

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 957**

51 Int. Cl.:

H01M 8/1009 (2006.01)

H01M 8/06 (2006.01)

H01M 8/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2012 PCT/US2012/070624**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13096452**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2012 E 12858855 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2794902**

54 Título: **Procesamiento de biomasa para uso en celdas de combustible**

30 Prioridad:

22.12.2011 US 201161579568 P

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

30.10.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 687 957 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 para uso en celdas de combustible

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de EE. UU. nº de serie 61/579.568 depositada el 22 de diciembre de 2011.

10 ANTECEDENTES

Los materiales celulósicos y lignocelulósicos (p.ej., materiales de biomasa) se producen, procesan y usan en grandes cantidades en una serie de aplicaciones. A menudo, se usan tales materiales una vez y entonces se descartan como desecho, o simplemente se considera que son materiales de desecho, p.ej. aguas residuales, 15 bagazo, serrín y rastrojos.

Un material de biomasa típico contiene celulosa, hemicelulosa y lignina más cantidades menores de proteínas, productos extraíbles y minerales. Los carbohidratos complejos contenidos en las fracciones de celulosa y hemicelulosa pueden procesarse a azúcares fermentables mediante sacarificación, usando una enzima celulólica, 20 los azúcares pueden usarse entonces como producto final o intermedio, o convertirse por bioprocesamiento adicional, p.ej. fermentación, en una variedad de productos tales como alcoholes o ácidos orgánicos. El producto obtenido depende del microorganismo utilizado y de las condiciones en las que ocurra el bioprocesamiento.

El documento JP-A 2006-314982 divulga un procedimiento de utilización de residuos producidos durante un proceso de sacarificación con ácido sulfúrico en masa de una biomasa leñosa/herbácea tal como paja de arroz. El 25 procedimiento comprende (1) usar un líquido de sacarificación como tal para generación de energía usando una celda de combustible de glucosa, o producir un material útil mediante la inoculación y cultivo del líquido de sacarificación, mientras se hace uso simultáneamente de un residuo de biomasa que contiene yeso producido por separación sólido-líquido después de neutralización como mejorador de suelo, agente supresor de la turbidez, 30 agente supresor de la erosión de suelo fino, material de compostaje, material de construcción que contiene yeso o similares; (2) como en (1), donde se usa una celda de combustible que comprende xilosa deshidrogenasa inmovilizada sobre un electrodo; (3), como en (1) o (2), donde se usa un residuo de biomasa fuertemente ácido producido después de sacarificación con ácido sulfúrico de la biomasa leñosa/herbácea como tal como mejorador de suelo alcalino o agente neutralizante de desechos alcalinos y (4) como en cualquiera de (1)-(3), donde se usa un 35 residuo o líquido de fermentación producido por fermentación de una fracción líquida obtenida mediante separación sólido-líquido en un material valioso, y separando/extrayendo entonces el material, para producir un fertilizante, mejorador de suelo, probiótico, proteína unicelular (SCP) o similar.

El documento US 2010/0200806 A1 divulga el procesamiento de cargas de alimentación de biomasa (p.ej., biomasa 40 vegetal, biomasa animal y biomasa de desechos municipales) para producir productos útiles, tales como combustibles. Por ejemplo, se describen sistemas que pueden convertir materiales de carga de alimentación en una solución de azúcar, que puede fermentarse entonces para producir etanol.

RESUMEN

45 Esta invención se refiere a procedimientos de procesamiento (p.ej. sacarificación) de materiales que contienen carbohidratos (p.ej., materiales de biomasa o materiales derivados de biomasa) para producir soluciones de azúcar (p.ej. glucosa) que pueden usarse en celdas de combustible tales como celdas de combustible de azúcar directas, celdas de combustible de azúcar indirectas y celdas de combustible biológicas. La invención se refiere también a 50 utilizar soluciones de azúcar derivadas de material que contiene carbohidratos en celdas de combustible.

Más específicamente, la invención se refiere a un procedimiento según la reivindicación 1, donde la celda de combustible contiene especialmente un agente antical o agente antiincrustamiento.

55 En algunas implementaciones, se produce la solución de azúcar mediante la sacarificación de un material lignocelulósico o celulósico, por ejemplo mediante la puesta en contacto del material con una enzima (p.ej., una celulasa). En otras implementaciones, se ha reducido la recalcitrancia del material lignocelulósico o celulósico respecto del material en su estado nativo antes de la sacarificación. En algunos casos, reducir la recalcitrancia de la carga de alimentación incluye tratar la carga de alimentación con un tratamiento. El tratamiento puede ser, por 60 ejemplo, radiación ionizante (p.ej., radiación de haz de electrones), sonicación, pirólisis, oxidación, explosión de

vapor, tratamiento químico, diversos tratamientos mecánicos y combinaciones de cualquiera de estos tratamientos. El tratamiento físico puede comprender uno cualquiera o más de los tratamientos divulgados en la presente memoria, aplicado solo o en cualquier combinación deseada, y aplicado una vez o múltiples veces. Cuando se trata con radiación ionizante, p.ej. radiación de haz de electrones, la dosificación puede ser de al menos 10 Mrad y de 5 menos de aproximadamente 200 Mrad (p.ej., 50 Mrad a 150 Mrad).

En algunas implementaciones, el procedimiento puede incluir usar un aditivo en la celda de combustible. Por ejemplo, los aditivos pueden ser ácidos, bases, tampones (p.ej., tampones fosfato), minerales, coloides, emulsiones, emulsionantes, particulados, nanopartículas, cationes, aniones, iones metálicos (p.ej., Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , K^+ , 10 Na^+), vitaminas, enzimas, peptonas, extractos, tensioactivos, nutrientes, gases (p.ej., hidrógeno, nitrógeno, helio, argón, monóxido de carbono, dióxido de carbono), productos químicos, fuentes de nitrógeno (p.ej., amoníaco, urea), pigmentos, fragancias, polímeros aniónicos, polímeros catiónicos, polímeros no iónicos, oligómeros, lípidos, grasas, tensioactivos, dispersantes, agentes antiespumantes, agentes bacteriostáticos, agentes antimicrobianos, microorganismos, modificadores de la viscosidad, agentes oxidantes (p.ej., peróxidos, cloratos), agentes reductores, 15 inhibidores de la corrosión, agentes precipitantes o coagulantes añadidos en cualquier combinación y secuencia.

Un recurso de biomasa típico contiene celulosa, hemicelulosa y lignina más cantidades menores de proteínas, productos extraíbles y minerales. En algunas implementaciones, el material celulósico o lignocelulósico incluye papel, productos de papel, desechos de papel, pulpa de papel, papeles pigmentados, papeles cargados, papeles 20 recubiertos, papeles rellenos, revistas, material impreso, papel de impresora, papel policubierto, cartulina, cartón, cartoncillo, desperdicios, algodón, madera, tablero de partículas, desechos forestales, serrín, madera de álamo, astillas de madera, hierbas, pasto aguja, Miscanthus, espartina, hierba cinta, residuos de grano, cáscaras de arroz, cáscaras de avena, cascarilla de trigo, cáscaras de cebada, desechos agrícolas, forraje, paja de colza, paja de trigo, paja de cebada, paja de avena, paja de arroz, yute, cáñamo, linaza, bambú, sisal, abacá, mazorcas de maíz, rastrojo 25 de maíz, rastrojo de soja, fibra de maíz, alfalfa, heno, pelo de coco, residuos de procesamiento de azúcar, bagazo, pulpa de remolacha, bagazo de agave, algas, algas marinas, estiércol, aguas residuales, arracacha, trigo sarraceno, plátano, cebada, yuca, kudzu, oca, sagú, sorgo, patata, batata, taro, ñame, judías, habas, lentejas, guisantes y mezclas de cualquiera de estos.

30 El material celulósico o lignocelulósico puede tratarse mecánicamente para reducir la densidad aparente del material celulósico o lignocelulósico y/o aumentar su área superficial. En algunas implementaciones, el procedimiento incluye tratar mecánicamente la carga de alimentación antes y/o después de reducir su recalcitrancia. Los tratamientos mecánicos incluyen, por ejemplo, corte, molienda, p.ej. molienda con martillos, prensado, trituración, cizallamiento y troceado. Por ejemplo, fraccionar el material de biomasa puede ser un tratamiento efectivo aplicado al material de 35 biomasa. El tratamiento mecánico puede reducir la densidad aparente de la carga de alimentación y/o aumentar el área superficial de la carga de alimentación. En algunas realizaciones, después del tratamiento mecánico, el material tiene una densidad aparente de menos de $0,75 \text{ g/cm}^3$, p.ej. menos de aproximadamente 0,7, 0,65, 0,60, 0,50, 0,35, 0,25, 0,20, 0,15, 0,10, 0,05 o menos, p.ej. menos de $0,025 \text{ g/cm}^3$. Se determina la densidad aparente usando la norma ASTM D1895B.

40 En un aspecto, la invención se caracteriza por utilizar una solución de azúcar derivada de un material celulósico o lignocelulósico como se describe anteriormente en una celda de combustible, p.ej. una celda de combustible de azúcar directa, una celda de combustible de azúcar indirecta y/o una celda de combustible biológica. Opcionalmente, el combustible puede ser un azúcar o un alcohol derivado de la sacarificación del material celulósico o 45 lignocelulósico.

Otros rasgos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

50 DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es un diagrama que ilustra la hidrólisis enzimática de celulosa a glucosa.

La FIG. 2 es un diagrama de flujo que ilustra la conversión de una carga de alimentación de biomasa para uso en una celda de combustible.

55 La FIG. 3 es un diagrama que muestra diversos procesos que usan carga de alimentación sacarificada en celdas de combustible.

La FIG. 4 es una vista esquemática de un ejemplo de una celda de combustible de glucosa directa.

La FIG. 5 es una vista esquemática de un ejemplo de una celda de combustible de azúcar indirecta.

La FIG. 6 es una vista esquemática de una semicelda de una celda de combustible biológica.

60

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- Con referencia a la FIG. 1, durante la sacarificación inicialmente se hidroliza un sustrato celulósico o lignocelulósico mediante endoglucanasas en localizaciones aleatorias, produciendo intermedios oligoméricos. Estos intermedios
- 5 son entonces sustratos para glucanasas de exoescción tales como celobiohidrolasa, produciendo celobiosa de los extremos del polímero de celulosa. La celobiosa es un dímero 1,4-ligado hidrosoluble de la glucosa. Finalmente, la celobiasa escinde la celobiosa procurando glucosa. La glucosa, u otros azúcares derivados de la sacarificación, pueden utilizarse en una celda de combustible como se describirá con detalle en la presente memoria.
- 10 Haciendo referencia a la FIG. 2, un proceso para fabricar soluciones de azúcar para incorporación a un sistema de celda de combustible puede incluir, por ejemplo, opcionalmente tratar mecánicamente una carga de alimentación celulósica y/o lignocelulósica (etapa 110). Antes y/o después de este tratamiento, la carga de alimentación puede tratarse opcionalmente con otro tratamiento físico, por ejemplo irradiación, para reducir o reducir adicionalmente su recalcitrancia (etapa 112). Se forma una solución de azúcar por sacarificación de la carga de alimentación (etapa
- 15 114), por ejemplo, mediante la adición de una o más enzimas (etapa 111). Opcionalmente, el procedimiento puede incluir también transportar, p.ej. por tuberías, vagones, camiones o barcazas la solución de azúcar (o la carga de alimentación, enzima y agua, si se efectúa la sacarificación en camino) a una planta de fabricación (etapa 116). Por ejemplo, pueden usarse en la presente memoria los procedimientos de transporte y procesamiento de biomasa discutidos en la patente de EE. UU. 8.318.453 presentada el 21 de enero de 2009. Si se desea, las etapas de
- 20 medida del contenido de lignina (etapa 118) y configuración o ajuste de los parámetros de proceso basados en esta medida (etapa 120) pueden efectuarse en diversos estadios del proceso, por ejemplo como se describe en la solicitud de EE. UU. n° 12/704.519, presentada el 11 de febrero de 2011. Se incorpora entonces la solución de azúcar a una celda de combustible o sistema de celda de combustible (122). Opcionalmente, los productos producidos en el proceso pueden procesarse adicionalmente y/o modificarse, por ejemplo si se fermentan los
- 25 azúcares del proceso hasta productos, el producto puede purificarse, por ejemplo por destilación (124). Los productos producidos en estos procesos pueden utilizarse también en un sistema de celda de combustible.

