

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 621**

51 Int. Cl.:

**C10L 5/00** (2006.01)

**C10L 5/44** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2009 PCT/US2009/050705**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2010 WO10009240**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2009 E 09790471 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017 EP 2310479**

54 Título: **Materiales de enfriamiento y procesamiento**

30 Prioridad:

**17.07.2008 US 81709 P**

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

**17.11.2017**

73 Titular/es:

**XYLECO, INC. (100.0%)  
271 Salem Street, Unit L  
Woburn, MA 01801, US**

72 Inventor/es:

**MEDOFF, MARSHALL**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 642 621 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**

Materiales de enfriamiento y procesamiento

**5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Hay una gran abundancia de biomasa, especialmente, de residuos de biomasa. Sería útil obtener materiales y combustible, tales como el etanol, a partir de biomasa.

10 El documento WO2008/073186 desvela el procesamiento de biomasa para producir productos útiles, tales como combustibles. El documento EP1669434 describe un método y una instalación para la transformación de material orgánico procedente de residuos domésticos en combustible.

15 El documento US4769082 desvela que la eficiencia de la sacarificación enzimática y la fermentación de la celulosa en un recurso de residuo de celulosa se pueden aumentar mediante un tratamiento preliminar con radiación ionizante.

20 El documento EP0794243 describe un aceite derivado del petróleo que se somete a desasfaltado con propano para producir un residuo de asfalteno sólido y un procesamiento especificado de este para formar suspensiones. El documento US4797135 desvela un método de producción de harina de madera altamente conminuida y otros tipos de biomasa vegetal adecuados para su uso como combustible.

**RESUMEN**

25 Los materiales, tales como la biomasa, se pueden procesar para alterar sus estructuras a uno o más niveles mediante enfriamiento y procesamiento. A continuación, los materiales procesados se pueden usar, por ejemplo, como fuentes de otros materiales y combustible.

30 Muchas formas de realización de esta solicitud usan la química Natural Force™. Los métodos químicos Natural Force™ usan la aplicación y manipulación controladas de fuerzas físicas, tales como haces de partículas, gravedad, luz, temperatura, etc., para generar los cambios moleculares químicos y estructurales previstos.

35 La lignina presente en muchos tipos diferentes de biomasa, biomasa celulósica y lignocelulósica incluidas, puede complicar los esfuerzos de alterar la biomasa para formar materia prima intermedia para su transformación a azúcares más sencillos y, en última instancia, productos tales como los alcoholes. Como resultado, los rendimientos de productos, tales como el etanol obtenido a partir de biomasa, pueden ser inferiores (y en algunos casos, considerablemente inferiores) a los rendimientos máximos teóricos de tales productos.

40 Los métodos desvelados en el presente documento utilizan el enfriamiento y procesamiento de materiales, por ejemplo, el enfriamiento criogénico, en combinación con una o más técnicas de procesamiento diferentes que incluyen una o más etapas de procesamiento por radiación (por ejemplo, exposición a partículas cargadas tales como electrones y/o iones). Estas otras técnicas de procesamiento se llevan a cabo después del enfriamiento.

45 Enfriando la biomasa u otro material, se puede aumentar la fragilidad de diversos componentes de la biomasa u otro material (por ejemplo, hemicelulosa y/o lignina y/o proteínas y/o pectina y/o minerales), mejorando significativamente de ese modo la efectividad de las técnicas de procesamiento que se usan para alterar el material. Aumentando la fragilidad de los materiales, los materiales se pueden fracturar (por ejemplo, los bordes de las fibras se pueden fracturar) o agrietar como resultado de diversas etapas de procesamiento. La fracturación puede ser, por ejemplo, microfracturación.

50

Además, el enfriamiento del material puede tener otros efectos que provienen de las velocidades diferenciales de expansión y/o contracción de los diversos componentes del material. Por ejemplo, ciertos componentes (por ejemplo, lignina con presencia de agua) se pueden contraer o expandir a velocidades más rápidas que, o en diferentes cantidades que, otros componentes (por ejemplo, hemicelulosa, celulosa) con los que están asociados.

55 Como resultado, el material en cuestión se puede debilitar, lo que favorece la separación (por ejemplo, separación de fases, delaminación, escisión interfacial, ruptura o fracturación, por ejemplo, microfracturación) de sus componentes. Estos procesos, que pueden suceder independientemente de otras técnicas de procesamiento o de manera conjunta a otras técnicas de procesamiento, también pueden mejorar los rendimientos de los productos, por ejemplo, el etanol, obtenidos a partir de hemicelulosa o celulosa que han sido separadas de la lignina. La separación  
60 de la lignina del material reduce la recalcitrancia del material, lo que facilita la transformación de los componentes

celulósicos del material en una solución de azúcar (sacarificación de la celulosa mediante una enzima). Sin querer estar limitados por la teoría, se cree que la fracturación del material puede permitir que la enzima penetre en el material en los sitios de fractura, acelerando de ese modo la sacarificación. A continuación, el material sacarificado se puede convertir en un producto, por ejemplo, se puede fermentar a etanol.

5

Puesto que el enfriamiento se combina con otras técnicas de procesamiento, es decir, radiación y oxidación, las otras técnicas se pueden usar en menor grado para obtener resultados equivalentes. Por ejemplo, cuando se usa el enfriamiento con radiación, la radiación se puede usar en una dosis más baja para proporcionar el mismo grado de reducción de la recalcitrancia.

10

Durante las diversas técnicas de procesamiento que se usan para alterar y/o convertir materiales en otros materiales, se puede generar una cantidad significativa de calor en los materiales. Para evitar la combustión, o de otra forma, la iniciación de alteración térmica no deseada de los materiales, los métodos de enfriamiento desvelados en el presente documento se pueden usar para disipar o compensar el exceso de calor. El grado de enfriamiento (por ejemplo, la cantidad de calor eliminado del material) se puede variar en función de la cantidad de calor generado durante el procesamiento del material. El grado de enfriamiento también se puede ajustar para ajustar ciertas propiedades del material de biomasa, tales como su fragilidad, para mejorar la eficiencia de ciertas etapas de procesamiento posteriores. Por ejemplo, la conminución de la hemicelulosa, la celulosa y la lignina, y la separación de estos componentes, se pueden mejorar mediante los métodos desvelados en el presente documento.

20

Tal y como se usa en el presente documento, un material "criogénico" es un material a una temperatura de 200 K o menos (por ejemplo, 170 K o menos, 150 K o menos, 130 K o menos, 120 K o menos, 110 K o menos, 100 K o menos, 90 K o menos, 80 K o menos, 70 K o menos, 60 K o menos, 50 K o menos, 40 K o menos, 30 K o menos). Por tanto, por ejemplo, un "líquido criogénico" es un líquido que tiene una temperatura de 200 K o menos.

25

Como se comentará con más detalle a continuación, se pueden usar diversos materiales para el enfriamiento, entre los que se incluyen, por ejemplo, el nitrógeno líquido, el dióxido de carbono y el hielo.

Los métodos desvelados en el presente documento pueden producir partículas de material (por ejemplo, fibras) que tienen una relación entre el diámetro y la longitud de 5:1 o más (por ejemplo, 6:1 o más, 8:1 o más, 10:1 o más, 12:1 o más 15:1 o más, 20:1 o más).

Los métodos desvelados en el presente documento también pueden producir partículas que tienen una dimensión más grande, por ejemplo, el diámetro, de menos de, por ejemplo, 2000 nm, 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 25, 20, 10, 35 5, o incluso 1 nm.

Los métodos desvelados en el presente documento pueden producir materiales que tienen una densidad aparente reducida. Por ejemplo, la densidad aparente de los materiales producidos usando los métodos desvelados en el presente documento puede ser 0,8 g/cm<sup>3</sup> o menos (por ejemplo, 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 o menos, por ejemplo, 0,1 40 g/cm<sup>3</sup>).

Los métodos desvelados en el presente documento pueden producir materiales que tienen secciones transversales relativamente finas, debido a los efectos combinados del enfriamiento del material para aumentar su fragilidad y el procesamiento del material usando una o más de las técnicas desveladas en el presente documento. En general, los 45 materiales que tienen secciones transversales finas se pueden enfriar más eficientemente que los materiales que tienen secciones transversales más gruesas; como resultado, se pueden reducir los costes (por ejemplo, el consumo de energía) de procesamiento del material (por ejemplo, especialmente los costes de consumo de energía en las técnicas de procesamiento).

En un aspecto, la invención presenta un método que incluye el enfriamiento de un material, que tiene más de un componente y una interfaz entre los componentes, a una temperatura a la que los componentes se separan en la interfaz. A continuación, el material enfriado se puede procesar para producir un producto que es diferente, por ejemplo, diferente químicamente, del material en sí. Por ejemplo, la biomasa se puede enfriar y, a continuación, procesar para producir etanol.

55

Algunas implementaciones incluyen una o más de las siguientes características. El material puede ser o incluir biomasa, por ejemplo, en algunos casos el material comprende un material lignocelulósico. Los componentes pueden incluir lignina y celulosa. La temperatura puede ser menor o igual al punto de fragilidad del material. El método incluye además la irradiación del material, por ejemplo, con radiación de haz de electrones. El método puede 60 incluir además el tratamiento mecánico del material, por ejemplo, mediante molienda, trituración o conminución. Por

ejemplo, el tratamiento mecánico del material puede incluir la molienda tras congelación previa o la trituración tras congelación previa del material. El enfriamiento puede incluir un preenfriamiento del material antes la molienda tras congelación previa o la trituración tras congelación previa. Los componentes pueden tener coeficientes de expansión térmica diferentes. El método puede incluir el sometimiento del material a ciclos térmicos. El material puede ser o  
5 puede incluir un material que contiene hidrocarburo.

