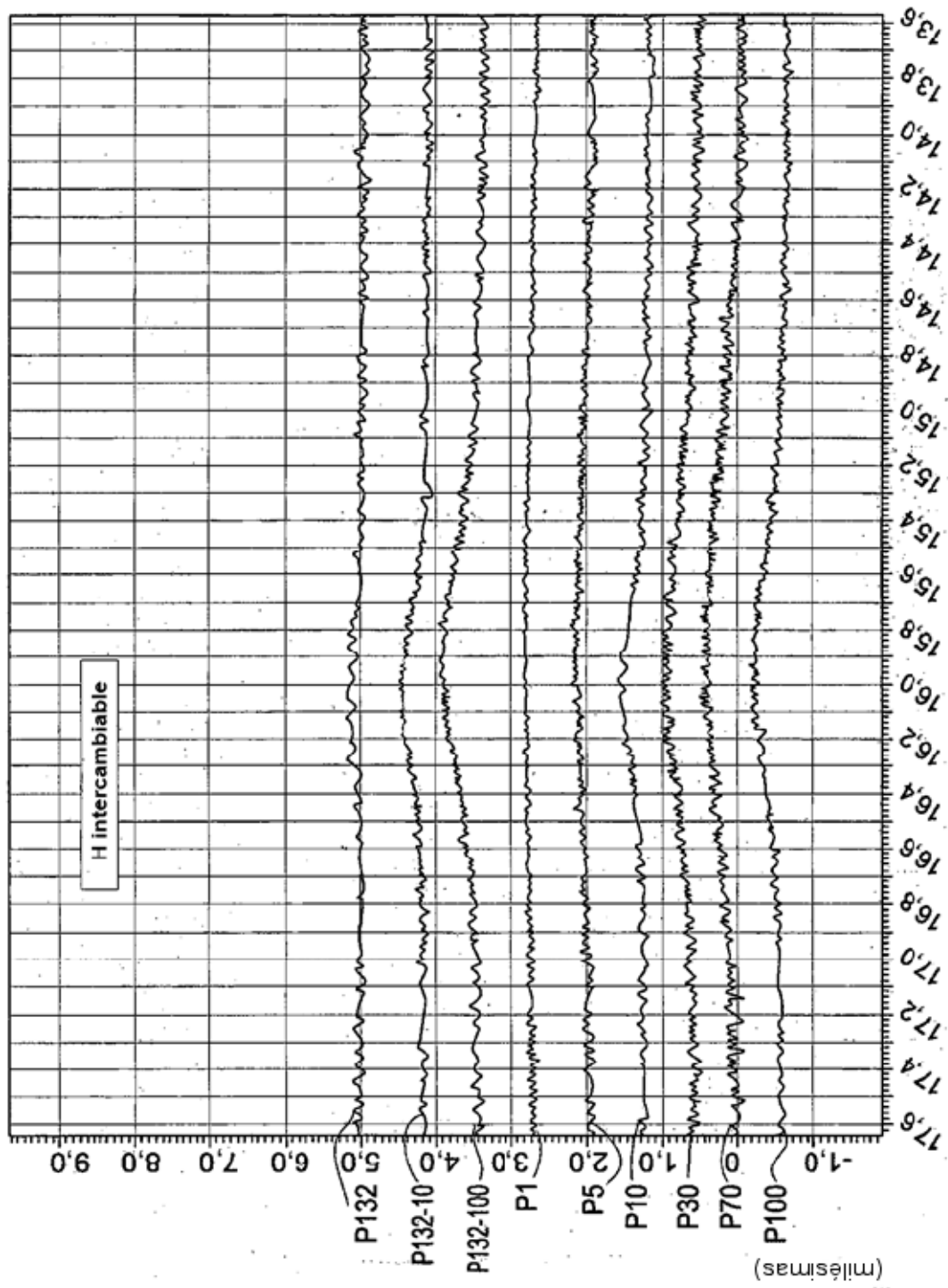


FIG. 38J X: partes por millón: 1H