La FIG. 3 es un diagrama que muestra procesos que usan carga de alimentación sacarificada en celdas de combustible. La solución de azúcar de la carga de alimentación sacarificada puede usarse en una celda de

30 combustible de azúcar directa, una celda de combustible de azúcar indirecta o una celda de combustible biológica. Glucosa y xilosa son a menudo los azúcares más abundantes disponibles de biomasa y las soluciones de azúcar derivadas de biomasa pueden incluir una mezcla de xilosa y glucosa a relaciones variadas. Por ejemplo, puede estar presente solo glucosa o solo xilosa, especialmente en casos en que los azúcares se han aislado y/o purificado. Cuando se desea, pueden utilizarse otras relaciones, por ejemplo como porcentaje de glucosa y xilosa total, la

35 cantidad de glucosa puede ser de entre 100 % y 90 %, 90 % y 80 %, 80 % y 70 %, 70 % y 60 %, 60 % y 50 %, 50 % y 40 %, 40 % y 30 %, 30 % y 20 %, 20 % y 10 %, 10 % y 0 %. Aunque la glucosa y la xilosa son azúcares derivados de biomasa a menudo abundantes, que proporcionan a menudo más del 10 % en peso del azúcar de la biomasa (p.ej., más del 20 % en peso, más del 30 % en peso, más del 40 % en peso, más del 50 % en peso, más del 60 % en peso, o incluso más del 70 % en peso) y son útiles en estas diferentes celdas de combustible, pueden ser

40 también útiles otros azúcares y polisacáridos. Por ejemplo, pueden usarse arabinosa, manosa, galactosa y ramnosa, celulosa, almidón, xilano, glucuronoxilano, arabinoxilano, glucomanano y xiloglucano. Pueden utilizarse mezclas de cualquiera de estos azúcares. Además, los azúcares descritos en la presente memoria pueden isomerizarse (p.ej. a fructosa) y usarse entonces en una celda de combustible. Estas diferentes celdas de combustible y su uso se discuten con más detalle a continuación.

45 Las celdas de combustible de azúcar directas, por ejemplo, celdas de combustible de glucosa, incluyen generalmente un electrodo catódico, un electrodo anódico y un separador (p.ej., una membrana de intercambio aniónico (AEM) o una capa de difusión). La celda de combustible puede ser ácida o alcalina. En el ejemplo mostrado en la FIG. 4, una AME está intercalada entre un electrodo anódico y un electrodo catódico, proporcionándose

50 campos de flujo entre cada uno de los electrodos y la AEM. En algunos casos, la celda tiene una construcción de dos cilindros en que un electrodo (p.ej. el ánodo) está en forma de un cilindro interno y el otro (p.ej., el cátodo) está en forma de un cilindro externo.

El componente activo del ánodo puede ser, por ejemplo, PdNi o Pd-Pt, y el componente activo del cátodo puede ser,

55 por ejemplo, un catalizador combinado de complejo de cobalto y porfirina (CoTPP) y espinela (MnCO₂O₄) u otro catalizador adecuado.

En la realización de una celda de combustible de azúcar directa mostrada en la FIG. 4, se alimenta una solución de combustible que contiene glucosa y, generalmente, hidróxido de potasio (KOH) al canal de flujo anódico, p.ej. por

60 una bomba peristáltica (no mostrada), mientras se alimenta oxígeno al campo de flujo catódico. Se oxida la glucosa

en el ánodo y el producto reducido fluye fuera a través de un canal de salida anódico. Los electrones fluyen desde el ánodo y a través de una carga. El oxígeno se reduce en el cátodo y el gas de escape se descarga del campo de flujo catódico.

- 5 Las celdas de combustible de azúcar directas pueden oxidar o no completamente el combustible azúcar a dióxido de carbono y agua generando electricidad. Por ejemplo, puede ocurrir la reacción de oxidación total de glucosa como se muestra aquí.

Reacción anódica: $C_6H_{12}O_6 + 24OH^- \rightarrow 18H_2O + 6CO_2 + 18e^-$

10

Reacción catódica: $6O_2 + 12H_2O + 24e^- \rightarrow 24OH^-$

Reacción global: $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O \Delta H = -2830 \text{ KJ/mol}$

- 15 Puesto que la oxidación total de glucosa procede a través de muchos intermedios (p.ej., ácido glucónico, ácido glucárico, gamma-gluconolactona, gamma-glucarolactona, ácido 2-cetoglucónico, arabinosa, ácido trihidroxiglutarico, ácido tartárico, ácido hidroximalónico y ácido oxálico), puede usarse también cualquiera de estos intermedios en una celda de combustible. Cualquiera de estos intermedios, si se produce por algunos de los procesos descritos en la presente memoria (p.ej., sacarificación, fermentación) puede ser útil para la generación de electricidad en una celda de combustible. Opcionalmente, cualquier producto de azúcar no usado en la generación de electricidad en la celda de combustible de azúcar directa puede procesarse adicionalmente como se muestra en la FIG. 2, por ejemplo puede fermentarse hasta un alcohol y aislarse el alcohol por destilación. En algunos casos, la celda de combustible puede usar un azúcar, por ejemplo glucosa, y no usar otros azúcares, por ejemplo xilosa, y el segundo azúcar puede usarse en procesos posteriores. En algunos otros aspectos, un proceso, por ejemplo fermentación, usa solo un
- 20 azúcar (p.ej., glucosa), dejando otros azúcares que pueden usarse entonces en la celda de combustible. En muchos casos, ocurre solo una oxidación parcial de glucosa en una celda de combustible de azúcar directa. Por ejemplo, la oxidación de glucosa a ácido glucónico ocurre rápidamente, proporcionando 2 electrones y liberando como máximo aproximadamente 200 KJ/mol de energía (p.ej., aproximadamente un 7 % de la energía disponible). En términos de energía utilizable, las celdas de combustible convierten al menos el 1 % del combustible en energía eléctrica (p.ej.,
- 30 al menos el 5 %, al menos el 7 %, al menos el 10 %, al menos el 14 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % y al menos el 90 %). En algunos casos, se convierte entre aproximadamente 1 % y 90 % del combustible en energía eléctrica (p.ej., entre aproximadamente 1 % y 70 %, entre aproximadamente 1 % y 50 %, entre aproximadamente 1 % y 20 %, entre aproximadamente 1 % y 10 %, entre aproximadamente 5 % y 90 %, entre aproximadamente 5 % y 70 %, entre
- 35 aproximadamente 5 % y 50 %, entre aproximadamente 5 % y 25 %, entre aproximadamente 5 % y 10 %, entre aproximadamente 10 % y 90 %, entre aproximadamente 10 % y 70 %, entre aproximadamente 10 % y 50 %, entre aproximadamente 10 % y 30 %, entre aproximadamente 10 % y 20 % y entre aproximadamente 20 % y 70 %).

- Además de azúcares y productos tales como alcoholes, las soluciones derivadas de biomasa mediante los procesos descritos en la presente memoria pueden incluir diversos sólidos o compuestos y/o materiales disueltos. Por ejemplo, las soluciones pueden incluir enzimas (p.ej., partes de enzimas, enzimas activas, enzimas desnaturalizadas), aminoácidos, nutrientes, células vivas, células muertas, desechos celulares (p.ej., células lisadas, extracto de levadura), ácidos, bases, sales (p.ej., haluros, sulfatos y fosfatos, sales metálicas alcalinas, alcalinotérricas y de transición), productos de hidrólisis parcial (p.ej., fragmentos de celulosa y hemicelulosa), lignina,
- 45 residuos de lignina, sólidos inorgánicos (p.ej., materiales silíceos, arcillas, negro de carbono, metales), residuos de biomasa sacarificada y combinaciones de los mismos.

- La enzimas que pueden estar presentes pueden ser enzimas intactas o desnaturalizadas utilizadas en el procesamiento, o derivados de estas enzimas (p.ej., proteínas y aminoácidos). Estas pueden ser sólidos disueltos y/o precipitados y suspendidos. Por ejemplo, las soluciones de azúcar pueden tener hasta aproximadamente el 10 % en peso de enzimas (p.ej., hasta 9 % en peso, hasta 8 % en peso, hasta 5 % en peso, hasta 2 % en peso, hasta 1 % en peso, entre aproximadamente 0,1 y 5 % en peso, entre aproximadamente 1 % en peso y 5 % en peso, entre aproximadamente 2 % en peso y 5 % en peso, entre aproximadamente 0,1 % en peso y 1 % en peso, entre aproximadamente 0,01 % en peso y 1 % en peso y entre aproximadamente 0,001 % en peso y 0,1 % en peso).

55

- Durante la sacarificación de una biomasa, el pH óptimo puede estar a menudo en la región ácida y, por lo tanto, las soluciones usadas, si se usan directamente en un sistema de celda de combustible, pueden tener un pH entre aproximadamente 2 y 5 (p.ej., entre aproximadamente 4 y 5). El pH puede ajustarse también hacia arriba o abajo después de la sacarificación y/o realizarse la sacarificación a un pH mayor o menor. En algunas realizaciones, la
- 60 solución usada en la celda de combustible puede tener por lo tanto valores de pH seleccionados de entre un amplio

intervalo. Por ejemplo, el pH puede seleccionarse de entre un intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 (p.ej., entre aproximadamente 2 y 5, entre aproximadamente 3 y 5, entre aproximadamente 3 y 6, entre aproximadamente 4 y 6, entre aproximadamente 5 y 10, entre aproximadamente 6 y 10 o entre aproximadamente 8 y 10).

5

Las soluciones de azúcar derivadas de los procesos descritos en la presente memoria y usadas en sistemas de celda de combustible pueden incluir sólidos no de azúcar suspendidos o disueltos presentes a concentraciones de hasta aproximadamente 50 % en peso, por ejemplo entre aproximadamente 1 y 50 % en peso, 2 y 40 % en peso, 3 y 25 % en peso, 5 y 25 % en peso, 40 y 50 % en peso, 30 y 40 % en peso, 10 y 20 % en peso, 1 y 5 % en peso, 10 y 40 % en peso, menos de aproximadamente 50 % en peso, menos de aproximadamente 40 % en peso, menos de aproximadamente 30 % en peso, menos de aproximadamente 20 % en peso, menos de aproximadamente 10 % en peso, menos de aproximadamente 5 % en peso, menos de aproximadamente 1 % en peso, menos de aproximadamente 0,5 % en peso y menos de aproximadamente 0,01 % en peso. Estas soluciones pueden tener una alta turbidez, por ejemplo al menos aproximadamente 5 unidades nefelométricas de turbidez (UNT) (p.ej., al menos aproximadamente 10 UNT, al menos aproximadamente 50 UNT, al menos aproximadamente 100 UNT, al menos aproximadamente 100 UNT, al menos aproximadamente 200 UNT, al menos aproximadamente 300 UNT, al menos aproximadamente 400 UNT e incluso más de aproximadamente 500 UNT). En algunos casos, los sólidos se retiran completa o parcialmente antes de usarse en celdas de combustible. Por ejemplo, los sólidos pueden retirarse por filtración, centrifugación, sedimentación, flotación y combinaciones de estas. En algunos casos, los sólidos derivan de un material anteriormente soluble que se ha precipitado, por ejemplo una enzima que se ha desnaturalizado. Después de retirar los sólidos, la turbidez de las soluciones puede reducirse hasta aproximadamente 500 UNT (p.ej., reducirse hasta aproximadamente 100 UNT, reducirse hasta aproximadamente 50 UNT y reducirse hasta aproximadamente 5 UNT).