En otro aspecto, la invención presenta un método que comprende el procesamiento de un material para hacer un producto, material que se ha producido mediante tratamiento de un material de partida para fragilizar el material de partida y procesamiento del material de partida para producir un producto diferente del material fragilizado. En  
10 algunas implementaciones, el método incluye además la trituración o conminución del material fragilizado.

Algunas implementaciones incluyen una o más de las siguientes características. El tratamiento incluye el enfriamiento del material de partida. Además, el tratamiento incluye la irradiación del material. El material de partida incluye biomasa. El tratamiento y la trituración o conminución se pueden llevar a cabo simultáneamente, por ejemplo,  
15 en un dispositivo de molienda o trituración tras congelación previa. El procesamiento del material puede incluir la puesta en contacto del material con una enzima y/o un microorganismo. El tratamiento puede incluir el sometimiento del material de partida a ciclos térmicos. La biomasa puede incluir material lignocelulósico y el método puede incluir además la separación de la lignina de la celulosa. La invención presenta un método que incluye el enfriamiento de un material de biomasa para reducir la recalcitrancia del material y, después del enfriamiento, el procesamiento del  
20 material enfriado para producir un producto que es diferente, por ejemplo, diferente químicamente, del material de biomasa. En algunas implementaciones, el procesamiento comprende la puesta en contacto del material con una enzima y/o microorganismo, por ejemplo, la sacarificación del material con una enzima o la fermentación del material con un microorganismo. El material incluye celulosa y la puesta en contacto del material puede incluir la utilización de una enzima para sacarificar la celulosa. El método incluye además la irradiación del material de biomasa. El  
25 enfriamiento se puede llevar a cabo en un dispositivo de molienda tras congelación previa o trituración tras congelación previa. La puesta en contacto del material puede incluir la utilización de un microorganismo para producir un alcohol. El enfriamiento puede incluir el enfriamiento del material a una temperatura por debajo del punto de fragilidad del material.

En otros aspectos, la invención presenta un método que incluye el procesamiento, tal como mediante procesamiento mecánico, de un material de biomasa para reducir una dimensión tal como un tamaño de partícula del material de biomasa, y el enfriamiento del material a una temperatura de 273 K o menos, o el mantenimiento del material a una temperatura de 273 K o menos durante el procesamiento. El método puede incluir además la puesta en contacto del  
30 material procesado con una enzima y/o un microorganismo. En algunos casos, el método incluye la sonicación del material y/o el tratamiento del material con partículas cargadas. El enfriamiento puede fragilizar el material, lo que puede provocar la separación de los componentes del material en una interfaz.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden normalmente los expertos en la materia a los que se dirige la presente invención.  
40 En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos.

Otras características y ventajas resultarán evidentes a partir de la descripción, los dibujos y las reivindicaciones.

#### 45 DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es un diagrama esquemático que muestra un sistema de procesamiento de biomasa.

La FIG. 2 es un diagrama esquemático que muestra un sistema de procesamiento de biomasa.

La FIG. 3 es un diagrama esquemático que muestra una unidad de molienda.

50

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

Ciertos tipos de materiales, entre los que se incluyen los materiales celulósicos y/o lignocelulósicos, pueden incluir fracciones significativas de lignina unida a la celulosa y/o hemicelulosa en un complejo entramado de estructura  
55 polimérica. Sin querer estar limitados por la teoría, algunas pruebas sugieren que la lignina puede estar unida covalentemente tanto a la celulosa como a la hemicelulosa en los materiales (véase, por ejemplo, Karlsson et al., Journal of Pulp and Paper Science 27: 196-201 (2001)). Además, generalmente, se ha observado que la separación de la lignina de la celulosa y/o la hemicelulosa aumenta los rendimientos de los azúcares, los alcoholes y otros productos derivados del procesamiento adicional de la celulosa y/o la hemicelulosa. Además, la separación de la  
60 lignina de la celulosa y la hemicelulosa genera un coproducto valioso, la lignina.

- Entre los ejemplos de materiales de biomasa se puede incluir cualquier material de biomasa que es o incluye carbohidratos compuesto exclusivamente por una o más unidades de sacáridos o que incluye una o más unidades de sacáridos y puede ser procesado mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, el material de biomasa puede ser materiales celulósicos o lignocelulósicos, materiales amiláceos, tales como granos de maíz, granos de arroz u otros alimentos, o materiales que son o que incluyen uno o más azúcares de bajo peso molecular, tales como la sucrosa o la celobiosa.
- Por ejemplo, entre tales materiales de biomasa se pueden incluir el papel, los productos de papel, la madera, los productos relacionados con la madera, los tableros de partículas, las hierbas, las cascarillas de arroz, el bagazo, el algodón, el yute, el cáñamo, el lino, el bambú, el sisal, el abacá, la paja, las mazorcas de maíz, las cascarillas de arroz, el pelo de coco, las algas, las algas marinas, el algodón, las celulosas sintéticas o mezclas de cualquiera de estos.
- La biomasa también incluye fuentes de fibra celulósica, entre las que se incluyen el papel y los productos de papel (por ejemplo, el papel policubierto y el papel Kraft) y fuentes de fibra lignocelulósica, entre las que se incluyen la madera y los materiales relacionados con la madera, por ejemplo, los tableros de partículas. Entre otras biomazas también se incluyen fuentes de fibra natural, por ejemplo, hierbas, cascarillas de arroz, el bagazo, el algodón, el yute, el cáñamo, el lino, el bambú, el sisal, el abacá, la paja, las mazorcas de maíz, las cascarillas de arroz, el pelo de coco; fuentes de fibra con alto contenido de  $\alpha$ -celulosa, por ejemplo, el algodón; y fuentes de fibra sintética, por ejemplo, el hilo extruido (hilo orientado o hilo no orientado). Las fuentes naturales o sintéticas se pueden obtener a partir de materiales textiles de desecho, por ejemplo, remanentes, o pueden ser residuos posconsumo, por ejemplo, trapos. Cuando se usan productos de papel, pueden ser materiales vírgenes, por ejemplo, materiales vírgenes de desecho, o pueden ser residuos posconsumo. Además de materias primas vírgenes, también se pueden usar residuos posconsumo, industriales (por ejemplo, despojos) y de procesamiento (por ejemplo, efluente procedente del procesamiento del papel). La fuente de fibra también se puede obtener o proceder de residuos humanos (por ejemplo, aguas residuales), animales o de plantas. Se describen fuentes adicionales de biomasa en las patentes US6448307, US6258876, US6207729, US5973035 y US5952105.
- La separación de la lignina de la celulosa y/o la hemicelulosa puede resultar costosa y requerir mucho tiempo. Las técnicas de procesamiento, entre las que se incluyen métodos tales como la molienda y la trituración, pueden tener una eficiencia limitada por los fuertes enlaces que unen la lignina a la celulosa y la hemicelulosa.
- Muchos métodos de procesamiento, entre los que se incluyen métodos mecánicos, exposición a radiación, sonicación e incluso algunas etapas químicas de procesamiento, generan calor en el material. Mientras que el calor de proceso adicional puede resultar ventajoso en algunas formas de realización, las grandes cantidades de calor generadas por ciertas etapas de procesamiento también pueden llevar a la alteración térmica de la celulosa y/o la hemicelulosa, reduciendo los rendimientos de los azúcares, alcoholes y otros productos producidos a partir de la celulosa y/o la hemicelulosa.
- Asimismo, por ejemplo, cuando se calienta la lignina (por ejemplo, mediante el calor de proceso generado durante las etapas de procesamiento) por encima de su temperatura de transición vítrea, la lignina se puede volver más blanda y más deformable (por ejemplo, menos frágil) y, por lo tanto, más difícil de procesar.
- Los métodos desvelados en el presente documento usan técnicas de enfriamiento, por ejemplo, técnicas de enfriamiento criogénico, por ejemplo, para garantizar que no se produce descomposición térmica no deseada, por ejemplo, de la celulosa y/o la hemicelulosa, durante el procesamiento del material. El enfriamiento también se puede usar para ajustar propiedades del material con el fin de mejorar la eficiencia de separación, por ejemplo, de la lignina de la celulosa y/o la hemicelulosa.
- En particular, los métodos de enfriamiento desvelados en el presente documento se pueden usar por sí solos o en combinación para aumentar la fragilidad de los materiales, haciendo los materiales enfriados más susceptibles de separación mediante uno o más métodos de procesamiento, específicamente, una o más etapas de procesamiento por radiación (por ejemplo, exposición a partículas cargadas tales como electrones y/o iones). Aumentando la fragilidad del material mediante enfriamiento y mejorando la eficiencia con la que el material se puede procesar mediante enfriamiento, por ejemplo, mediante conminución o separación, se pueden reducir los costes de procesamiento (por ejemplo, los costes de procesamiento relacionados con la energía) y se pueden aumentar los rendimientos del producto previsto.
- Asimismo, cuando se enfría un material multicomponente, diferentes componentes del mismo se contraerán y/o

expandirán a velocidades diferentes y/o en cantidades diferentes. En ciertas formas de realización, este proceso puede llevar a la ruptura de los enlaces químicos del material. Por ejemplo, este comportamiento en el enfriamiento puede introducir tensiones entre componentes unidos, llevando a procesos tales como la delaminación, la fracturación, la descamación, la disociación y la separación de los componentes unidos. Como resultado, la eficiencia con la que los componentes se pueden separar, y los rendimientos de los diversos productos derivados del material previstos, puede aumentar, disminuir o mantenerse en equilibrio.

El enfriamiento en combinación con otros tratamientos tales como una irradiación y oxidación se pueden usar para controlar la funcionalización del material fibroso, es decir, los grupos funcionales que están presentes sobre o en el material. La funcionalización del material puede aumentar la solubilidad y/o dispersabilidad y puede hacer el material más susceptible a conversión mediante enzimas y/o microorganismos.