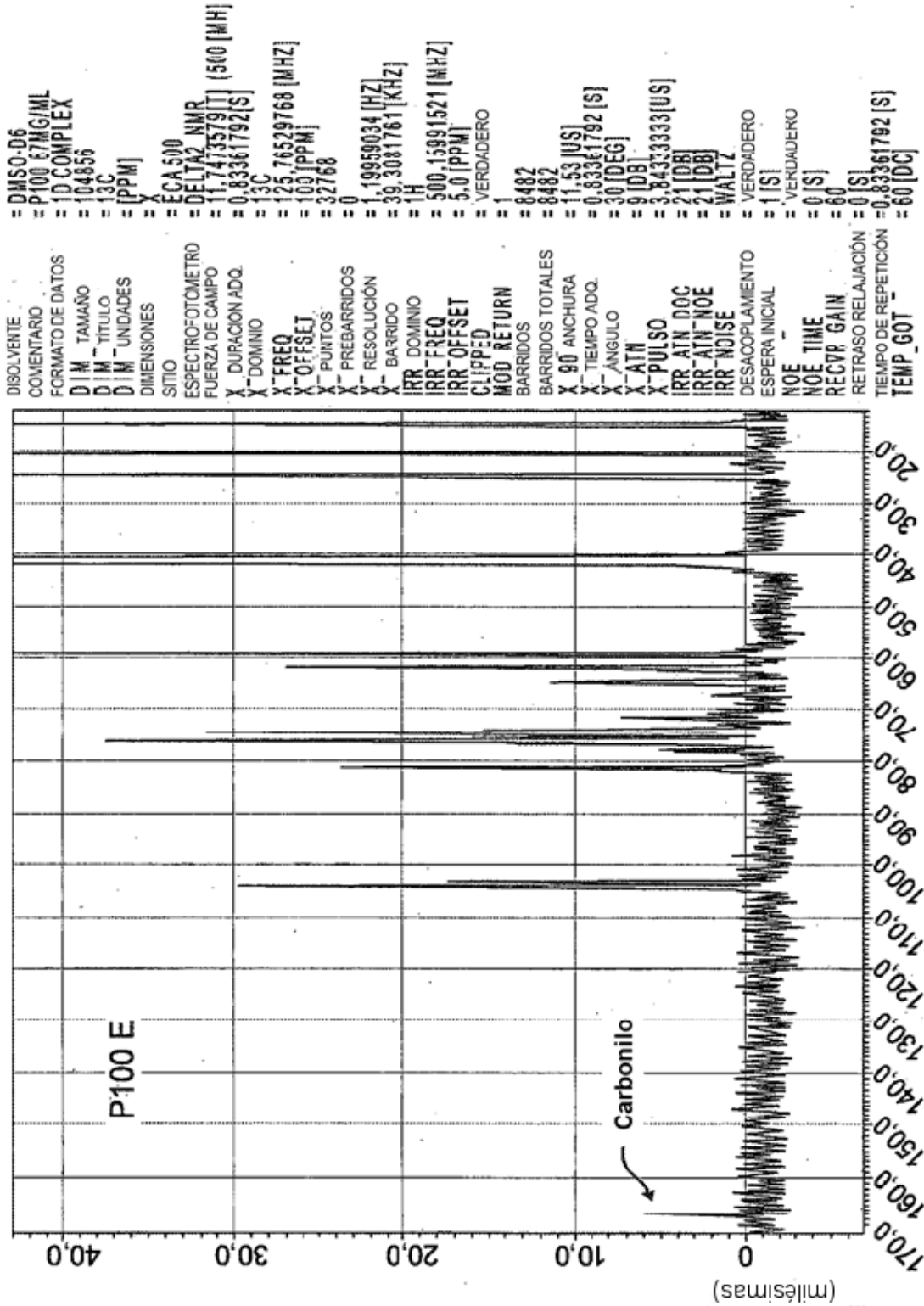


FIG. 38K X : partes por millón: 13C