Además de ser turbias, las soluciones de azúcar producidas por los procesos descritos en la presente memoria pueden ser coloreadas debido a impurezas coloreadas. Por ejemplo, algunos iones metálicos y productos derivados de polifenoles y lignina producidos o liberados durante el procesamiento de una biomasa lignocelulósica pueden ser altamente coloreados. Las soluciones pueden usarse directamente en los sistemas de celda de combustible descritos en la presente memoria o pueden decolorarse parcial o completamente antes de usarse. Por ejemplo, las impurezas coloreadas pueden filtrarse de la solución, destruirse (p.ej. por descomposición química) y/o precipitarse de la solución.

La fuerza iónica de las soluciones de azúcar derivadas de biomasa puede ser alta debido a la fuente de biomasa, así como al procesamiento de la biomasa como se describe en la presente memoria. Las soluciones pueden usarse directamente, o desionizarse total, selectiva o parcialmente antes de usarse en los sistemas de celda de combustible descritos en la presente memoria.

En algunas realizaciones, la celda de combustible incluye biomasa (p.ej., biomasa lignocelulósica, biomasa celulósica, almidón) así como una enzima sacarificante. Por ejemplo, puede utilizarse azúcar en un sistema de celda de combustible mientras se produce por la acción de una enzima sacarificante sobre un material de biomasa.

En aún otras realizaciones, las soluciones de azúcar usadas en las celdas de combustible descritas en la presente memoria pueden incluir un aditivo. Tales aditivos pueden modificar propiedades de las soluciones tales como pH, viscosidad, potencial químico, tensión superficial, propiedades térmicas, color, olor, opacidad, fuerza iónica, conductividad, esterilidad y/o valor nutritivo. Por ejemplo, los aditivos pueden ser ácidos, bases, tampones (p.ej., tampones fosfato), minerales, coloides, emulsiones, emulsionantes, particulados, nanopartículas, cationes, aniones, iones metálicos (p.ej., Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , K^+ , Na^+), vitaminas, enzimas, peptonas, extractos, tensioactivos, nutrientes, gases (p.ej., hidrógeno, nitrógeno, helio, argón, monóxido de carbono, dióxido de carbono), productos químicos, fuentes de nitrógeno (p.ej., amoníaco, urea), pigmentos, fragancias, polímeros aniónicos, polímeros catiónicos, polímeros no iónicos, oligómeros, lípidos, grasas, tensioactivos, dispersantes, agentes antiespumantes, agentes bacteriostáticos, agentes antimicrobianos, microorganismos, modificadores de la viscosidad, agentes oxidantes (p.ej., peróxidos, cloratos), agentes reductores, inhibidores de la corrosión, agentes precipitantes o coagulantes añadidos en cualquier combinación y secuencia. Los aditivos pueden añadirse en intervalos de unas pocas partes por millón a varios tantos por ciento. Por ejemplo, 1 a 1000 ppm, 5 a 500 ppm, 5 a 100 ppm, 50 a 100 ppm, 100 a 1000 ppm, 1 a 10 % en peso, 2 a 10 % en peso, 5 a 10 % en peso y 2 a 5 % en peso. En algunas realizaciones que incluyen cationes, aniones y aniones metálicos, las cantidades son de entre 1 a 1000 ppm. En algunas realizaciones donde se añaden ácidos, bases o tampones, el pH final después de la adición del aditivo puede elegirse para ser entre pH 2 y 10 (p.ej., entre aproximadamente 4 y 8, entre aproximadamente 5 y 7, entre aproximadamente 6 y 8, entre aproximadamente 4 y 5, entre aproximadamente 7 y 8, entre aproximadamente 8 y 10 y entre aproximadamente 2 y 4). Los aditivos pueden medirse también y añadirse en cantidades de entre

aproximadamente 1 μM a 5 M (p.ej., entre aproximadamente 1 mM y 1 M, entre aproximadamente 5 mM y 100 mM, entre aproximadamente 100 mM y 1 molar, entre aproximadamente 10 mM y 100 mM).

La FIG. 5 es una vista esquemática de un ejemplo de una celda de combustible de azúcar indirecta. Generalmente, la celda de combustible de azúcar indirecta usa un proceso biológico para convertir un combustible primario en un combustible secundario y el combustible secundario genera una corriente que usa una celda de combustible. El combustible primario (1) se pone en contacto con un biocomponente (2) donde produce un combustible secundario (3) y desechos (4). Se lleva el combustible secundario a la celda de combustible y se pone en contacto con el ánodo (5), donde se oxida produciendo un producto reducido (8), liberando un electrón a un circuito externo, y proporcionando un protón. El protón viaja por la celda de combustible a través de una membrana selectiva iónica (6) al cátodo (7). Se suministra oxígeno al cátodo, donde se reduce por electrones suministrados por el circuito externo y se combina con el protón, produciendo agua. En otro posible diseño, el biocomponente reside en la celda de combustible, de modo que la producción de producto y electricidad ocurre toda en la celda de combustible. En algunos casos, tampoco es necesaria una membrana selectiva iónica. En otros casos, el oxidante puede ser oxidantes distintos de dióxigeno (p.ej., peróxido de hidrógeno, peróxidos orgánicos y peróxidos inorgánicos).

El combustible primario usado en la celda de combustible indirecta puede ser azúcares (p.ej., glucosa y xilosa) así como polisacáridos que pueden producirse mediante la sacarificación de biomasa como se discute anteriormente. El combustible secundario puede ser un producto de fermentación del combustible primario. Por ejemplo, el combustible secundario puede ser un alcohol u otro producto de fermentación (p.ej., etanol, metanol, butanol, polioles, ácido acético, ácido láctico y H_2). Generalmente, los combustibles primario y secundario pueden seleccionarse de intermedios y productos discutidos a continuación. El biocomponente puede ser un material microbiano incluyendo, pero sin limitación, cualquier microorganismo u organismo de origen natural o modificado genéticamente, por ejemplo, protistas, p.ej., protistas animales (p.ej., protozoos tales como flagelados, ameboides, ciliados y esporozoos) y protistas vegetales (p.ej., algas tales como alveolados, cloracnifitas, criptomónadas, euglenoides, glaucofitas, haptofitas, algas rojas, estramenópilos y plantas verdes). Otros ejemplos incluyen algas marinas, plácton (p.ej., macroplácton, mesoplácton, microplácton, nanoplácton, picoplácton y femtoplácton), fitoplácton, bacterias (p.ej., bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas y extremófilas), células humanas, células de mamífero, levadura y/o mezclas de estas. Puede haber varios biocomponentes, por ejemplo, puede haber varias bacterias especializadas en generar diferentes productos útiles para producir una corriente a partir de diferentes o los mismos componentes del combustible. Por ejemplo, los procedimientos de fermentación y organismos fermentativos discutidos en la presente memoria pueden utilizarse para producir el producto secundario.

Algunas especies de microorganismos que pueden usarse para producir el combustible secundario en la celda de combustible de azúcar indirecta son: *Clostridium saccharoutylaceticum*, *Clostridium saccharoperbutylaceticum*, *Clostridium saccharobutylicum*, *Clostridium puniceum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium aurantibutyricum*, *Clostridium felsineum*, *Clostridium butyricum*, especies de *Geobacter*, cepas del género *Saccharomyces spp.* p.ej., *Saccharomyces cerevisiae* (levadura del pan), *Saccharomyces distaticus*, *Saccharomyces uvarum*, cepas del género *Kluyveromyces*, p.ej., especies de *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis*, cepas del género *Candida*, p.ej., *Candida pseudotropicalis* y *Candida brassicae*, *Pichia stipitis* (un pariente de *Candida shehatae*), cepas del género *Clavispora*, p.ej., especies de *Clavispora lusitanae* y *Clavispora opuntiae*, cepas del género *Pachysolen*, p.ej. especies de *Pachysolen tannophilus*, y cepas del género *Bretannomyces*, p.ej., especies de *Bretannomyces clausenii* (Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, en Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C.E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212). Las levaduras comercialmente disponibles que pueden usarse para la formación de combustible secundario incluyen, por ejemplo, Red Star®/Lesaffre Ethanol Red (disponible en Red Star/Lesaffre, EE. UU.), FALI® (disponible en Fleischmann's Yeast, una división de Burns Philip Food Inc., EE. UU.), SUPERSTART® (disponible en Alltech, actualmente Lalemand), GERT STRAND® (disponible en Gert Strand AB, Suecia) y FERMOL® (disponible en DSM Specialties).

Las celdas de combustible biológicas son dispositivos capaces de transformar directamente un combustible químico en energía eléctrica mediante reacciones electroquímicas que implican rutas bioquímicas. Generalmente, esto implica enzimas o partes activas de enzimas para catálisis. Las enzimas pueden estar en un organismo vivo (p.ej. células de combustible microbianas) o pueden estar fuera de una célula viva (p.ej., celdas de combustible enzimáticas). La FIG. 6 muestra una vista esquemática de una semicelda generalizada para una celda de combustible biológica. Se pone en contacto un combustible suministrado con un componente biológico, que oxida el combustible y crea un desecho que se retira. Los electrones liberados por el combustible se transfieren desde el componente biológico a un mediador que se difunde por o se asocia con el electrodo, donde el mediador se oxida a su estado original liberando un electrón a un circuito externo. El lado oxidante de la celda de combustible no se muestra. Algunos oxidantes pueden ser, por ejemplo, O_2 , suministrado por aire, o peróxidos (p.ej., peróxido de

hidrógeno, peróxidos orgánicos, peróxidos inorgánicos). Algunas celdas de combustible biológicas no requieren un mediador; en tales celdas el electrón se transfiere directamente desde el componente biológico al electrodo. En algunas celdas de combustible biológicas, se cataliza la reacción anódica con oxígeno por un componente biológico. Se han descrito algunas celdas de combustible biológicas, por ejemplo, por Derek Lovely en "The microbe electric: conversion of organic matter to electricity", Current Opinions in Biotechnology, 2008, volumen 19, páginas 1-8, o en la patente de EE. UU. n.º 8.283.076 presentada el 18 de mayo de 2007.