En algunas formas de realización, después de tratar el material, desde aproximadamente 1 de cada 2 hasta aproximadamente 1 de cada 250 unidades de sacárido incluyen un grupo ácido carboxílico, o un éster o una sal del mismo, mientras que el material base nativo o sin procesar puede tener menos de 1 grupo ácido carboxílico por cada 300 unidades de sacárido. En otras formas de realización, desde aproximadamente 1 de cada 5 hasta aproximadamente 1 de cada 250 unidades de sacárido, por ejemplo, 1 de cada 8 hasta aproximadamente 1 de cada 100 unidades o desde 1 de cada 10 hasta aproximadamente 1 de cada 50 unidades incluyen un grupo ácido carboxílico, o un éster o una sal del mismo.

En algunas formas de realización, en el material irradiado, desde aproximadamente 1 de cada 5 hasta aproximadamente 1 de cada 1500 unidades de sacárido incluyen un grupo nitrilo, un grupo nitroso o un grupo nitro. En otras formas de realización, desde aproximadamente 1 de cada 10 hasta aproximadamente 1 de cada 1000 unidades de sacárido, por ejemplo, 1 de cada 25 hasta aproximadamente 1 de cada 1000 unidades o desde 1 de cada 35 hasta aproximadamente 1 de cada 750 unidades incluyen un grupo nitrilo, un grupo nitroso o un grupo nitro.

En algunas formas de realización, las unidades de sacárido incluyen mezclas de grupos ácido carboxílico, grupos nitrilo, grupos nitroso y grupos nitro. Los grupos mezclados pueden mejorar la solubilidad de un material celulósico o lignocelulósico. El material tratado también puede incluir grupos funcionales seleccionados de entre el grupo que consiste en grupos aldehído, grupos cetona, grupos amino, grupos alquilamino, grupos alquilo, grupos cloroalquilo, grupos clorofluoroalquilo y grupos enol.

La FIG. 1 muestra un diagrama esquemático de un sistema de procesamiento de biomasa (100). El sistema (100) incluye una unidad de almacenamiento de material (102), un primer subsistema de procesamiento del material (104), un conducto refrigerante (106), un segundo subsistema de procesamiento de material (108), un depósito de material procesado (110) y una unidad de suministro de fluido refrigerante (112). Durante su funcionamiento, el material almacenado en la unidad de almacenamiento (102) se transporta a través del conducto (114) hasta el primer subsistema de procesamiento de material (104).

El subsistema (104) puede incluir una variedad de unidades de procesamiento diferentes. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el subsistema (104) puede incluir una o más unidades de procesamiento mecánico (por ejemplo, unidades de trituración, unidades de agitación, unidades de molienda, unidades de abrasión, unidades de picado, unidades de cizallamiento). En ciertas formas de realización, el subsistema (104) puede incluir una o más unidades de procesamiento por radiación. Las unidades de procesamiento por radiación pueden incluir fuentes de partículas cargadas (por ejemplo, fuente de haces de electrones y/o fuentes de iones), en las que el material se expone a partículas cargadas para provocar la alteración del material. En algunas formas de realización, el subsistema (104) puede incluir una o más unidades de sonicación, en las que el material se expone a ondas ultrasónicas para alterar el material. En ciertas formas de realización, el subsistema (104) puede incluir una o más unidades de pirólisis y/o una o más unidades de procesamiento químico. En algunas formas de realización, el subsistema (104) puede incluir una o más unidades de procesamiento por explosión por vapor. En algunas formas de realización, el subsistema (104) puede incluir una o más combinaciones de estas unidades de procesamiento.

En general, el subsistema (104) puede incluir una o más de las unidades de procesamiento anteriores, en cualquier combinación. Generalmente, el subsistema (104) está configurado para facilitar una etapa inicial de alteración del material, como preparación para las etapas de procesamiento posteriores. En algunas formas de realización, el subsistema (104) puede no estar presente para nada y el material se puede transferir directamente desde la unidad de almacenamiento (102) hasta el conducto refrigerante (106). La FIG. 2 muestra una forma de realización de un sistema de procesamiento de material que no incluye un subsistema de procesamiento (104). Los diversos componentes de la FIG. 2 se han comentado anteriormente en relación con la FIG. 1 y sus descripciones no se repiten en este punto.

Volviendo a hacer referencia a la FIG. 1, después de que el material se ha procesado en el subsistema (104), por ejemplo, mediante corte, picado, cizallamiento o fragmentación, el material se transfiere a través del conducto (116) al conducto refrigerante (106). La unidad de suministro del fluido refrigerante (112) suministra el fluido refrigerante (por ejemplo, nitrógeno líquido y/o gas nitrógeno enfriado, y/o helio líquido y/o gas helio enfriado, y/o argón líquido y/o gas argón enfriado, y/o CO<sub>2</sub> sólido y/o CO<sub>2</sub> líquido, y/o aire líquido y/o aire gaseoso enfriado) al conducto refrigerante (106) a través del conducto (120). El material se transporta a través del conducto refrigerante (106) en la dirección mostrada por la flecha (128). A medida que el material se mueve a través del conducto (106) (por ejemplo, sobre un dispositivo de transporte tal como una cinta transportadora y/o un tornillo sin fin), el material se enfría mediante intercambio de calor con el fluido refrigerante suministrado por la unidad de suministro de fluido refrigerante (112).

Cuando el material alcanza el final del conducto refrigerante (106), el material se transporta a través del conducto (118) a un segundo subsistema de procesamiento de material (108). En algunas formas de realización, la unidad de suministro de fluido refrigerante (112) suministra el fluido refrigerante a través del conducto (122) a un segundo subsistema (108), tal y como se muestra en la FIG. 1. En general, el segundo subsistema de procesamiento (108) puede incluir una o más de cualquiera de las unidades de procesamiento desveladas en el presente documento en relación con el primer subsistema de procesamiento (104). Entre las unidades de procesamiento ejemplares se incluyen una o más unidades de procesamiento tales como unidades de trituración, picado o cizallamiento, unidades de procesamiento por radiación, unidades de procesamiento por sonicación, unidades de procesamiento por pirólisis, unidades de procesamiento por explosión por gas y unidades de procesamiento químicas. El fluido refrigerante se puede reciclar para ser usado posteriormente en el conducto refrigerante (106) transportando el fluido a través del conducto (124).

El material procesado, después de salir del segundo subsistema de procesamiento (108), se transporta al depósito de material (110) a través del conducto (126). Una vez en el depósito (110), el material se puede someter a etapas de procesamiento posteriores, entre las que se incluyen una o más etapas adicionales de entre aquellas desveladas en relación con los subsistemas de procesamiento (104, 108) anteriores. Alternativamente, o además, el material procesado se puede someter a etapas de procesamiento adicionales, entre las que se incluyen uno o más procesos que usan agentes biológicos tales como enzimas y/o microorganismos, tales como bacterias y/o levaduras y diversos productos químicos y formulaciones y soluciones químicas.

En general, los métodos de enfriamiento desvelados en el presente documento se pueden usar con una amplia variedad de diferentes técnicas de procesamiento de biomasa y otros materiales. Técnicas ejemplares que se pueden usar con los métodos de enfriamiento comentados en el presente documento se desvelan, por ejemplo, en las solicitudes de patente siguientes: WO 2008/073186; y las patentes estadounidenses con números de serie 12/417,699, 12/417,707, 12/417,720, 12/417,723, 12/417,731, 12/417,786, 12/417,840, 12/417,880, 12/417,900, 12/417,904, 12/429,045, y 12/486,436.

En algunas formas de realización, cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, por ejemplo, tales como la conminución, pueden resultar particularmente ventajosos cuando se usan en combinación con uno o más métodos de enfriamiento, por ejemplo, métodos de enfriamiento criogénico. Sin querer estar limitados por la teoría, se cree que el aumento de fragilidad del material lignocelulósico que resulta del enfriamiento del material ayuda, al menos parcialmente, a la separación de componentes, por ejemplo, en una interfaz. Además, se cree que, aumentando la fragilidad de un material, las técnicas pueden ser más efectivas a la hora de la ruptura del material; en efecto, el material (y, a modo de ejemplo, la fracción de lignina del material) se puede transformar de un polímero flexible y deformable a un material rígido similar al vidrio que se puede "desmenuzar".

La FIG. 3 muestra una forma de realización ejemplar de una unidad de molienda (200) que puede formar una parte de uno de los subsistemas de procesamiento (104, 108) o de ambos. La unidad de molienda (200) incluye un conducto (202) a través del cual se transporta el material. En el interior del conducto están colocadas unas cuchillas fijas (204). Las cuchillas rotativas (206) están unidas a un eje colocado centralmente (208). Durante su funcionamiento, el material se muele mediante la acción de corte de las cuchillas (204, 206).

Se pueden usar equipos de molienda tras congelación previa, trituración tras congelación previa, criomolienda y criotrituración disponibles en el mercado. Tales equipos combinan el enfriamiento del material con la conminución del material. Entre los ejemplos de dispositivos de criotrituración disponibles en el mercado se incluyen el molino criogénico Freezer/Mill 6870, disponible en SPEX CertiPrep, Metuchen, Nueva Jersey y los dispositivos de criotrituración de Pulva Corporation, Saxonburg, PA. Entre otros proveedores se incluyen Air Products, Praxair, y Air Liquide. En algunas formas de realización, el equipo puede incluir un área de preenfriamiento, por ejemplo, un

transportador refrigerante tal como un extrusor de tornillo refrigerado. En algunos casos, el nitrógeno líquido se pulveriza sobre el material que se va a refrigerar en el área de preenfriamiento. La trituración la puede realizar, por ejemplo, un pin reciprocante u otro elemento. Por ejemplo, el dispositivo de trituración puede ser un molino de pines. Generalmente, es preferible que se supervise y controle la temperatura del material durante la alimentación y trituración.