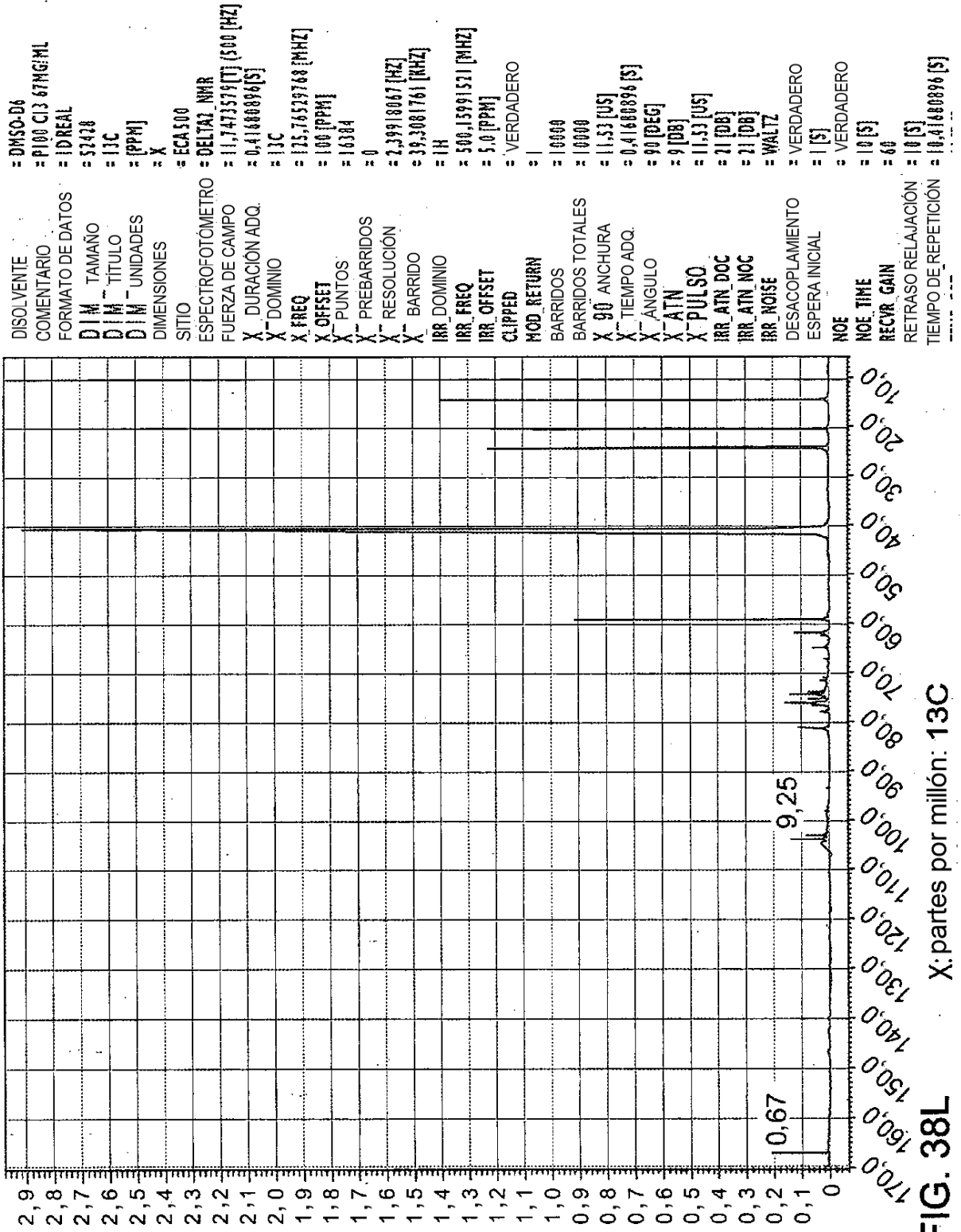


FIG. 38L X: partes por