5

El combustible usado en la celda de combustible biológica puede ser productos de sacarificación de biomasa como se discute anteriormente. Especialmente en casos en que se utilizan organismos (p.ej., celdas de combustible 10 microbianas), pueden añadirse otros nutrientes y componentes de medio a los combustibles, por ejemplo iones (p.ej., sodio, potasio, hierro, magnesio, manganeso, cinc, cobre), fosfatos, sulfatos, amoníaco, urea, aminoácidos, proteínas, vitaminas, tampones, ácidos orgánicos, ácidos inorgánicos, bases orgánicas, bases inorgánicas, extractos ricos en nutrientes (p.ej., extractos de levadura, extractos de carne y extractos vegetales). Adicionalmente, temperatura y pH pueden controlarse. Por ejemplo, pueden usarse temperaturas de entre 10 y 70 °C (p.ej. entre 15 aproximadamente 10 y 60 °C, entre aproximadamente 10 y 50 °C, entre aproximadamente 10 y 40 °C, entre aproximadamente 20 y 70 °C, entre aproximadamente 20 y 60 °C, entre aproximadamente 20 y 50 °C, entre aproximadamente 20 y 40 °C, entre aproximadamente 30 y 70 °C, entre aproximadamente 30 y 60 °C, entre aproximadamente 30 y 50 °C o entre aproximadamente 30 y 40 °C). El pH puede ser de entre aproximadamente 3 y 10 (p.ej., entre aproximadamente 3 y 9, entre aproximadamente 3 y 8, entre aproximadamente 3 y 7, entre 20 aproximadamente 3 y 6, entre aproximadamente 3 y 5, entre aproximadamente 4 y 9, entre aproximadamente 4 y 8, entre aproximadamente 4 y 7, entre aproximadamente 5 y 9, entre aproximadamente 5 y 8 o entre aproximadamente 5 y 7).

Los ejemplos de organismos que pueden ser útiles en celdas de combustible biológicas son especies de 25 *Geobacter*, *Proteus vulgaris*, *Desulphovibrio desulphuricans*, *E. coli*, *Actinobacillus succinogenes*, *Desulphovibrio vulgaris*, *Shewanella putrefaciens* y *Rhodoferrax ferrireducens*.

Son ejemplos de enzimas que pueden ser útiles en celdas de combustible biológicas glucosa oxidasa, alcohol 30 deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, formiato deshidrogenasa, oxidorreductasa, diaforasa, flavo-oxidorreductasa, lacasa, microperoxidasa, glucosa deshidrogenasa, hidrogenasa, peroxidasa, enzimas reconstituidas de esta lista y combinaciones de las mismas.

TRATAMIENTOS MECÁNICOS

35 La carga de alimentación de biomasa (p.ej., material celulósico y/o lignocelulósico) puede tratarse mecánicamente antes o después de otros tratamientos. Los procedimientos de tratamiento mecánico de material que contiene 40 carbohidratos incluyen, por ejemplo, la molienda o trituración. La molienda puede efectuarse usando, por ejemplo, un molino de martillos, molino de bolas, molino coloidal, molino cónico o de cono, molino de disco, molino de muelas verticales, molino Wiley, molino de grano u otros molinos. La trituración puede efectuarse usando, por ejemplo, una 45 trituradora de tipo corte/impacto. Algunas trituradoras ejemplares incluyen trituradoras de piedra, trituradoras de púas, trituradoras de café y trituradoras de fresado. La trituración o molienda puede proporcionarse, por ejemplo, por una púa alternante u otro elemento, como es el caso en un molino de púas. Otros procedimientos de tratamiento mecánico incluyen arranque o desgarrado mecánicos, otros procedimientos que aplican presión a las fibras y molienda por fricción. Los tratamientos mecánicos adecuados incluyen además cualquier otra técnica que continúe la 50 perturbación de la estructura interna del material que se inició por las etapas de procesamiento anteriores.

Los sistemas de preparación de la alimentación mecánicos se pueden configurar para producir corrientes con características específicas tales como, por ejemplo, tamaños máximos específicos, relaciones de anchura-longitud 50 específicas o relaciones de áreas superficiales específicas. La preparación física puede aumentar la tasa de reacciones, mejorar el movimiento del material, mejorar el perfil de irradiación del material, mejorar la uniformidad de radiación del material o reducir el tiempo de procesamiento requerido al abrir los materiales y hacerlos más accesibles a procesos y/o reactivos, tales como reactivos en una solución.

La densidad aparente de las cargas de alimentación se puede controlar (p.ej., aumentar). En algunas situaciones, 55 puede ser deseable preparar un material con una densidad aparente baja, p.ej., mediante densificación del material (p.ej., la densificación puede facilitar y reducir el coste del transporte a otro lugar) y, entonces, reversión del material a un estado con una densidad aparente inferior (p.ej., después del transporte). El material se puede densificar, por ejemplo, desde menos de aproximadamente 0,2 g/cc a más de aproximadamente 0,9 g/cc (p.ej., menos de 60 aproximadamente 0,3 a más de aproximadamente 0,5 g/cc, menos de aproximadamente 0,3 a más de aproximadamente 0,9 g/cc, menos de aproximadamente 0,5 a más de aproximadamente 0,9 g/cc, menos de

aproximadamente 0,3 a más de aproximadamente 0,8 g/cc, menos de aproximadamente 0,2 a más de aproximadamente 0,5 g/cc). Por ejemplo, el material se puede densificar mediante los procedimientos y equipos divulgados en la pat. de EE. UU. n° 7.932.065 de Medoff y la publicación internacional n° WO 2008/073186 (que se presentó el 26 de octubre de 2007, se publicó en inglés y designaba los Estados Unidos). Los materiales densificados se pueden procesar mediante cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria, o cualquier material procesado mediante cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria se puede densificar posteriormente.

En algunas realizaciones, el material que se va a procesar está en forma de un material fibroso que incluye fibras proporcionadas por el cizallamiento de una fuente de fibra. Por ejemplo, el cizallamiento se puede efectuar con un cortador de cuchillas giratorias.

Por ejemplo, una fuente de fibra que, *p.ej.*, es recalcitrante o a la que se ha reducido su grado de recalcitrancia, se puede someter a cizallamiento, *p.ej.*, en un cortador de cuchillas giratorias, proporcionando un primer material fibroso. El primer material fibroso se pasa a través de un primer tamiz, *p.ej.*, que tiene un tamaño de apertura medio de 1,59 mm o menos (1/16 de pulgada, 0,0625 pulgadas), proporcionando un segundo material fibroso. Si se desea, la fuente de fibra se puede cortar antes del cizallamiento, *p.ej.*, con una desmenuzadora. Por ejemplo, cuando se usa un papel como fuente de fibra, primero se puede cortar el papel en tiras que son, *p.ej.* de 1/4 a 1/2 de pulgada (0,635 a 1,27 cm) de ancho, usando una desmenuzadora, *p.ej.*, una demenzadora de tornillo contrarrotatorio, tal como las fabricadas por Munson (Utica, N.Y.). Como alternativa al desmenuzamiento, se puede reducir el tamaño del papel mediante corte a un tamaño deseado usando un cortador de tipo guillotina. Por ejemplo, el cortador de tipo guillotina se puede usar para cortar el papel en láminas que son, *p.ej.*, de 10 pulgadas (25,4 cm) de ancho por 12 pulgadas (30,48 cm) de largo.

En algunas realizaciones, el cizallamiento de la fuente de fibra y el paso del primer material fibroso resultante a través de un primer tamiz se efectúan simultáneamente. El cizallamiento y el paso también se pueden efectuar en un proceso en lotes.

Por ejemplo, se puede usar un cortador de cuchillas giratorias para el cizallamiento de la fuente de fibra y el tamizado del primer material fibroso simultáneos. Un cortador de cuchillas giratorias incluye una tolva que se puede cargar con una fuente de fibra desmenuzada preparada mediante desmenuzamiento de una fuente de fibra.

En algunas implementaciones, la carga de alimentación se trata físicamente antes de la sacarificación y/o fermentación. Los procesos de tratamiento físico pueden incluir uno o más de cualquiera de los descritos en la presente memoria, tales como tratamiento mecánico, tratamiento químico, irradiación, sonicación, oxidación, pirólisis o explosión de vapor. Los procedimientos de tratamiento pueden usarse en combinaciones de dos, tres, cuatro o incluso todas estas tecnologías (en cualquier orden). Cuando se usa más de un procedimiento de tratamiento, los procedimientos se pueden aplicar al mismo tiempo o en momentos diferentes. También se pueden usar otros procesos que cambian la estructura molecular de una carga de alimentación de biomasa, por sí solos o en combinación con los procesos divulgados en la presente memoria.

Los tratamientos mecánicos que pueden usarse, y las características de las cargas de alimentación tratadas mecánicamente, se describen con más detalle en el documento de EE. UU. de n° de serie 13/276.192, presentado el 18 de octubre de 2011.

Además de esta reducción de tamaño, que puede efectuarse inicialmente y/o más tarde durante el procesamiento, el tratamiento mecánico también puede ser ventajoso para "abrir", "estresar", romper o despedazar los materiales de carga de alimentación, haciendo la celulosa de los materiales más susceptible de escisión de cadena y/o perturbación de la estructura cristalina durante el tratamiento de modificación estructural.

La biomasa puede estar en forma seca, por ejemplo con menos de aproximadamente 35 % de contenido de humedad (*p.ej.*, menos de aproximadamente 20 %, menos de aproximadamente 15 %, menos de aproximadamente 10 %, menos de aproximadamente 5 %, menos de aproximadamente 4 %, menos de aproximadamente 3 %, menos de aproximadamente 2 % o incluso menos de aproximadamente 1 %). La biomasa puede suministrarse también en estado húmedo, por ejemplo como un sólido húmedo, una suspensión densa o una suspensión con al menos aproximadamente un 10 % en peso de sólidos (*p.ej.*, al menos aproximadamente 20 % en peso, al menos aproximadamente 30 % en peso, al menos aproximadamente 40 % en peso, al menos aproximadamente 50 % en peso, al menos aproximadamente 60 % en peso, al menos aproximadamente 70 % en peso).

Los procesos divulgados en la presente memoria pueden utilizar materiales de densidad aparente baja, por ejemplo,

- cargas de alimentación celulósicas o lignocelulósicas, que se han pretratado físicamente para que tengan una densidad aparente de menos de aproximadamente $0,75 \text{ g/cm}^3$, *p.ej.*, de menos de aproximadamente 0,7; 0,65; 0,60; 0,50; 0,35; 0,25; 0,20; 0,15; 0,10; 0,05 o menos, *p.ej.*, de menos de $0,025 \text{ g/cm}^3$. Se determina la densidad aparente usando la norma ASTM D1895B. Brevemente, el procedimiento implica rellenar un cilindro de medida 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 por el volumen conocido del cilindro en centímetros cúbicos. Si se desea, los materiales de baja densidad aparente se pueden densificar, por ejemplo, mediante los procedimientos descritos en la patente de EE. UU. n° 7.971.809 de Medoff.
- 5
- 10 En algunos casos, la biomasa puede cribarse a través de una malla o placa perforada con un tamaño de apertura deseado, por ejemplo menos de aproximadamente 6,35 mm (1/4 de pulgada, 0,25 pulgadas), (*p.ej.*, menos de aproximadamente 3,18 mm (1/8 de pulgada, 0,125 pulgadas), menos de aproximadamente 1,59 mm (1/16 de pulgada, 0,0625 pulgadas), menos de aproximadamente 0,79 mm (1/32 de pulgada, 0,03125 pulgadas), *p.ej.*, menos de aproximadamente 0,51 mm (1/50 de pulgada, 0,02000 pulgadas), menos de aproximadamente 0,40 mm (1/64 de pulgada, 0,015625 pulgadas), menos de aproximadamente 0,23 mm (0,009 pulgadas), menos de aproximadamente 0,20 mm (1/128 de pulgada, 0,0078125 pulgadas), menos de aproximadamente 0,18 mm (0,007 pulgadas), menos de aproximadamente 0,13 mm (0,005 pulgadas) o incluso menos de aproximadamente 0,10 mm (1/256 de pulgada, 0,00390625 pulgadas)).
- 15
- 20 El cribado de material de biomasa puede ser también por un procedimiento manual, por ejemplo por un operario o mecanoide (*p.ej.*, un robot equipado con un color, reflectividad u otro sensor) que retira el material indeseado. El cribado puede ser también por cribado magnético, donde se dispone un imán cerca del material transportado y se retira magnéticamente el material magnético.
- 25 Opcionalmente, antes del procesamiento adicional, el material de biomasa puede calentarse, por ejemplo por radiación, IR, microondas, combustión (*p.ej.*, gas, carbón, petróleo, biomasa), calentamiento resistivo y/o calentamiento inductivo. El calentamiento puede ser, por ejemplo, con el fin de secar el material. En el caso de secar el material, esto puede facilitarse también, con o sin calentamiento, por el movimiento de un gas (*p.ej.*, aire, oxígeno, nitrógeno, He, CO₂, argón) sobre y a través de la biomasa.
- 30 Opcionalmente, la biomasa puede enfriarse antes o después del tratamiento mecánico. El material de enfriamiento se describe en la patente de EE. UU. n° 7.900.857 de Medoff.