La trituración tras congelación previa se combina con irradiación, en cuyo caso, la irradiación se lleva a cabo después de la trituración tras congelación previa. En algunos casos, la trituración tras congelación previa puede reducir la cantidad de radiación necesaria para reducir la recalcitrancia de un material de biomasa o procesar un material que contiene hidrocarburo.

Las técnicas de procesamiento por sonicación pueden, en ciertas formas de realización, ser particularmente ventajosas cuando se usan en combinación con, por ejemplo, antes, inmediatamente después o durante, los métodos de enfriamiento desvelados en el presente documento. En general, el procesamiento por sonicación del material es efectivo a la hora de alterar el material debido al calor suministrado al material a través de ondas mecánicas (por ejemplo, ondas sonoras). Cuando se usan métodos de enfriamiento para reducir la temperatura del material, el material se vuelve más frágil y es menos capaz de deformarse en respuesta a ondas mecánicas incidentes y/o experimentar una expansión rápida debido al calentamiento local. Como resultado, la eficiencia con la que la sonicación cambia el material de forma efectiva aumenta. Primero se refrigerará el material y, a continuación, se irradiará (por ejemplo, en el subsistema (108)). La dosis de radiación puede ser de, por ejemplo, desde aproximadamente 0,1 MRad hasta 200 Mrad, por ejemplo, desde aproximadamente 10 MRad hasta 100 Mrad o aproximadamente 30 MRad hasta 90 MRad. La radiación se puede emitir en una única etapa de irradiación o en múltiples etapas de irradiación y el material, si se desea, se puede refrigerar entre las etapas de irradiación. Tal enfriamiento se describe en el documento estadounidense con número de serie 12/417,880.

La exposición del material a ciertos tipos y dosis de radiación puede aumentar la fragilidad del material. El material se puede enfriar para disminuir su temperatura y aumentar aún más su fragilidad. Durante y/o después del enfriamiento del material, el material se puede procesar (por ejemplo, mediante molienda, trituración, cizallamiento y otras técnicas similares) para alterar el material como preparación para etapas de procesamiento posteriores que produzcan productos útiles. Además, la exposición a radiación (por ejemplo, exposición a haz de electrones y/o exposición a haz de iones) del material después del enfriamiento del material se usa para alterar aún más el material y/o hacer el material más frágil. Puesto que tanto la exposición a radiación como el enfriamiento se usan para hacer el material más frágil, los rendimientos del producto (por ejemplo, etanol y/o otros alcoholes) pueden aumentar significativamente y la cantidad de energía requerida para procesar el material se puede reducir.

En ciertas formas de realización, se pueden usar múltiples etapas de enfriamiento y procesamiento mecánico, o etapas de enfriamiento y calentamiento alternas, por ejemplo, con o sin procesamiento mecánico adicional u otro procesamiento físico, para procesar un material, por ejemplo, biomasa. Por ejemplo, cada etapa sucesiva puede reducir aún más el tamaño medio de las partículas de biomasa hasta alcanzar un tamaño de partícula deseado. Cada etapa de enfriamiento puede ser similar o diferente (por ejemplo, el sistema puede incluir una pluralidad de subsistemas refrigerantes similares). En algunas formas de realización, el sistema puede incluir un único subsistema refrigerante a través del cual pasa el material múltiples veces. Alternativamente, en ciertas formas de realización, se pueden usar etapas de enfriamiento diferentes (por ejemplo, etapas de enfriamiento que enfrían la biomasa a diferentes temperaturas, tal como a temperaturas progresivamente más bajas) para procesar el material.

De forma similar, en ciertas formas de realización, se pueden usar múltiples etapas de procesamiento mecánico para procesar biomasa. Los materiales se pueden reciclar a través de la misma unidad de procesamiento múltiples veces y/o el sistema puede incluir múltiples unidades mecánicas. Las unidades pueden ser todas similares unas a otras, o algunas de las unidades pueden ser distintas (por ejemplo, en su estructura) unas de otras.

En general, se puede usar una amplia variedad de fluidos refrigerantes diferentes para enfriar el material. En las formas de realización antes comentadas, se usó nitrógeno líquido y/o gaseoso frío como fluido refrigerante. Sin embargo, en algunas formas de realización, se pueden usar uno o más fluidos refrigerantes diferentes, entre los que se incluyen el helio, el oxígeno líquido, el hidrógeno líquido, el aire líquido, otros fluidos de este tipo y combinaciones de los mismos. En ciertas formas de realización, los fluidos pueden ser gases más que líquidos, o pueden incluir sólidos (por ejemplo, hielo, CO<sub>2</sub> sólido) mezclados con, o en lugar de, los líquidos. Por ejemplo, se puede usar una amplia variedad de gases enfriados (incluyendo gases nobles enfriados, gas nitrógeno enfriado, gas oxígeno enfriado y gas hidrógeno enfriado) en lugar de, o junto con, los fluidos refrigerantes líquidos.

En ciertas formas de realización, se pueden añadir sólidos a los materiales para ayudar al procesamiento de los

materiales. Por ejemplo, se puede añadir CO<sub>2</sub> sólido a los materiales para ayudar a la alteración de los materiales en una o más unidades de procesamiento. Entre otros sólidos que también se pueden usar se incluye, por ejemplo, el hielo. El sólido también puede ser un elemento sólido que posteriormente se retira o separa del material, por ejemplo, una o más bolas, pines u otros elementos de molienda sólidos.

5

La temperatura a la que se enfría el material depende de varios factores, entre los que se incluyen las técnicas de procesamiento usadas para alterar el material y la naturaleza del material. En algunas formas de realización, por ejemplo, el material se enfría a una temperatura inferior a la temperatura de transición vítrea de la lignina, que es de aproximadamente 100° a 170 ° C, por ejemplo, de aproximadamente 120° a 150 ° C, por ejemplo, aproximadamente 10 125 °C. Cuando la lignina se enfría por debajo de su temperatura de transición vítrea, cambia de un material blando y deformable a un material cristalino y frágil. La lignina cristalina y frágil se puede alterar más fácilmente mediante diversos procesos, incluyendo los procesos antes desvelados. Además, enfriando la lignina por debajo de su temperatura de transición vítrea, se puede cambiar la estructura física de la lignina. Los cambios en la estructura de la lignina pueden llevar a tensiones internas dentro del material, donde la lignina está unida a la celulosa y/o la 15 hemicelulosa. Estas tensiones internas pueden llevar a la delaminación y, por tanto, separación de la lignina de la celulosa y/o la hemicelulosa. En algunas implementaciones, el material se enfría por debajo de la temperatura a la que el material se vuelve frágil (el "punto de fragilidad" del material. Este punto de fragilidad de un material concreto se puede medir usando equipos de ensayo disponibles en el mercado, por ejemplo, el Benz BPT2100 Brittlepoint Tester disponible en Benz Material Testing Instruments, Providence, Rhode Island.

20

En algunas formas de realización el material se puede enfriar por debajo de la temperatura de transición vítrea de uno o más elementos o componentes diferentes del material, tales como la hemicelulosa. Consideraciones similares a las comentadas anteriormente en relación con la lignina se aplican también a la hemicelulosa. En particular, el enfriamiento de la hemicelulosa puede hacerla más frágil, lo que mejora la eficiencia de las etapas de procesamiento 25 posteriores. El enfriamiento también puede introducir tensiones internas dentro de la estructura de la biomasa, que pueden llevar a la separación de la hemicelulosa de otros componentes (por ejemplo, celulosa) del material.

En ciertas formas de realización, el material se puede enfriar a una temperatura de 400 K o menos (por ejemplo, 380 K o menos, 360 K o menos, 340 K o menos, 320 K o menos, 300 K o menos, 280 K o menos, 260 K o menos, 240 K 30 o menos, 220 K o menos, 200 K o menos, 150 K o menos, 100 K o menos, 80 K o menos, 77 K o menos, 70 K o menos, 50 K o menos). En algunas formas de realización, el material se puede enfriar a una temperatura menor o igual a la temperatura ambiente (por ejemplo, 293 K). En ciertas formas de realización, el material se puede enfriar a aproximadamente la temperatura del nitrógeno líquido (por ejemplo, 77 K) o menos. El enfriamiento del material a temperaturas inferiores a la temperatura del nitrógeno líquido se puede lograr mediante el uso de fluidos 35 refrigerantes con un punto de ebullición más bajo que el del nitrógeno líquido (por ejemplo, helio líquido).

En algunas formas de realización, se puede controlar la velocidad a la que el material se enfría para ayudar a la separación de componentes del material. Por ejemplo, enfriando el material rápidamente, las disposiciones de los componentes asociados en la biomasa de más baja energía puede que no tengan tiempo suficiente para formarse. 40 En otras palabras, el material enfriado puede estar en un estado de energía que no es el estado de energía mínimo y, por tanto, puede ser inestable y más fácil de alterar usando etapas de procesamiento posteriores. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, la velocidad a la que el material se enfría es de 1 K/s o más (por ejemplo, 2 K/s o más, 3 K/s o más, 5 K/s o más, 7,5 K/s o más, 10 K/s o más, 15 K/s o más, 20 K/s o más, 30 K/s o más, 40 K/s o más, 50 K/s o más, 75 K/s o más, 100 K/s o más, o incluso más).

45

En ciertas formas de realización, usando los sistemas de procesamiento desvelados en el presente documento, el material se puede mantener a una temperatura seleccionada y/o dentro de un intervalo de temperatura seleccionado durante el procesamiento del material usando una o más de las diversas técnicas de procesamiento desveladas en el presente documento. Por ejemplo, el material se puede mantener a una temperatura de 400 K o menos (por 50 ejemplo, 380 K o menos, 360 K o menos, 340 K o menos, 320 K o menos, 300 K o menos, 280 K o menos, 260 K o menos, 240 K o menos, 220 K o menos, 200 K o menos, 150 K o menos, 100 K o menos, 80 K o menos, 77 K o menos, 70 K o menos, 50 K o menos). En algunas formas de realización, el material se puede mantener a, o por debajo de, la temperatura ambiente (por ejemplo, 293 K). En ciertas formas de realización, la biomasa se puede mantener a la temperatura del nitrógeno líquido (por ejemplo, 77 K) o menos.