millón: 13C



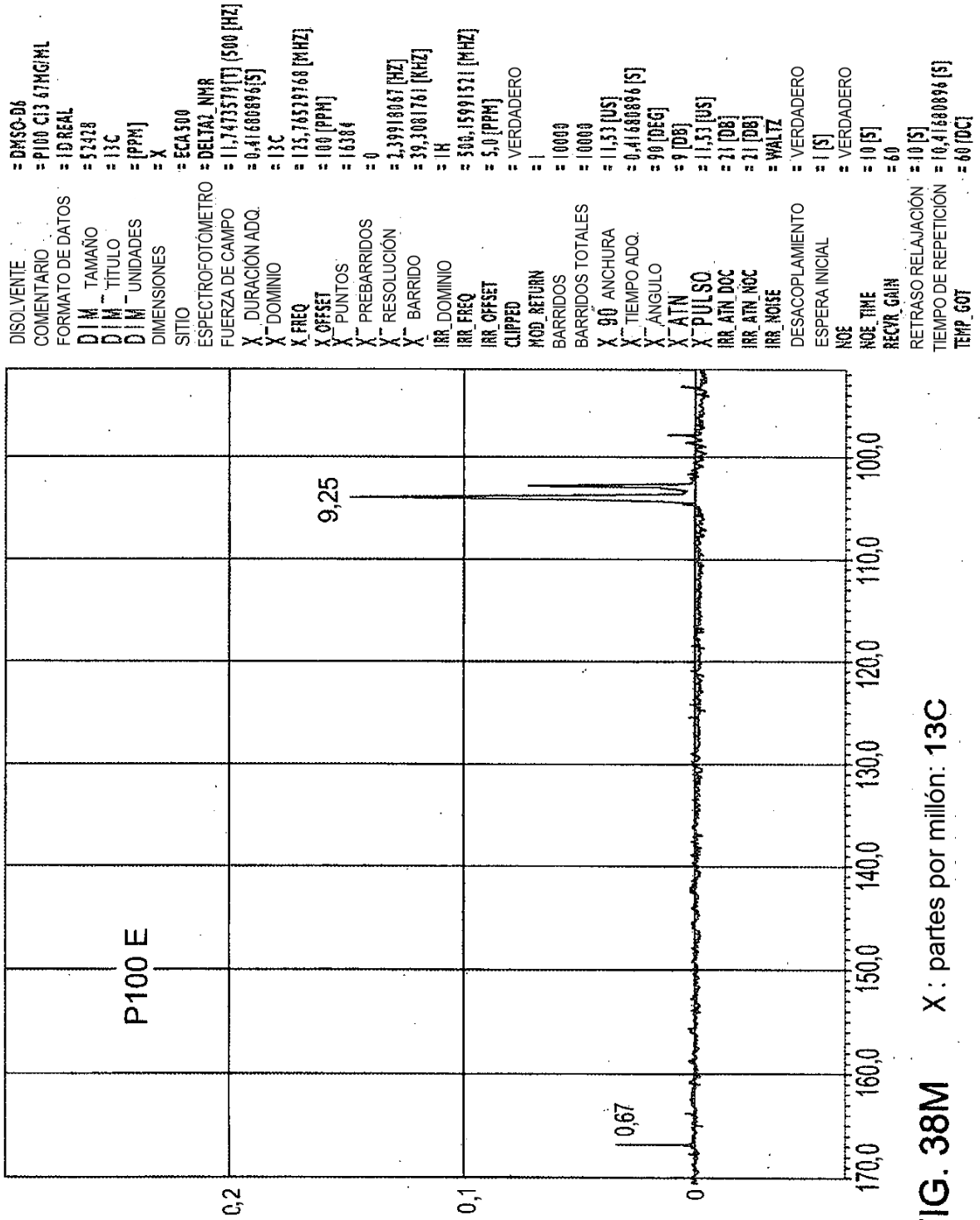


FIG. 38M X : partes