TRATAMIENTO DE RADIACIÓN

- 35 En algunos casos, la carga de alimentación puede irradiarse para modificar su estructura y reducir así su recalcitrancia. La irradiación puede reducir, por ejemplo, el peso molecular medio de la carga de alimentación, cambiar la estructura cristalina de la carga de alimentación, cambiar la funcionalización de la carga de alimentación (*p.ej.*, por oxidación) y/o aumentar el área superficial y/o porosidad de la carga de alimentación.
- 40 Se pueden usar diversos otros dispositivos de irradiación en los procedimientos divulgados en la presente memoria, incluyendo fuentes de ionización de campo, separadores de iones electrostáticos, generadores de ionización de campo, fuentes de emisión termoiónicas, fuentes de iones de descarga de microondas, aceleradores estáticos o de recirculación, aceleradores lineales dinámicos, aceleradores van de Graaff y aceleradores en tándem multiplicado.
- 45 Se divulgan tales dispositivos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n° 7.931.784 de Medoff.
- Puede usarse un haz de electrones como fuente de radiación. Un haz de electrones tiene las ventajas de tasas de dosificación altas (*p.ej.*, 1, 5, o incluso 10 Mrad por segundo), alto rendimiento, menos contención y menos equipo de confinamiento. Los haces de electrones pueden tener también una alta eficiencia eléctrica (*p.ej.*, 80 %), permitiendo un uso de energía menor respecto a otros procedimientos de radiación, lo que puede traducirse en un menor coste de operación y menores emisiones de gases de efecto invernadero correspondientes a la menor cantidad de energía usada. Los haces de electrones pueden generarse, *p. ej.*, por generadores electrostáticos, generadores en cascada, generadores transformadores, aceleradores de baja energía con un sistema de exploración, aceleradores de baja energía con un cátodo lineal, aceleradores lineales y aceleradores por pulsos.
- 50 Los electrones pueden ser también más eficientes para causar cambios en la estructura molecular de materiales que contienen carbohidratos, por ejemplo por el mecanismo de escisión de cadena. Además, los electrones que tienen energías de 0,5-10 MeV pueden penetrar en materiales de baja densidad, tales como los materiales de biomasa descritos en la presente memoria, *p.ej.*, materiales que tienen una densidad aparente de $0,5 \text{ g/cm}^3$, y una profundidad de 0,3-10 cm. Los electrones como fuente de radiación ionizante pueden ser útiles, *p.ej.*, para pilas,
- 55
- 60

capas o lechos relativamente finos de materiales, *p.ej.*, menos de aproximadamente 0,5 pulgadas (1,27 cm), *p.ej.*, menos de aproximadamente 0,4 pulgadas (1,016 cm), 0,3 pulgadas (0,762 cm), 0,25 pulgadas (0,635 cm) o menos de aproximadamente 0,1 pulgadas (0,254 cm). En algunas realizaciones, la energía de cada electrón en el 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. Se discuten procedimientos de irradiación de materiales en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n° 2012/01000577 A1, presentada el 18 de octubre de 2011.

Los dispositivos de irradiación de haces de electrones pueden procurarse comercialmente en Ion Beam Applications, Louvain-la-Neuve, Bélgica o Titan Corporation, San Diego, CA. Pueden ser energías de electrones típicas de 0,5 MeV, 1 MeV, 2 MeV, 4,5 MeV, 7,5 MeV o 10 MeV. Pueden ser potencias de dispositivo de irradiación de haz de electrones típicas de 1 KW, 5 KW, 10 KW, 20 KW, 50 KW, 60 KW, 70 KW, 80 KW, 90 KW, 100 KW, 125 KW, 150 KW, 175 KW, 200 KW, 250 KW, 300 KW, 350 KW, 400 KW, 450 KW, 500 KW, 600 KW, 700 KW, 800 KW, 900 KW o incluso 1000 KW.

Las compensaciones al considerar las especificaciones de potencia del dispositivo de irradiación con haz de electrones incluyen el coste de operación, los costes de capital, la depreciación y la huella del dispositivo. Las compensaciones al considerar los niveles de dosis de exposición de la irradiación con haz de electrones serían los costes de energía y las preocupaciones sobre el medio ambiente, la seguridad y la salud (ESH). Típicamente, los generadores se albergan en una bóveda, *p.ej.*, de plomo u hormigón, especialmente para la producción de rayos X que se generan en el proceso. Las compensaciones al considerar las energías de electrones incluyen los costes de energía.

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

En algunas realizaciones, se usan dos o más fuentes de radiación, tales como dos o más fuentes de radiación ionizante. Por ejemplo, las muestras pueden tratarse, 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, tales como un haz de electrones, radiación gamma y luz UV energética. La biomasa se transporta a través de la zona de irradiación (354 en la FIG. 3) donde puede irradiarse, por ejemplo por electrones. Se prefiere generalmente que el lecho de material de biomasa tenga un grosor relativamente uniforme, como se describe anteriormente, mientras se irradia.

La efectividad del cambio de estructura molecular/supramolecular y/o de la reducción de la recalcitrancia de la biomasa que contiene carbohidratos depende de la energía electrónica usada y de la dosis aplicada, mientras que el tiempo de exposición depende de la potencia y la dosis.

En algunas realizaciones, la irradiación (con cualquier fuente de radiación o una combinación de fuentes) se efectúa hasta que el material recibe una dosis de al menos aproximadamente 0,05 Mrad, *p.e.*, al menos aproximadamente 0, 1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175 o 200 Mrad. En algunas realizaciones, la irradiación se efectúa hasta que el material recibe una dosis de entre 0,1-100 Mrad, 1-200, 5-200, 10-200, 5-150, 50-150, 100-200, 100-150, 80-120, 5-100, 5-50, 5-40, 10-50, 10-75, 15-50, 20-35 Mrad.

En algunas realizaciones, se efectúa la irradiación a una tasa de dosis de entre 5,0 y 1500,0 kilorad/hora, *p.ej.* entre 10,0 y 750,0 kilorad/h o entre 50,0 y 350,0 kilorad/h. En algunas realizaciones, se efectúa la irradiación a una tasa de dosis de entre 10 y 10000 kilorad/h, entre 100 y 1000 kilorad/h o entre 500 y 1000 kilorad/h.

En algunas implementaciones, es deseable enfriar el material durante la irradiación. Por ejemplo, el material puede enfriarse mientras se transporta, por ejemplo por una extrusora de tornillo u otro equipo de transporte.

La radiación se puede aplicar mientras que el material celulósico y/o lignocelulósico está expuesto al aire, aire enriquecido con oxígeno, o incluso al propio oxígeno, o cubierto con un gas inerte tal como nitrógeno, argón o helio. Cuando se desea la oxidación máxima, se utiliza un entorno oxidante, tal como aire u oxígeno, y la distancia desde la fuente de radiación se optimiza para maximizar la formación de gas reactivo, *p.ej.*, ozono y/u óxidos de nitrógeno.

SONICACIÓN, PIRÓLISIS, OXIDACIÓN, EXPLOSIÓN DE VAPOR

60

Si se desea, pueden usarse uno o más procesos de sonicación, pirólisis, oxidación o explosión de vapor además o en lugar de irradiación para reducir la recalcitrancia de la carga de alimentación. Estos procesos se describen con detalle en el documento de EE. UU. n° de serie 12/429.045.

5 **SACARIFICACIÓN**

Los materiales de biomasa tratados pueden sacarificarse, generalmente combinando el material y una enzima celulasa en un medio fluido, p.ej. una solución acuosa. En algunos casos, el material se hierve, macera o cuece en agua caliente antes de la sacarificación, como se describe en la pub. de sol. de patente de EE. UU. n° 2012/01000577 A1, presentada el 18 de octubre de 2011.

El proceso de sacarificación puede efectuarse parcial o completamente en un tanque (p.ej., un tanque que tenga un volumen de al menos 4.000, 40.000 o 500.000 l) en una planta de fabricación y/o puede efectuarse parcial o completamente en tránsito, p.ej. en un vagón, camión cisterna o en un superpetrolero o la bodega de un barco. El tiempo requerido para completar la sacarificación dependerá de las condiciones de proceso y del material que contiene carbohidratos y enzima usados. Si se efectúa la sacarificación en una planta de fabricación en condiciones controladas, la celulosa puede convertirse de forma sustancialmente completa en azúcar, p.ej. glucosa en aproximadamente 12-96 horas. Si la sacarificación se efectúa parcial o completamente en tránsito, la sacarificación puede requerir más tiempo.

Se prefiere generalmente mezclar los contenidos del tanque durante la sacarificación, p.ej. usando mezclado a chorro como se describe en la sol. internacional n°PCT/US2010/035331, presentada el 18 de mayo de 2010, que se publicó en inglés como WO 2010/135380 y designaba los Estados Unidos.

La adición de tensioactivos puede mejorar la tasa de sacarificación. Los ejemplos de tensioactivos incluyen tensioactivos no iónicos, tales como Tween® 20 o Tween® 80, tensioactivos de polietilenglicol, tensioactivos iónicos o tensioactivos anfóteros.

Se prefiere generalmente que la concentración de la solución de azúcar resultante de la sacarificación sea relativamente alta, p.ej., mayor del 40 % o mayor del 50, 60, 70, 80, 90 o incluso mayor del 95 % en peso. Puede retirarse el agua, p.ej., por evaporación, para aumentar la concentración de la solución de azúcar. Esto reduce el volumen de envío e inhibe también el crecimiento microbiano en la solución.

Como alternativa, pueden usarse soluciones de azúcar de menores concentraciones, en cuyo caso puede ser deseable añadir un aditivo antimicrobiano, p.ej. un antibiótico de amplio espectro, a una baja concentración, p.ej., de 50 a 150 ppm. Otros antibióticos adecuados incluyen anfotericina B, ampicilina, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina, higromicina B, kanamicina, neomicina, penicilina, puromicina y estreptomina. Los antibióticos inhibirán el crecimiento de microorganismos durante el transporte y almacenamiento, y se pueden usar en concentraciones adecuadas, por ejemplo, entre 15 y 1000 ppm en peso, por ejemplo, entre 25 y 500 ppm, o entre 50 y 150 ppm. Si se desea, se puede incluir un antibiótico incluso si la concentración de azúcar es relativamente alta. Como alternativa, pueden usarse otros aditivos con propiedades antimicrobianas o conservantes. Preferiblemente, el aditivo o aditivos antimicrobianos son de pureza alimentaria.