55

En ciertas formas de realización, el material se puede someter a una secuencia de etapas de calentamiento y enfriamiento que se seleccionan para provocar una disrupción adicional de la asociación (por ejemplo, presuntos enlaces covalentes) entre la lignina y la celulosa y/o la hemicelulosa. El sometimiento del material a ciclos térmicos rápidos puede introducir tensiones internas dentro del material, que pueden llevar a la separación de los 60 componentes de la biomasa (por ejemplo, sin procesamiento posterior, o como resultado de etapas de

procesamiento posteriores).

Además, se puede añadir una variedad de agentes diferentes al material antes de, durante y/o después del enfriamiento del material. Entre los agentes ejemplares que se pueden añadir se incluyen el agua (y, más  
5 generalmente, cualquier otro compuesto que se expanda o se contraiga cuando se enfría), agentes oxidantes, agentes reductores, ácidos, bases y materiales que se contraen significativamente al enfriarse. En general, se pueden introducir agentes tales como el agua en uno o más de los componentes del material para provocar el hinchamiento de los componentes cuando se hidratan. Por ejemplo, cuando el material, por ejemplo, biomasa, se  
10 enfría, el agua se expande y/o contrae, creando tensiones internas periódicas en el material que pueden llevar a la escisión de los enlaces en el interior del material, por ejemplo, entre la lignina y la celulosa y/o la hemicelulosa. También se pueden usar otros agentes que experimentan sublimación (por ejemplo, dióxido de carbono) para producir resultados similares. Generalmente, los agentes que subliman experimentan cambios significativos de volumen molar en una transición de fase. Tales agentes se pueden introducir en el material para favorecer aún más la separación de los componentes en él cuando se produce una expansión y/o contracción relativamente rápida del  
15 material como resultado de los agentes añadidos.

Como se ha señalado anteriormente, se pueden añadir diversos agentes químicos, tales como agentes oxidantes y/o agentes reductores y/o ácidos y/o bases, al material. Los diversos agentes pueden reaccionar con el material antes, durante y/o después del enfriamiento para ayudar aún más a la alteración del material antes de la formación y  
20 extracción del producto. En general, ciertos componentes del material pueden ser estables en presencia de un agente, pero reactivos en presencia de otros agentes. Por ejemplo, la celulosa es estable frente a las bases, pero se ve alterada por los ácidos. Introduciendo bases en uno o más de los diversos subsistemas de procesamiento, se pueden alterar y disociar selectivamente uno o más componentes seleccionados del material, por ejemplo, la lignina, de otro(s) componente(s), por ejemplo, la celulosa y/o la hemicelulosa, lo que mejora los rendimientos de los  
25 productos derivados del material. Se pueden añadir agentes químicos a los diversos subsistemas de procesamiento en forma de líquidos, soluciones y/o gases. En algunas formas de realización, los agentes se pueden introducir en forma gaseosa y se pueden condensar a líquidos a medida que se enfría el material.

En ciertas formas de realización, se pueden añadir diversos agentes químicos oxidantes y/o reductores antes,  
30 durante y/o después del enfriamiento para favorecer la separación de al menos alguno de los componentes del material mediante reacciones químicas. Se puede usar el enfriamiento por sí solo, o junto con una o más de las técnicas de procesamiento desveladas anteriormente, para favorecer la disociación, por ejemplo, de la lignina de la celulosa y/o la hemicelulosa. Esta disociación se puede favorecer aún más haciendo reaccionar la celulosa, la hemicelulosa y/o la lignina con agentes tales que los productos de tales reacciones no se reasocian fácilmente.  
35 Entre los agentes oxidantes y reductores ejemplares se incluyen el ozono, el oxígeno, el aire, el amoníaco y una amplia variedad de otros agentes.

En algunas formas de realización, se pueden usar múltiples etapas de enfriamiento diferentes, cada una de las cuales se configura para enfriar el material a una temperatura diferente. Por ejemplo, en una etapa inicial de  
40 procesamiento, el material se puede enfriar a una temperatura seleccionada y se puede procesar (por ejemplo, mecánicamente, mediante exposición a radiación, mediante sonicación y/o mediante diversas otras técnicas). Por ejemplo, en cada etapa de procesamiento posterior, puesto que las partículas de material se pueden hacer cada vez más pequeñas, se puede enfriar el material a temperaturas sucesivamente más bajas y se puede procesar aún más, para continuar reduciendo el tamaño de las partículas y/o disociando aún más componentes del material tal como la  
45 biomasa (por ejemplo, disociar la lignina de la celulosa y/o la hemicelulosa) o para cambiar la estructura.

En general, la descripción de la invención no se limita al sistema de procesamiento específico descrito anteriormente en la FIG. 1. En particular, se pueden usar varios métodos de enfriamiento diferentes para reducir la temperatura del material antes, durante y/o después de la aplicación de diversas técnicas de procesamiento. Además, en general, se  
50 puede usar una amplia variedad de subsistemas refrigerantes diferentes para enfriar el material.

En algunas formas de realización, los sistemas de procesamiento desvelados en el presente documento pueden incluir un subsistema de separación que sirva para separar los diversos componentes del material después de que el material se ha enfriado y procesado. Por ejemplo, cuando el material se procesa para disociar la lignina de la  
55 celulosa y/o la hemicelulosa, el sistema de procesamiento puede incluir un subsistema de separación configurado para retirar la lignina disociada. Se pueden usar diversos métodos, incluyendo métodos de separación física, tales como la decantación, la centrifugación, la destilación y la extracción, para separar los componentes, por ejemplo, la lignina de los otros componentes de un material lignocelulósico, o la arena de los hidrocarburos en una arena petrolífera. Entre otros métodos que se pueden implementar en el subsistema de separación se incluyen el  
60 procesamiento termoquímico, el procesamiento químico y el procesamiento por exposición a radiación.

En ciertas formas de realización, los sistemas de procesamiento desvelados en el presente documento pueden incluir una o más estaciones de humectación para introducir diversos agentes humectantes, particularmente agua y/o otros líquidos tales como dimetilsulfóxido, en los materiales. Por ejemplo, después de las unidades de procesamiento mecánico tales como la unidad de molienda mostrada en la FIG. 3, el sistema de procesamiento puede incluir un pulverizador que añada agua y/o otros agentes al material. El pulverizador puede crear una niebla fina que se deposita sobre las superficies de las partículas de material. Si el material se enfría durante o después de la aplicación de la niebla, la niebla se puede congelar sobre las superficies de las partículas para garantizar la adherencia. La temperatura del material puede experimentar uno o más ciclos de enfriamiento y calentamiento para hinchar aún más el material con la niebla aplicada. Además, en ciertas formas de realización, los cambios, por ejemplo, los cambios rápidos de temperatura del material, pueden alterar aún más la estructura del material.

En algunas formas de realización, se pueden usar múltiples etapas de humectación. Cada una de las múltiples etapas de humectación puede introducir el mismo agente en el material, o diferentes etapas pueden introducir diferentes agentes. La selección de qué agentes se deben introducir depende de factores tales como la aplicación prevista del material, el estado físico-químico del material y las condiciones de las etapas posteriores de procesamiento del material.

Sistemas y métodos de mejorar la humectación de los materiales antes, durante y después del procesamiento se desvelan, por ejemplo, en el documento estadounidense con número de serie 12/417,880.

En algunas formas de realización, después de que los materiales se han procesado usando los métodos desvelados en el presente documento, los materiales procesados se pueden someter a etapas de procesamiento adicionales. En particular, los materiales procesados se pueden poner en contacto con agentes biológicos tales como enzimas y/o con microorganismos tales como levaduras (por ejemplo, *P. stipitis*) y/o bacterias para extraer una variedad de productos útiles a partir de los materiales procesados, entre los que se incluyen productos tales como el hidrógeno, los alcoholes (por ejemplo, etanol y/o butanol), los ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético), los hidrocarburos, los coproductos (por ejemplo, proteínas) o mezclas de cualquiera de estos. Agentes biológicos y microorganismos adecuados para el procesamiento posterior de los materiales se desvelan, por ejemplo, en el documento WO 2008/073186.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, se usan las técnicas descritas en el presente documento para separar y retirar la lignina de un material lignocelulósico y, a continuación, los componentes celulósicos restantes se sacarifican, por ejemplo, usando una enzima. La eliminación de la lignina reduce la recalcitrancia del material, lo que permite la conversión de la celulosa a azúcares que, a continuación, se pueden fermentar para producir alcoholes.

#### EJEMPLO

Se ensayaron diversas muestras de materiales celulósicos en matraces oscilantes, usando *P. stipitis* NRRL Y-7124 y una fórmula de medio nutriente estándar a diversos niveles. Se midió la concentración de etanol a lo largo del tiempo en cada matraz. Tal y como se señala a continuación (véase la leyenda de la Tabla 1), las muestras celulósicas procedían de hierba cortada (CG). Algunas de las muestras se trituraron por congelación (FG), usando un molino criogénico SPEX Certiprep® Freezer/Mill 6870. Las condiciones de la trituración tras congelación previa fueron las siguientes: 4 minutos de preenfriamiento, seguidos de tres ciclos de 10 minutos de tiempo de operación y 2 minutos de tiempo de enfriamiento, con una frecuencia de trituración de 15 Hz. Algunas de las muestras se irradiaron sin someterse a trituración tras congelación previa, mientras que otras se irradiaron después de someterse a trituración tras congelación previa. La irradiación se llevó a cabo usando un haz de electrones. La dosis de radiación se indica mediante el número después de "CG," donde 0,2E indica 0,2 MRad, 0,4E indica 0,4 MRad, etc. Cuando la dosis de radiación era de 10 MRad o menos, se suministraba en un único paso. Cuando la dosis de radiación era superior a 10 MRad, se suministraba en múltiples pasos de 10 MRad (por ejemplo, 50 MRad = 5 x 10 MRad), con intervalos de 1 minuto entre pasos para permitir que el material enfriara a temperatura ambiente.