por millón: 13C

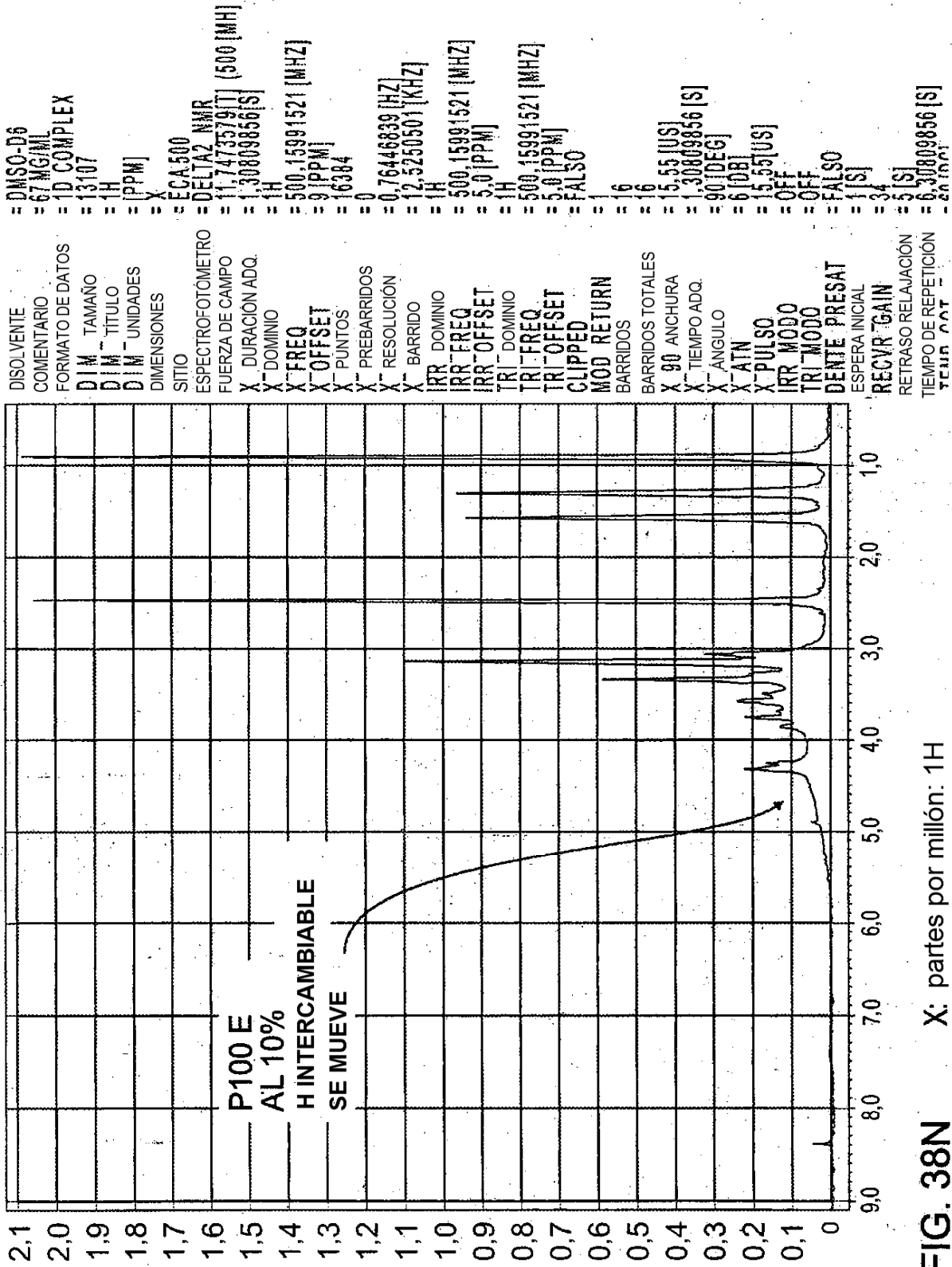


FIG. 38N X: partes por millón: 1H

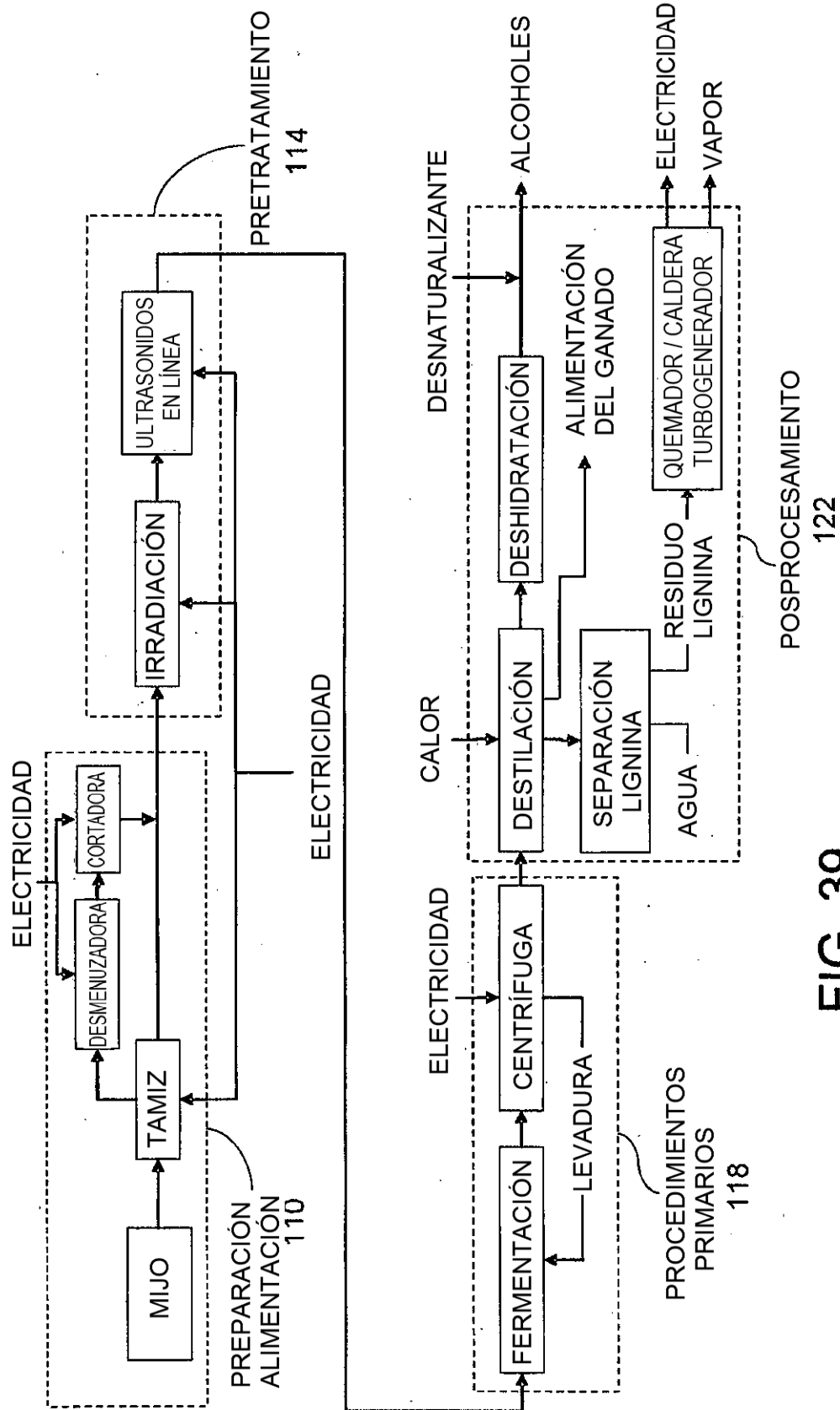


FIG. 39