Puede obtenerse una solución de concentración relativamente alta limitando la cantidad de agua añadida al material que contiene carbohidratos con la enzima. La concentración se puede controlar, p.ej., controlando cuánta sacarificación tiene lugar. Por ejemplo, la concentración se puede aumentar añadiendo más material que contiene carbohidratos a la solución. Para mantener en solución el azúcar que se está produciendo, puede añadirse un tensioactivo, p.ej., uno de los discutidos anteriormente. La solubilidad puede aumentarse también aumentando la temperatura de la solución. Por ejemplo, la solución puede mantenerse a una temperatura de 40-50 °C, 60-80 °C o incluso mayor.

AZÚCARES

En los procesos descritos en la presente memoria, por ejemplo después de la sacarificación, pueden aislarse azúcares (p.ej., glucosa y xilosa). Por ejemplo, pueden aislarse azúcares mediante precipitación, cristalización, cromatografía (p.ej., cromatografía de lecho móvil simulado, cromatografía de alta presión), centrifugación, extracción, cualquier otro procedimiento de aislamiento conocido en la materia y combinaciones de los mismos.

FERMENTACIÓN

60

Pueden usarse levaduras y bacterias *Zymomonas*, por ejemplo, para fermentación o conversión de azúcar o azúcares en alcohol o alcoholes. Se discuten a continuación otros microorganismos. El pH óptimo para las fermentaciones es de aproximadamente pH 4 a 7. Por ejemplo, el pH óptimo para la levadura es de aproximadamente 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 168 horas (*p.ej.*, de 24 a 96 h) con temperaturas en el intervalo de 20 °C a 40 °C (*p.ej.*, de 26 °C a 40 °C), sin embargo, los microorganismos termófilos prefieren temperaturas superiores.

En algunas realizaciones, *p.ej.* cuando se usan organismos anaerobios, al menos una parte de la fermentación se realiza en ausencia de oxígeno, *p.ej.*, bajo una capa de un gas inerte tal como N₂, Ar, He, CO₂ o mezclas de los mismos. Adicionalmente, la mezcla puede tener una purga constante de un gas inerte que fluye a través del tanque durante parte de, o toda, la fermentación. En algunos casos, las condiciones anaerobias se pueden conseguir o mantener mediante producción de dióxido de carbono durante la fermentación sin necesidad de gas inerte adicional alguno.

En algunas realizaciones, todo o una parte del proceso de fermentación, se puede interrumpir antes de que el azúcar de bajo peso molecular se haya convertido completamente en un producto (*p.ej.*, etanol). Los productos intermedios de la fermentación incluyen azúcar y carbohidratos a altas concentraciones. Los azúcares y carbohidratos pueden aislarse mediante cualquier medio conocido en la materia. Estos productos intermedios de la fermentación se pueden usar en la preparación de alimentos para el consumo humano o animal. Adicionalmente, o como alternativa, los productos intermedios de la fermentación se pueden triturar a un tamaño de partícula fino en un molino de laboratorio de acero inoxidable para producir una sustancia similar a la harina.

El mezclado a chorro puede usarse durante la fermentación y, en algunos casos, se efectúan sacarificación y fermentación en el mismo tanque.

Pueden añadirse nutrientes para los microorganismos durante la sacarificación y/o fermentación, por ejemplo los paquetes de nutrientes basados en alimentos descritos en la pub. de sol. de pat. de EE. UU . n° 2012/0052536, presentada el 15 de julio de 2011.

Se pueden utilizar fermentadores móviles, como se describe en la solicitud internacional n°PCT/US2007/074028 (que se presentó el 20 de julio de 2007, se publicó en inglés como WO 2008/011598 y designaba los Estados Unidos). De forma similar, el equipo de sacarificación puede ser móvil. Además, la sacarificación y/o fermentación se pueden efectuar en parte o en su totalidad durante el tránsito.

35 **DESTILACIÓN**

Después de la fermentación, los fluidos resultantes se pueden destilar usando, por ejemplo, una "columna de destilación de cerveza" para separar el etanol y otros alcoholes de la mayoría del agua y los sólidos residuales. El vapor que sale de la columna de destilación de cerveza puede ser, *p.ej.*, etanol al 35 % en peso y se puede alimentar a una columna rectificadora. Una mezcla prácticamente azeotrópica de etanol (92,5 %) y agua procedente de la columna rectificadora se puede purificar para obtener etanol puro (99,5 %) usando tamices moleculares en fase vapor. El fondo de la columna de destilación de cerveza se puede enviar al primer efecto de un evaporador de tres efectos. El condensador de reflujo de la columna rectificadora puede proporcionar calor para este primer efecto.

Después del primer efecto, los sólidos se pueden separar usando una centrifugadora y secar en una secadora rotativa. Una porción (25 %) del efluente de la centrifugadora se puede reciclar a la fermentación y el resto se puede enviar al segundo y tercer efectos del evaporador. La mayor parte del condensado del evaporador se puede devolver al proceso como condensado relativamente limpio, con una pequeña porción separada al tratamiento de aguas residuales para evitar la acumulación de compuestos de bajo punto de ebullición.

50 **INTERMEDIOS Y PRODUCTOS**

Usando los procesos descritos en la presente memoria, el material de biomasa se puede convertir en uno o más productos, tales como energía, combustibles, alimentos y materiales. Los ejemplos específicos de productos incluyen, pero sin limitación, hidrógeno, azúcares (*p.ej.* glucosa, xilosa, arabinosa, manosa, galactosa, fructosa, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos), alcoholes (*p.ej.*, alcoholes monohidroxílicos o alcoholes dihidroxílicos, tales como etanol, n-propanol, isobutanol, *sec*-butanol, *terc*-butanol o n-butanol), alcoholes hidratados o hídricos (*p.ej.*, que contengan más del 10 %, 20 %, 30 % o incluso más del 40 % de agua), biodiésel, ácidos orgánicos, hidrocarburos (*p.ej.*, metano, etano, propano, isobuteno, pentano, n-hexano, biodiésel, biogasolina y mezclas de los mismos), coproductos (*p.ej.*, proteínas, tales como proteínas celulolíticas (enzimas) o proteínas unicelulares) y

- mezclas de cualquiera de estos, en cualquier combinación o concentración relativa y, opcionalmente, en combinación con cualquier aditivo, *p.ej.*, aditivos para combustible). Otros ejemplos incluyen ácidos carboxílicos, sales de un ácido carboxílico, una mezcla de ácidos carboxílicos y sales de ácidos carboxílicos y ésteres de ácidos carboxílicos (*p.ej.*, ésteres metílicos, etílicos y n-propílicos), cetonas (*p.ej.*, acetona), aldehídos (*p.ej.*, acetaldehído),
- 5 ácidos alfa y beta insaturados (*p.ej.*, ácido acrílico) y olefinas (*p.ej.*, etileno). Otros alcoholes y derivados de alcoholes incluyen propanol, propilenglicol, 1,4-butanodiol, 1,3-propanodiol, alcoholes de azúcar (*p.ej.*, eritritol, glicol, glicerol, sorbitol, treitol, arabitol, ribitol, manitol, dulcitol, fucitol, iditol, isomaltitol, maltitol, lactitol, xilitol y otros polioles) y ésteres metílicos o etílicos de cualquiera de estos alcoholes. Otros productos incluyen acrilato de metilo, metacrilato de metilo, ácido láctico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido
- 10 succínico, ácido valérico, ácido caproico, ácido 3-hidroxi propiónico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido glutárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido glicólico, ácido γ -hidroxibutírico y mezclas de los mismos, sales de cualquiera de estos ácidos o mezclas de cualquiera de los ácidos y sus respectivas sales. Muchos de los productos obtenidos, tales como etanol o n-butanol, pueden utilizarse como combustible para impulsar coches, camiones, tractores, barcos o trenes, *p.ej.*, como combustible de combustión interna o como carga de
- 15 alimentación de celdas de combustible. Muchos de los productos obtenidos pueden utilizarse también para impulsar aeronaves tales como aviones, *p.ej.*, que tienen motores a reacción, o helicópteros. Además, los productos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para la generación de energía eléctrica, *p.ej.*, en una planta generadora de vapor convencional o en una planta de celdas de combustible.
- 20 Se describen otros intermedios y productos, incluyendo alimentos y productos farmacéuticos, en la sol. de EE. UU. n° 12/417.900, presentada el 3 de abril de 2009.

MATERIALES QUE CONTIENEN CARBOHIDRATOS (MATERIALES DE BIOMASA)

- 25 Como se usa en la presente memoria, el término "materiales de biomasa" se usa intercambiamente con el término "materiales que contienen carbohidratos", e incluye materiales lignocelulósicos, celulósicos, de almidón y microbianos. Cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria puede practicarse con mezclas de cualquier material de biomasa descrito en la presente memoria.
- 30 Los materiales lignocelulósicos incluyen, pero sin limitación, madera, tablero de partículas, desechos forestales (*p.ej.*, serrín, madera de álamo, astillas de madera), hierbas (*p.ej.*, pasto aguja, Miscanthus, espartina, hierba cinta), residuos de grano (*p.ej.*, cáscaras de arroz, cáscaras de avena, cascarilla de trigo, cáscaras de cebada), desechos agrícolas (*p.ej.*, forraje, paja de colza, paja de trigo, paja de cebada, paja de avena, paja de arroz, yute, cáñamo, linaza, bambú, sisal, abacá, mazorcas de maíz, rastrojo de maíz, rastrojo de soja, fibra de maíz, alfalfa, heno, pelo
- 35 de coco), residuos de procesamiento de azúcar (*p.ej.*, bagazo, pulpa de remolacha, bagazo de agave, algas, algas marinas, estiércol, aguas residuales y mezclas de cualquiera de estos.

En algunos casos, el material lignocelulósico incluye mazorcas de maíz. Las mazorcas de maíz trituradas o molidas con martillos pueden extenderse en una capa de grosor relativamente uniforme para irradiación y, después de la

40 irradiación, son fáciles de dispersar en el medio para procesamiento adicional. Para facilitar la recolección y recogida, en algunos casos se usa la planta de maíz entera, incluyendo el tallo de maíz, granos de maíz y, en algunos casos, incluso el sistema de raíces de la planta.

Ventajosamente, no se requieren nutrientes adicionales (distintos de una fuente de nitrógeno, *p.ej.*, urea o

45 amoníaco) durante la fermentación de las mazorcas de maíz o materiales celulósicos o lignocelulósicos que contienen cantidades significativas de mazorcas de maíz.

Las mazorcas de maíz, antes y después del fraccionamiento, son también más fáciles de transportar y dispersar, y

50 tienen menos tendencia a formar mezclas explosivas con el aire que otros materiales celulósicos o lignocelulósicos tales como heno y hierbas.

Los materiales celulósicos incluyen, por ejemplo, papel, productos de papel, desechos de papel, pulpa de papel, papeles pigmentados, papeles cargados, papeles recubiertos, papeles rellenos, revistas, material impreso (*p.ej.*, libros, catálogos, manuales, etiquetas, calendarios, tarjetas de felicitación, folletos, prospectos, papel prensa), papel

55 de impresora, papel policubierto, cartulina, cartón, cartoncillo, materiales que tienen un alto contenido de α -celulosa tales como algodón, y mezclas de cualquiera de estos. Por ejemplo, productos de papel como se describen en la sol. de EE. UU. n° 13/396.365("Magazine Feedstocks" de Medoff *et al.*, presentada en 14 de febrero de 2012), cuya divulgación completa se incorpora a la presente memoria como referencia.