**Reactivos usados**

Componente del medio	Fabricante	N.º de referencia	N.º de lote
Urea	ScholAR Chemistry	9472706	AD-7284-43
Base nitrogenada de levadura	Becton Dickinson	291940	7128171
Peptona	Becton Dickinson	211677	4303198
Xilosa (>98 %)	Alfa Aesar	A10643	10131481

Glucosa (>98,9 %)	Fisher	BP-350-1, 50-99-7	030064, 030439
Caldo YM	Becton Dickinson	271120	6278265
Novozyme® 188*	Novozymes	Sigma C6105	018K0735, 058K1144
Celluclast 1, 5 FG	Novozymes	Sigma C2730	077K0735, 058K1144
Enzima Optimash™ TBG**	Genencor®	N/A	1600925859
* Celobiasa	de	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>
* B-glucanasa EC 3.2.1.6.			

### **Preparación del banco de células y desarrollo del matraz de siembra**

Para preservar el cultivo original, se preparó un banco de células de cada cultivo. Se preparó un banco de células de trabajo de *P. stipitis* NRRL Y-7124 a partir de un cultivo liofilizado rehidratado obtenido de la Colección de Cultivos ARS. Se almacenaron crioviales que contenían cultivo de *P. stipitis* en glicerol al 15 % en volumen a -75 °C.

Para preparar el matraz de siembra, se sembró en estría una porción del material del banco de células de trabajo descongelado sobre un caldo para levaduras y hongos (YM) + 20 g/L de agar (pH 5,0) y se incubó a 30 °C durante 2 días. Las placas se mantuvieron 2 días a 4 °C antes de su uso. Se usó una colonia del medio para hongos y levaduras con agar para inocular un matraz Erlenmeyer de 250 mL Erlenmeyer que contenía 100 mL de caldo estéril (40 g/L de glucosa, 1,7 g/L de base nitrogenada de levadura, 2,27 g/L de urea, 6,56 g/L de peptona, 40 g/L xilosa, pH 5,0) y se incubó durante 24 horas a 25 °C y 150 rpm. Tras 23 horas de crecimiento, se tomó una muestra y se analizó su densidad óptica (OD a 600 nm en un espectrofotómetro UV), su recuento celular total y su pureza (tinción de Gram). En base a estos resultados, se usó un matraz con una OD de entre 6 y 11 y un recuento de células de 2 a 6 x10<sup>8</sup> células/mL para inocular los matraces de ensayo. Se añadió un mL del contenido de los matraces de siembra a los matraces de ensayo de 100 mL (1 % en volumen).

### **Matraces de ensayo**

Los matraces de ensayo fueron matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de caldo. Los matraces de ensayo contenían el medio estándar (1,7 g/L de base nitrogenada de levadura, 2,27 g/L de urea, 6,56 g/l de peptona, pH 5,0). Había tres conjuntos de matraces de control, porque el ensayo se realizó a lo largo de un periodo de tres semanas y los matraces de control se analizaron para cada semana de ensayo.

La cronología de actividades fue la siguiente. La muestra lignocelulósica (7,77 g) se combinó con 100 mL de caldo estéril en un matraz estéril de 250 mL y se permitió que se embebiera durante 14 horas a temperatura ambiente. Después de embeberse, se ajustó el pH del contenido del matraz a 5,0 con NaOH 1N. Una vez ajustado el pH, se añadieron 3,89 mL de Celluclast 1,5 FG, 0,77 mL de Novozyme® 188 y 0,77 mL de Optimash™ TBG y se incubaron los matraces a 50 °C durante 21 horas.

Tras el tratamiento enzimático, se ajustó el pH del contenido del matraz a 5,5, 6,0 o 6,25. Tras el ajuste del pH, se inocularon los matraces con 1 mL del contenido del matraz de siembra de *P. stipitis* y se incubaron durante 96 horas a 25 °C y 125 rpm.

Se inocularon tres matraces de control (dos positivos y uno negativo) cada semana, nueve en total. Los dos matraces de control positivos contenían azúcares. Uno contenía 80 g/L de azúcares (40 g/L de glucosa y 40 g/L de xilosa), el otro contenía 30 g de azúcares (15 g/L de glucosa y 15 g/L de xilosa). No había azúcares añadidos al matraz de control negativo.

Un conjunto de matraces (cinco en total) contenían caldo solo de xilosa (40 g/L de xilosa, 1,7 g/L de base nitrogenada de levadura, 2,27 g/L de urea, 6,56 g/L de peptona) a pH 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5. Los matraces se incubaron a 125 rpm y 25 °C después de su inoculación con 1 mL de *P. stipitis*.

Un segundo conjunto de matraces (cinco en total) contenían caldo solo de xilosa (40 g/L de xilosa, 1,7 g/L de base

## ES 2 642 621 T3

nitrogenada de levadura, 2,27 g/L de urea, 6,56 g/L de peptona) a pH 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5. Los matraces se incubaron a 250 rpm y 25 °C después de su inoculación con 1 mL de *P. stipitis*.

Durante la semana 1, se ensayaron las muestras CG0.4E y CG0.4E-FG4102315 en matraces a pH 5,5. Sin embargo, el protocolo indicaba que se deberían ensayar tanto a 5,5 como a 6,0. Por lo tanto, ambas muestras se ensayaron a pH 5,5 y 6,0 en la semana 2 del experimento (matraces del 28 al 31).

### **Análisis**

- 10 Se tomó un total de ocho muestras de cada matraz a las 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, y 96 horas posinoculación y se analizó la concentración de glucosa, etanol y xilosa usando el analizador YSI Biochem Analyzer (YSI, Interscience). Las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante se almacenó a -20 °C. Se analizó un estándar diariamente para garantizar que se mantenía la integridad de la membrana.
- 15 Se analizó el recuento de células de cada matraz de siembra con el fin de determinar la concentración inicial de células en los matraces de ensayo. Se tomó una muestra de cada matraz a las 72 horas de incubación y se analizó el recuento de células. Se mezclaron muestras adecuadamente diluidas con azul de tripano al 0,05 % y se cargaron en un hemocitómetro Neubauer. Se realizó el recuento de células con una magnificación de 40x.
- 20 Se midió el pH de cada matraz a las 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, y 96 horas.

### **Resultados**

- 25 Se analizó el número de células de los matraces de siembra. Durante la semana 1 (matraces del 1 al 27), la concentración de células del matraz de siembra fue de  $5,03 \times 10^8$  células/mL. Por lo tanto, la concentración de células de partida de los matraces de ensayo fue de  $5,03 \times 10^6$  células/mL. Durante la semana 2 (matraces del 28 al 64), el número de células del matraz de siembra fue de  $6,38 \times 10^8$  células/mL. Por lo tanto, la concentración de células de partida de los matraces de ensayo fue de  $6,38 \times 10^6$  células/mL. Durante la semana 3 (matraces del 65 al 105), el número de células del matraz de siembra fue de  $5,93 \times 10^8$  células/mL. Por lo tanto, la concentración de células de partida de los matraces de ensayo fue de  $5,93 \times 10^6$  células/mL.

La concentración de etanol de cada uno de los matraces durante la incubación se enumera a continuación en la tabla 1:

35

**Tabla 1**

Leyenda: "CG" = Hierba cortada; "FG" = Triturado criogénico; 0.xE = irradiado con radiación de 0.x MRad usando haz de electrones.											
N.º de matraz	N.º de muestra	pH de partida	Concentración de etanol (g/L) en el tiempo de incubación (h)								
			0	12	24	36	48	60	72	96	5
1	CG	5,5	0,10	0,14	0,16	0,05	0,03	0,04	0,05	0,07	
2	CG	6,0	0,12	0,21	0,24	0,19	0,14	0,09	0,08	0,07	
3	CG-FG	5,5	0,10	1,35	4,34	4,31	5,75	5,98	5,54	3,32	
4	CG-FG	6,0	0,10	1,44	4,33	4,12	6,59	6,46	5,71	3,61	
5	CG0.2E	5,5	0,10	0,21	0,21	0,07	0,04	0,17	1,25	0,08	
6	CG0.2E-FG	5,5	0,10	1,24	4,42	3,85	5,82	6,05	5,52	3,03	
7	CG0.4E	5,5	0,10	0,88	2,13	2,80	3,95	3,47	2,54	0,33	
8	CG0.4E-FG	5,5	0,09	1,33	4,38	4,38	5,47	5,76	5,92	3,83	
9	CG0.6E	5,5	0,11	1,06	1,98	2,67	2,94	0,91	1,13	0,11	
10	CG0.6E-FG	5,5	0,10	1,33	4,53	4,65	5,94	6,22	6,33	4,09	
11	CG0.8E	5,5	0,10	0,60	2,28	2,75	4,55	3,99	2,07	0,12	
12	CG0.8E-FG	5,5	0,10	0,83	4,36	4,44	5,62	5,91	5,43	3,35	
13	CG2E	5,5	0,10	0,61	2,23	2,72	3,79	2,33	0,06	0,08	
14	CG2E-FG	5,5	0,1	1,13	4,39	4,51	5,74	6,20	6,12	3,91	
15	CG4E	5,5	0,10	0,66	2,37	2,78	3,96	3,56	2,04	0,12	
16	CG4E-FG	5,5	0,09	1,16	4,75	4,45	5,61	5,94	6,33	4,04	
17	CG6E	5,5	0,10	0,62	2,45	2,74	4,26	4,36	3,04	0,20	
18	CG6E-FG	5,5	0,00	1,17	4,66	4,38	5,77	6,06	6,27	4,26	
19	CG8E	5,5	0,10	0,77	2,18	2,26	2,36	2,33	2,10	1,32	
20	CG8E-FG	5,5	0,11	1,05	4,78	4,79	5,70	6,25	6,23	3,81	