60 Los materiales celulósicos pueden incluir también materiales lignocelulósicos que se han designificado.

- Los materiales de almidón incluyen almidón mismo, *p.ej.* almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de patata o almidón de arroz, un derivado de almidón o un material que incluya almidón, tal como un producto alimenticio comestible o una cosecha. Por ejemplo, el material de almidón puede ser arracacha, trigo sarraceno, plátano, 5 cebada, tapioca, kudzu, oca, sagú, sorgo, patatas domésticas ordinarias, batata, taro, ñames o una o más judías tales como habas, lentejas o guisantes. Son también materiales de almidón combinaciones de dos cualesquiera o más materiales de almidón. También se pueden usar mezclas de materiales de almidón, celulósicos y lignocelulósicos. Por ejemplo, una biomasa puede ser una planta entera, una parte de una planta o diferentes partes de una planta, *p.ej.*, una planta de trigo, una planta de algodón, una planta de maíz, una planta de arroz o un árbol.
- 10 Los materiales de almidón se pueden tratar mediante cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria.

- Los materiales microbianos incluyen, pero sin limitación, cualquier microorganismo u organismo de origen natural o genéticamente modificado que contiene o es capaz de proporcionar una fuente de carbohidratos (*p.ej.*, celulosa), por 15 ejemplo, protistas, *p.ej.*, protistas animales (p.ej., protozoos tales como flagelados, ameboides, ciliados y esporozoos) y protistas vegetales (p.ej., algas tales como alveolados, clorarcniofitas, criptomónadas, euglenoides, glaucofitas, haptofitas, algas rojas, estramenópilos y plantas verdes). Otros ejemplos incluyen algas marinas, pláncton (p.ej., macropláncton, mesopláncton, micropláncton, nanopláncton, picopláncton y femtopláncton), fitopláncton, bacterias (*p.ej.*, bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas y extremófilas), levadura y/o mezclas 20 de estas. En algunos aspectos, puede obtenerse biomasa microbiana a partir de fuentes naturales, *p.ej.*, el océano, lagos, masas de agua, *p.ej.*, agua salada o agua dulce o en tierra. Como alternativa o además, la biomasa microbiana puede obtenerse a partir de sistemas de cultivo, p.ej. sistemas de cultivo y fermentación húmedos y secos a gran escala.

- 25 En otras realizaciones, los materiales de biomasa, tales como los materiales de cargas de alimentación celulósicas, de almidón y lignocelulósicas, se pueden obtener a partir de microorganismos transgénicos y plantas que han sido modificadas respecto a su variedad de tipo silvestre. Tales modificaciones pueden ser, por ejemplo, a través de etapas iterativas de selección y cultivo para obtener los rasgos deseados en una planta. Además, las plantas pueden haber sufrido la eliminación, modificación, silenciamiento y/o adición de material genético con respecto a la variedad 30 de tipo silvestre. Por ejemplo, se pueden producir plantas modificadas genéticamente mediante procedimientos de ADN recombinante, donde las modificaciones genéticas incluyen la introducción o modificación de genes específicos de las variedades parentales o, por ejemplo, mediante el uso de cultivos transgénicos donde se introduce un gen o genes específicos, procedentes de una especie diferente de planta y/o bacteria, en una planta. Otra forma de crear una variación genética es a través de cultivos mutantes, donde los nuevos alelos se crean artificialmente a partir de 35 genes endógenos. Los genes artificiales se pueden crear mediante una variedad de formas, incluyendo el tratamiento de la planta o las semillas con, por ejemplo, mutágenos químicos (*p.ej.*, usando agentes alquilantes, epóxidos, alcaloides, peróxidos, formaldehído), la irradiación (*p.ej.*, rayos X, rayos gamma, neutrones, partículas beta, partículas alfa, protones, deuterones, radiación UV) y el choque térmico u otras técnicas de estrés externo y posterior selección. Otros procedimientos para proporcionar genes modificados son la PCR propensa a error y la 40 reordenación de ADN seguidas de inserción del ADN modificado deseado en la planta o semilla deseadas. Los procedimientos de introducción de la variación genética deseada en la semilla o planta incluyen, por ejemplo, el uso de un portador bacteriano, la biolística, la precipitación con fosfato de calcio, la electroporación, el corte y empalme de genes, el silenciamiento génico, la lipofección, la microinyección y los portadores víricos. Se han descrito materiales genéticamente modificados adicionales en la sol. de EE. UU. de n.º de serie 13/396.369, presentada el 14 45 de febrero de 2012.

AGENTES SACARIFICANTES

- Las enzimas celulolíticas adecuadas incluyen celulasas de especies de los géneros *Bacillus*, *Coprinus*, 50 *Myceliophthora*, *Cephalosporium*, *Scytalidium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Trichoderma*, especialmente aquellas producidas por una cepa seleccionada de la especie *Aspergillus* (véase *p.ej.*, Pub. EP n.º 0458162), *Humicola insolens* (reclasificada como *Scytalidium thermophilum*, véase *p.ej.*, la pat. de EE. UU. n.º 4.435.307), *Coprinus cinereus*, *Fusarium oxysporum*, *Myceliophthora thermophila*, *Meripilus giganteus*, *Thielavia terrestris*, *Acremonium sp.* (incluyendo, pero sin limitación, *A. persicinum*, *A. 55 acremonium*, *A. brachyphenium*, *A. dichromosporum*, *A. obclavatum*, *A. pinkertoniae*, *A. roseogriseum*, *A. incoloratum* y *A. furatum*). Las cepas preferidas incluyen *Humicola insolens* DSM 1800, *Fusarium oxysporum* DSM 2672, *Myceliophthora thermophila* CBS 117.65, *Cephalosporium sp.* RYM-202, *Acremonium sp.* CBS 478.94, *Acremonium sp.* CBS 265.95, *Acremonium persicinum* CBS 169.65, *Acremonium acremonium* AHU 9519, *Cephalosporium sp.* CBS 535.71, *Acremonium brachyphenium* CBS 866.73, *Acremonium dichromosporum* CBS 60 683.73, *Acremonium obclavatum* CBS 311.74, *Acremonium pinkertoniae* CBS 157.70, *Acremonium roseogriseum* CBS

134.56, *Acremonium incoloratum* CBS 146.62 y *Acremonium furatum* CBS 299.70H. Las enzimas celulolíticas pueden obtenerse también de *Chrysosporium*, preferiblemente una cepa de *Chrysosporium lucknowense*. Las cepas adicionales que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, *Trichoderma* (particularmente *T. viride*, *T. reesei* y *T. koningii*), *Bacillus* alcalófilos (véanse, por ejemplo, la pat. de EE. UU. 3.844.890 y la pub. EP n° 0458162) y *Streptomyces* (véase, p.ej., la Pub. EP n° 0458162).

AGENTES DE FERMENTACIÓN

El microorganismo o microorganismos usados en la fermentación pueden ser microorganismos de origen natural y/o microorganismos genomanipulados. Estos agentes de fermentación pueden usarse, por ejemplo, para convertir un combustible primario en un combustible secundario para usar en la generación de energía en una celda de combustible indirecta. Los agentes de fermentación pueden usarse para convertir azúcares o intermedios no usados en celdas de combustible descritos en los procedimientos de la presente memoria. Los ejemplos de microorganismo pueden ser una bacteria (incluyendo, pero sin limitación, p.ej., una bacteria celulolítica), un hongo (incluyendo, pero sin limitación, p.ej., una levadura), una planta, un protista, p.ej., un protozoo o un protista de tipo fúngico (incluyendo, pero sin limitación, p.ej., un moho mucilaginoso) o un alga. Cuando los organismos son compatibles, se pueden utilizar mezclas de organismos.

Los microorganismos fermentativos adecuados tienen la capacidad de convertir carbohidratos, tales como glucosa, fructosa, xilosa, arabinosa, manosa, galactosa, oligosacáridos o polisacáridos en productos de fermentación. Los microorganismos fermentativos incluyen cepas del género *Sacchromyces spp.* (incluyendo, pero sin limitación, *S. cerevisiae* (levadura del pan), *S. disticus*, *S. uvarum*), el género *Kluyveromyces*, (incluyendo, pero sin limitación, *K. marxianus*, *K. fragilis*), el género *Candida* (incluyendo, pero sin limitación, *C. pseudotropicalis*, y *C. brassicae*), *Pichia stipitis* (un pariente de *Candida shehatae*), el género *Clavispora* (incluyendo, pero sin limitación, *C. lusitaniae* y *C. opuntiae*), el género *Pachysolen* (incluyendo, pero sin limitación, *P. tannophilus*), el género *Bretannomyces* (incluyendo, pero sin limitación, p.ej., *B. clausenii* (Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, en Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C.E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212). Otros microorganismos adecuados incluyen, por ejemplo, *Zymomonas mobilis*, *Clostridium spp.* (incluyendo, pero sin limitación, *Clostridium thermocellum* (Philippidis, 1996, supra), *Clostridium saccharobutylacetonicum*, *Clostridium felsineum*, *Clostridium saccharobutylicum*, *Clostridium puniceum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium aurantibutylicum*), *Moniliella pollinis*, *Yarrowia lipolytica*, *Aureobasidium sp.*, *Trichosporonoides sp.*, *Trigonopsis variabilis*, *Trichosporon sp.*, *Moniliella acetoabutans sp.*, *Typhula variabilis*, *Candida magnoliae*, *Ustilaginomycetes sp.*, *Pseudozyma tsukubaensis*, especies de levadura de los géneros *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Hansenula* y *Pichia* y hongos del género dermatioide *Torula*.

Muchas de tales cepas microbianas están públicamente disponibles, comercialmente o a través de repositorios tales como la ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, EE. UU.), la NRRL (Agricultural Research Service Culture Collection, Peoria, Illinois, EE. UU.) o la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania), por nombrar unos pocos.

Las levaduras comercialmente disponibles incluyen, por ejemplo, Red Star®/Lesaffre Ethanol Red (disponible en Red Star/Lesaffre, EE. UU.), FALI® (disponible en Fleischmann's Yeast, una división de Burns Philip Food Inc., EE. UU.), SUPERSTART® (disponible en Alltech, actualmente Lalemand), GERT STRAND® (disponible en Gert Strand AB, Suecia) y FERMOL® (disponible en DSM Specialties).

Aparte de en los ejemplos de la presente memoria, o a menos que se especifique expresamente otra cosa, todos los intervalos numéricos, cantidades, valores y porcentajes, tales como aquellos para cantidades de materiales, contenidos elementales, tiempos y temperaturas de reacción, relaciones de cantidades y otros, en la siguiente porción de la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, pueden leerse como si se precedieran por la palabra "aproximadamente" aunque el término "aproximadamente" puede no aparecer expresamente con el valor, cantidad o intervalo. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la siguiente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretenda obtener por la presente invención. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debería al menos ser interpretado a la luz del número de dígitos significativos indicados y aplicando técnicas de redondeo ordinarias.