ES 2 642 621 T3

21	CG10E	5,5	0,12	0,70	2,28	2,62	3,88	4,04	2,82	0,14
22	CG10E	6,0	0,11	0,64	2,21	2,20	3,24	3,84	3,13	1,02
23	CG10E-FG	5,5	0,11	0,99	4,81	4,92	5,71	6,25	6,03	3,98
24	CG10E-FG	6,0	0,10	1,28	4,85	5,12	6,58	6,88	6,46	3,90
25	Control (80 g de azúcar)	5,0	0,04	0,89	6,95	9,57	11,10	11,90	12,40	11,90
26	Control (30 g de azúcar)	5,0	0,06	1,54	6,09	6,54	7,63	8,11	8,17	6,91
27	Control (sin azúcar)	5,0	0,06	0,01	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,04
28	CG0.4E	5,5	0,09	0,12	0,15	0,11	0,15	0,07	0,84	0,05
29	CG0.4E	6,0	0,08	0,30	1,51	1,55	1,92	3,06	2,59	1,18
30	CG0.4E-FG	5,5	0,15	0,49	4,14	4,78	5,27	5,87	5,44	3,73
31	CG0.4E-FG	6,0	0,14	0,58	4,38	5,13	6,09	5,69	5,22	3,53
32	CG20E	5,5	0,18	0,27	2,55	2,70	2,71	3,19	4,14	2,56
33	CG20E-FG	5,5	0,14	0,40	4,98	5,89	5,46	5,36	5,58	3,84
34	CG30E	5,5	0,12	0,19	2,75	3,27	3,19	2,67	3,07	2,18
35	CG30E-FG	5,5	0,15	0,30	5,24	6,33	6,08	5,83	6,12	4,91
36	CG40E	5,5	0,14	0,18	3,18	4,26	4,00	3,20	3,55	2,90
37	CG40E-FG	5,5	0,14	0,30	5,62	6,50	6,99	6,74	6,91	5,37
38	CG50E	5,5	0,17	0,22	3,06	4,33	4,27	3,97	3,60	3,38
39	CG50E	6,0	0,17	0,37	4,47	4,62	5,11	4,93	5,13	3,60
40	CG50E-FG	5,5	0,17	0,27	5,77	7,93	7,58	6,95	6,92	5,90
41	CG50E-FG	6,0	0,16	0,34	6,23	7,70	7,13	5,94	5,81	4,25
42	CG60E	5,5	0,14	0,18	4,24	5,76	5,99	5,58	5,56	4,33
43	CG60E-FG	5,5	0,13	0,25	6,01	8,36	8,92	8,42	8,47	7,63
44	CG70E	5,5	0,15	0,17	6,61	6,40	6,63	6,41	6,35	5,57
45	CG70E-FG	5,5	0,13	0,20	4,52	8,98	9,25	8,75	8,68	7,44
46	CG80E	5,5	0,13	0,18	5,13	7,20	6,93	6,69	7,12	5,88
47	CG80E-FG	5,5	0,14	0,20	6,96	9,58	10,20	9,54	9,03	8,52
48	CG90E	5,5	0,14	0,16	5,10	7,34	7,69	7,07	7,40	6,83
49	CG90E-FG	5,5	0,15	0,21	7,03	9,42	11,50	11,00	9,79	8,90
50	CG100E	5,5	0,18	0,20	5,84	8,05	8,99	8,52	8,32	7,14
51	CG100E	6,0	0,15	0,24	6,46	9,03	8,73	8,75	8,38	5,94
52	CG100E	6,25	0,16	0,18	6,45	9,13	8,88	8,21	7,78	6,56
53	CG100E-FG	5,5	0,13	0,14	7,30	8,87	10,90	10,20	10,40	9,28
54	CG100E-FG	6,0	0,13	0,24	7,30	10,40	10,50	10,10	9,73	8,43
55	CG100E-FG	6,25	0,13	0,19	7,33	10,50	10,70	10,60	10,00	8,94
56	CG110E	5,5	0,16	0,12	6,19	7,95	9,65	8,60	8,66	7,94
57	CG110E	6,0	0,19	0,22	6,35	8,76	9,26	8,70	8,21	7,12
58	CG110E-FG	5,5	0,15	0,14	7,06	8,80	10,40	10,10	9,74	8,88
59	CG110E-FG	6,0	0,14	0,19	7,70	10,50	11,60	10,90	10,00	8,57
60	CG120E	5,5	0,19	0,14	6,45	7,83	9,88	9,79	8,91	8,11
61	CG120E-FG	5,5	0,15	0,13	7,35	9,02	10,60	10,70	10,00	8,88
62	Control (80 g de azúcar)	5,0	0,10	0,54	5,22	8,46	9,85	10,90	11,90	12,50
63	Control (30 g de azúcar)	5,0	0,09	0,97	5,79	7,07	8,41	8,63	8,82	4,50

ES 2 642 621 T3

64	Control (sin azúcar)	5,0	0,07	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
65	CG130E	5,5	0,10	0,19	6,71	8,15	9,88	9,13	9,16	9,15
66	CG130E	6,0	0,11	0,28	6,62	9,15	9,86	9,27	9,20	8,52
67	CG130E-FG	5,5	0,11	0,20	7,42	8,72	10,50	10,50	10,10	9,45
68	CG130E-FG	6,0	0,11	0,25	7,08	9,72	10,30	10,50	9,87	8,95
69	CG140E	5,5	0,11	0,16	6,27	7,43	9,27	9,23	9,03	8,82
70	CG140E	6,0	0,09	0,22	6,34	7,90	9,44	8,94	8,88	8,17
71	CG140E-FG	5,5	0,10	0,17	7,08	8,22	9,88	10,10	9,88	8,80
72	CG140E-FG	6,0	0,10	0,30	7,21	9,50	10,30	10,20	9,64	8,72
73	CG150E	5,5	0,10	0,16	6,04	7,65	9,00	8,96	9,20	9,14
74	CG150E	6,0	0,9	0,21	6,89	8,80	9,92	9,90	9,69	8,62
75	CG150E	6,25	0,12	0,23	6,29	8,91	9,66	7,52	9,29	8,38
76	CG150E-FG	5,5	0,10	0,18	5,86	8,36	9,73	9,41	9,31	8,87
77	CG150E-FG	6,0	0,10	0,27	7,05	9,63	9,81	9,76	9,26	8,31
78	CG150E-FG	6,25	0,06	0,28	6,89	8,86	8,90	9,95	7,52	5,97
79	CG160E	5,5	0,10	0,12	6,02	7,55	8,99	8,70	8,62	7,92
80	CG160E-FG	6,0	0,10	0,20	6,92	9,11	9,84	10,10	9,53	8,58
81	CG170E	5,5	0,10	0,14	4,89	7,39	8,60	9,49	8,68	7,59
82	CG170E-FG	6,0	0,11	0,19	7,18	8,66	10,10	9,49	9,16	7,99
83	CG180E	5,5	0,11	0,15	6,27	7,37	8,65	9,58	8,38	7,95
84	CG180E-FG	6,0	0,11	0,22	7,00	8,69	9,22	8,98	8,84	7,85
85	CG190E	5,5	0,01	0,15	5,12	6,92	8,00	9,50	8,65	8,37
86	CG190E-FG	6,0	0,09	0,17	6,66	7,92	9,12	8,87	8,75	8,03
87	CG200E	5,5	0,10	0,15	5,75	7,12	8,68	9,05	7,99	7,55
88	CG200E	6,0	0,08	0,16	6,38	8,80	8,92	8,57	8,30	6,98
89	CG200E	6,25	0,10	0,22	6,28	8,17	8,55	8,67	8,30	7,84
90	CG200E-FG	5,5	0,01	0,16	5,54	7,47	8,69	8,50	8,32	7,67
91	CG200E-FG	6,0	0,11	0,21	5,69	7,78	8,90	8,75	8,44	7,40
92	CG200E-FG	6,25	0,11	0,19	6,29	8,30	9,37	9,08	7,93	7,31
93	Control (80 g de azúcar)	5,0	0,02	0,50	4,25	6,81	7,75	8,90	8,72	9,46
94	Control (30 g de azúcar)	5,0	0,04	0,59	4,49	5,29	6,19	8,60	5,81	5,72
95	Control (sin azúcar)	5,0	0,04	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
96	Sin muestra, caldo solo de xilosa	4,5	0,03	0,28	2,07	3,82	4,37	5,44	6,41	6,72
97		5,0	0,04	0,27	2,63	4,15	7,42	8,16	8,63	9,13
98		5,5	0,04	0,34	2,94	5,00	5,96	7,96	8,77	9,39
99		6,0	0,04	0,29	2,27	5,05	6,29	7,33	8,27	8,36
100		6,5	0,04	0,28	1,59	4,40	5,72	5,61	6,93	6,21
101	Sin	4,5	0,02	0,18	1,50	2,13	1,91	2,37	1,99	0,23

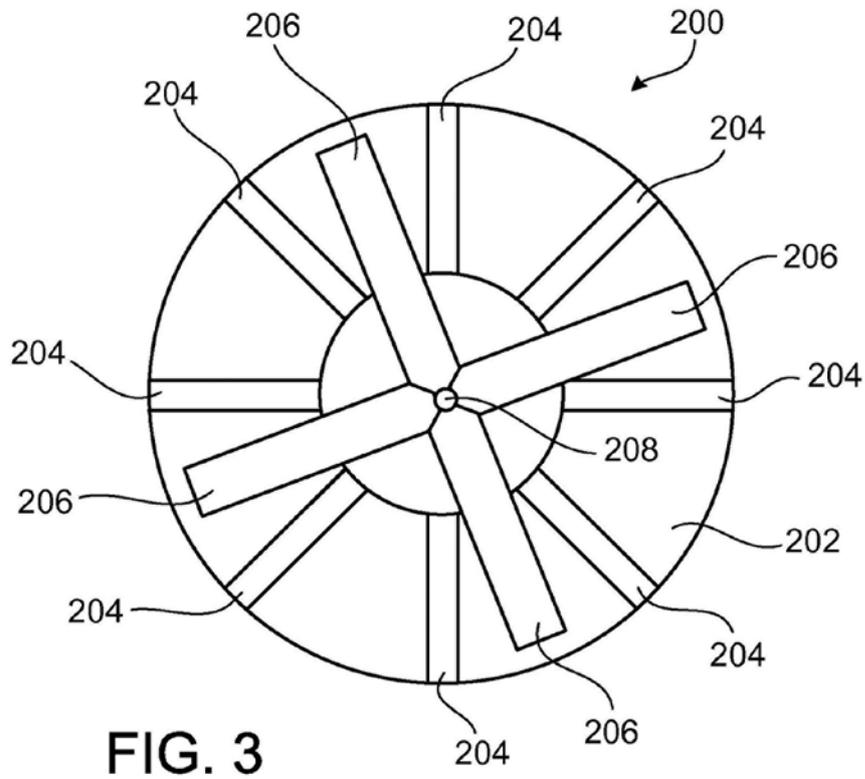
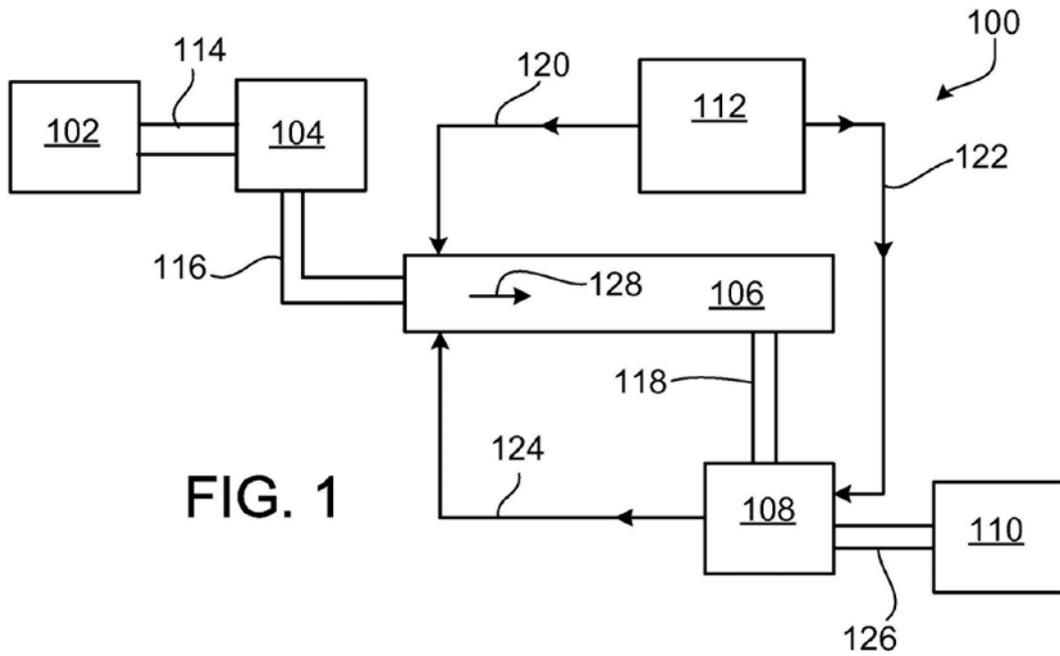
## ES 2 642 621 T3

102	muestra,	5,0	0,04	0,13	1,62	2,72	2,76	2,36	2,45	1,45
103	caldo solo	5,5	0,04	0,12	0,99	2,31	1,62	1,52	1,41	0,06
104	de xilosa	6,0	0,04	0,09	0,87	1,77	1,90	2,03	1,66	0,09
105		6,5	0,04	0,13	1,17	2,54	2,66	2,69	2,08	0,89

Tal y como indican los datos de la Tabla 1, el rendimiento de etanol generalmente aumentó al aumentar la dosis de radiación, hasta 90 MRad, después de la cual el rendimiento se estabilizó a dosis crecientes. Para una dosis de radiación y un pH determinados, el rendimiento fue, en general significativamente más alto cuando la hierba también se había sometido a trituración tras congelación previa. Para la hierba que no había sido irradiada, o que había recibido solo una dosis baja de radiación, los rendimientos fueron notablemente superiores si la hierba había sido sometida a trituración tras congelación previa.

**REIVINDICACIONES**

1. Método de procesamiento de una biomasa lignocelulósica que comprende:
  - 5 procesamiento de un material fragilizado mediante una enzima y/o un microorganismo para hacer un producto que es químicamente diferente del material fragilizado, material fragilizado que se ha producido mediante tratamiento de un material de biomasa lignocelulósica para fragilizar el material de biomasa, donde el tratamiento comprende la irradiación del material de biomasa con radiación de haz de electrones, donde el tratamiento comprende además el enfriamiento del material de biomasa a una temperatura de 273 K o menos,
  - 10 donde el enfriamiento se lleva a cabo antes de la irradiación, y donde el procesamiento del material comprende la puesta en contacto del material con una enzima y/o un microorganismo, o el material comprende celulosa y el método comprende la utilización de una enzima para sacarificar la celulosa.
- 15 2. Método de la reivindicación 1, donde la producción del material fragilizado comprende además la trituración o conminución del material de partida.
3. Método de la reivindicación 2, donde la trituración o conminución se lleva a cabo antes de que el material de partida se haya fragilizado.
- 20 4. Método de la reivindicación 2, donde el enfriamiento y la trituración o conminución se llevan a cabo simultáneamente en un dispositivo de trituración tras congelación previa o molienda tras congelación previa.
5. Método de la reivindicación 1, donde el producto comprende un alcohol.
- 25 6. Método de la reivindicación 5, donde el producto comprende etanol o butanol.
7. Método de la reivindicación 1, donde el método comprende además la separación de la lignina de la celulosa.
- 30 8. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el material de biomasa tiene más de un componente y una interfaz entre los componentes, y el tratamiento comprende el enfriamiento del material de partida a una temperatura a la cual los componentes se separan en la interfaz.
- 35 9. Método de la reivindicación 8, donde la temperatura es menor o igual al punto de fragilidad del material.
10. Método de la reivindicación 8, donde los componentes tienen coeficientes de expansión térmica diferentes.
- 40 11. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la dosis de radiación es de 10 Mrad a 100 Mrad, o 30 Mrad a 90 Mrad.



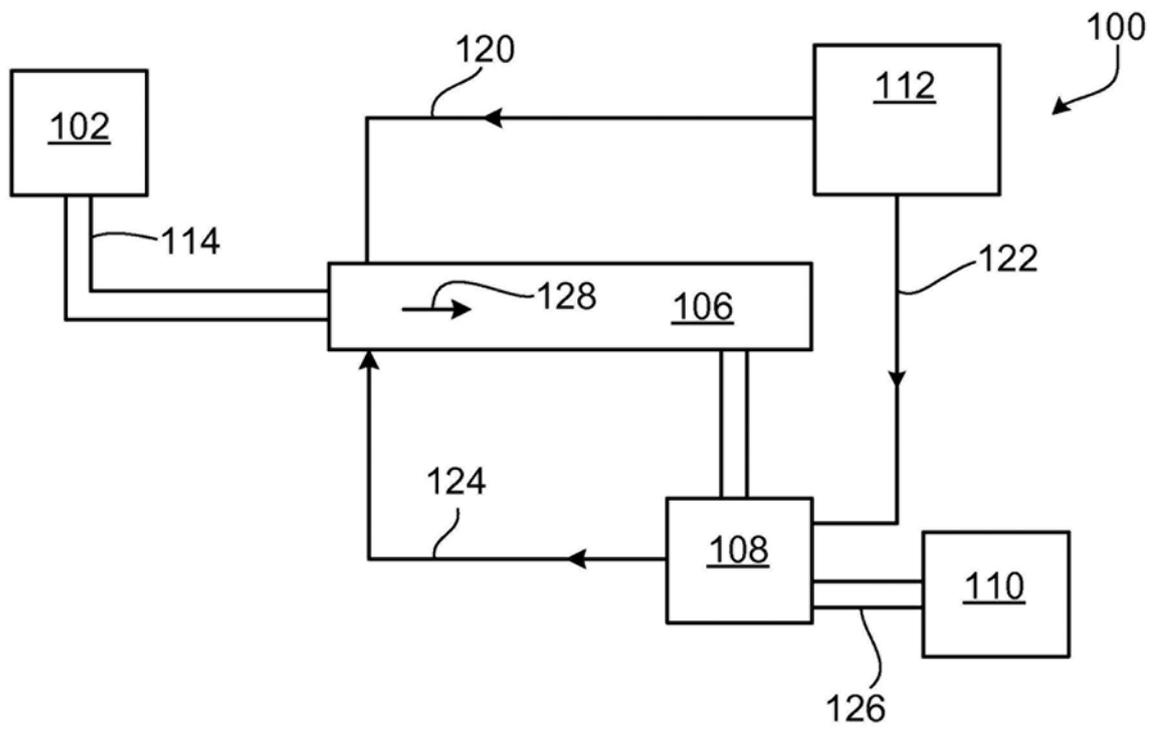


FIG. 2