A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros que exponen el alcance amplio de la invención son aproximaciones, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se reseñan lo más precisamente posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene inherentemente errores necesariamente resultantes de la

desviación estándar encontrada en sus medidas de prueba respectivas subyacentes. Además, cuando se exponen intervalos numéricos en la presente memoria, estos intervalos son inclusivos de los puntos terminales de intervalo enumerados (es decir, pueden usarse los puntos terminales). Cuando se usan en la presente memoria porcentajes en peso, los valores numéricos reseñados son respecto al peso total.

5

También debería entenderse que cualquier intervalo numérico enumerado en la presente memoria se pretende que incluya todos los subintervalos integrados en el mismo. Por ejemplo, un intervalo de "1 a 10" pretende incluir todos los subintervalos intermedios (e incluyendo) el valor mínimo enumerado de 1 y el valor máximo enumerado de 10, es decir, tiene un valor mínimo mayor o igual a 1 y un valor máximo menor o igual a 10. Los términos "uno", "un" o "una" como se usan en la presente memoria pretenden incluir "al menos uno" o "uno o más", a menos que se indique otra cosa.

10

Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a realizaciones preferidas de la misma, se entenderá por los especialistas en la materia que pueden realizarse diversos cambios en la forma y detalles de la misma sin apartarse del alcance de la invención englobado por las reivindicaciones adjuntas.

15

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento que comprende:
 - 5 sacarificar enzimáticamente un material celulósico o lignocelulósico formando una solución de azúcar que comprende xilosa y glucosa;

suministrar la solución de azúcar a una celda de combustible microbiana que contiene un agente antical o un agente antiincrustación; y

10 utilizar la solución de azúcar en la celda de combustible microbiana.
 2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde, antes de la sacarificación, se reduce la recalcitrancia del material celulósico o lignocelulósico respecto al material celulósico o lignocelulósico en su estado nativo.
 - 15 3. El procedimiento de la reivindicación 2 donde el procedimiento de reducción de la recalcitrancia del material se selecciona de entre el grupo consistente en tratamiento mecánico, tratamiento químico, sonicación, pirólisis, irradiación, oxidación, explosión de vapor y combinaciones de los mismos.
 - 20 4. El procedimiento de la reivindicación 2, donde el procedimiento de reducción de la recalcitrancia del material comprende la irradiación del material con radiación ionizante.
 5. El procedimiento de la reivindicación 4, donde la radiación ionizante comprende irradiación de haz de electrones.
 - 25 6. El procedimiento de la reivindicación 4 o 5, donde la irradiación comprende irradiación con una dosis de al menos 10 Mrad.
 7. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la biomasa celulósica o lignocelulósica se selecciona de

30 entre el grupo consistente en: papel, productos de papel, desechos de papel, pulpa de papel, papeles pigmentados, papeles cargados, papeles recubiertos, papeles rellenos, revistas, material impreso, papel de impresora, papel policubierto, cartulina, cartón, cartoncillo, desperdicios, algodón, madera, tablero de partículas, desechos forestales, serrín, madera de álamo, astillas de madera, hierbas, pasto aguja, Miscanthus, espartina, hierba cinta, residuos de grano, cáscaras de arroz, cáscaras de avena, cascarilla de trigo, cáscaras de cebada, desechos agrícolas, forraje,

35 paja de colza, paja de trigo, paja de cebada, paja de avena, paja de arroz, yute, cáñamo, linaza, bambú, sisal, abacá, mazorcas de maíz, rastrojo de maíz, rastrojo de soja, fibra de maíz, alfalfa, heno, pelo de coco, residuos de procesamiento de azúcar, bagazo, pulpa de remolacha, bagazo de agave, algas, algas marinas, estiércol, aguas residuales, arracacha, trigo sarraceno, plátano, cebada, yuca, kudzu, oca, sagú, sorgo, patata, batata, taro, ñame, judías, habas, lentejas, guisantes y mezclas de cualquiera de estos.
 - 40 8. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además tratar mecánicamente el material celulósico o lignocelulósico, por ejemplo, para reducir la densidad aparente del material y/o aumentar su área superficial.
 - 45 9. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además utilizar un aditivo en la celda de combustible.
 10. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dicho procedimiento es para producir electricidad.
 - 50 11. El procedimiento de la reivindicación 10, donde el tratamiento del material lignocelulósico se selecciona de entre el grupo que consiste en sonicación, pirólisis, irradiación, oxidación, explosión de vapor y combinaciones de los mismos.
 12. El procedimiento de la reivindicación 10, donde la enzima usada para sacarificar enzimáticamente el

55 material lignocelulósico tratado es una celulasa.
 13. El procedimiento de la reivindicación 10, que comprende además fermentar el material lignocelulósico tratado sacarificado para producir un combustible.
 - 60 14. El procedimiento de la reivindicación 13, donde el combustible es un alcohol.

15. El procedimiento de la reivindicación 13 o 14, donde tratar el material lignocelulósico comprende irradiación del material lignocelulósico con radiación ionizante y donde, opcionalmente, la radiación ionizante comprende irradiación con haz de electrones y/o donde, opcionalmente, la irradiación comprende irradiación del material con una dosis de al menos 10 Mrad.

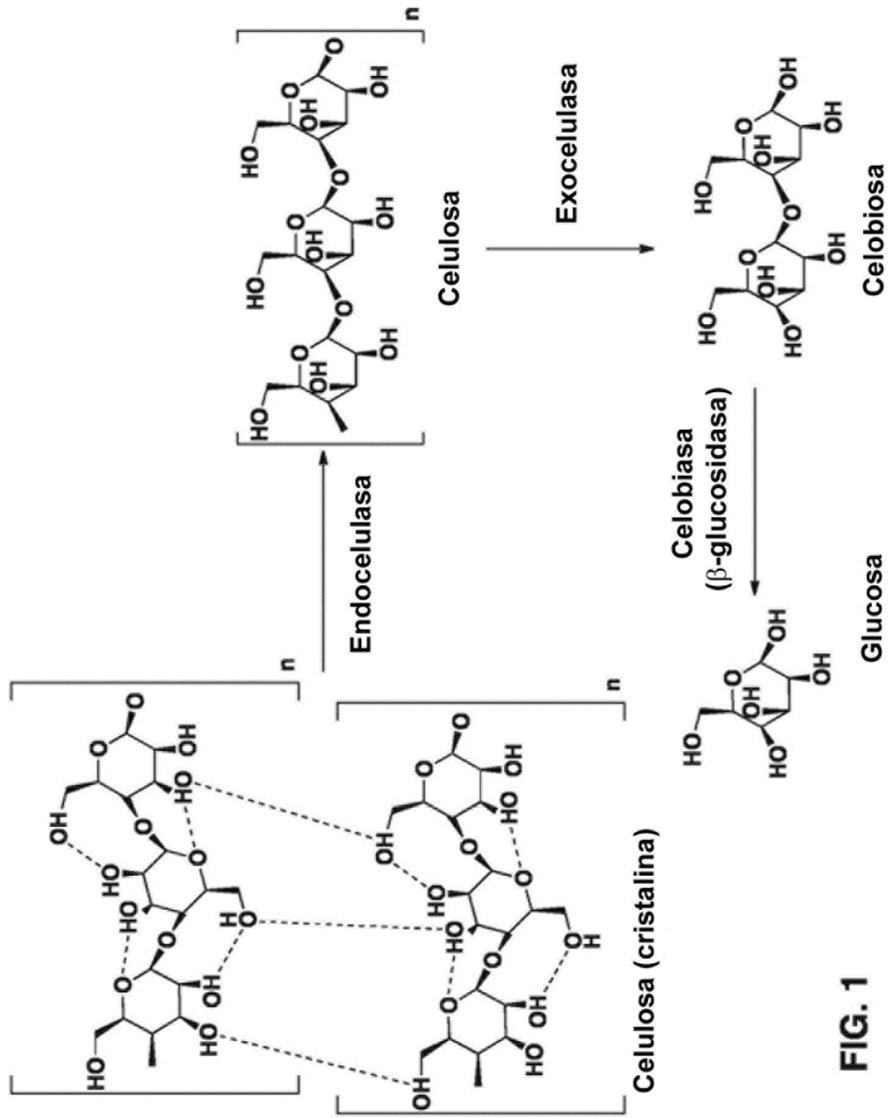


FIG. 1

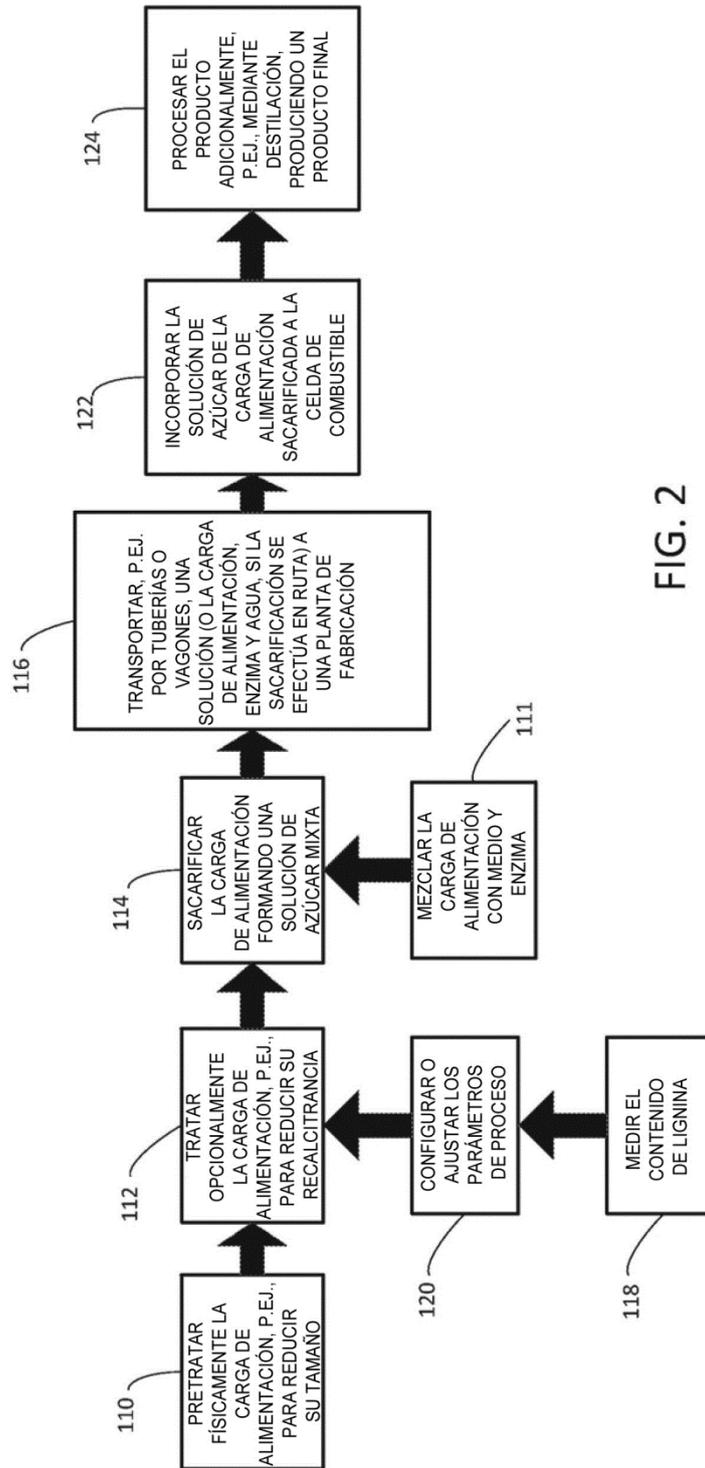


FIG. 2

FIG. 3



FIG. 4

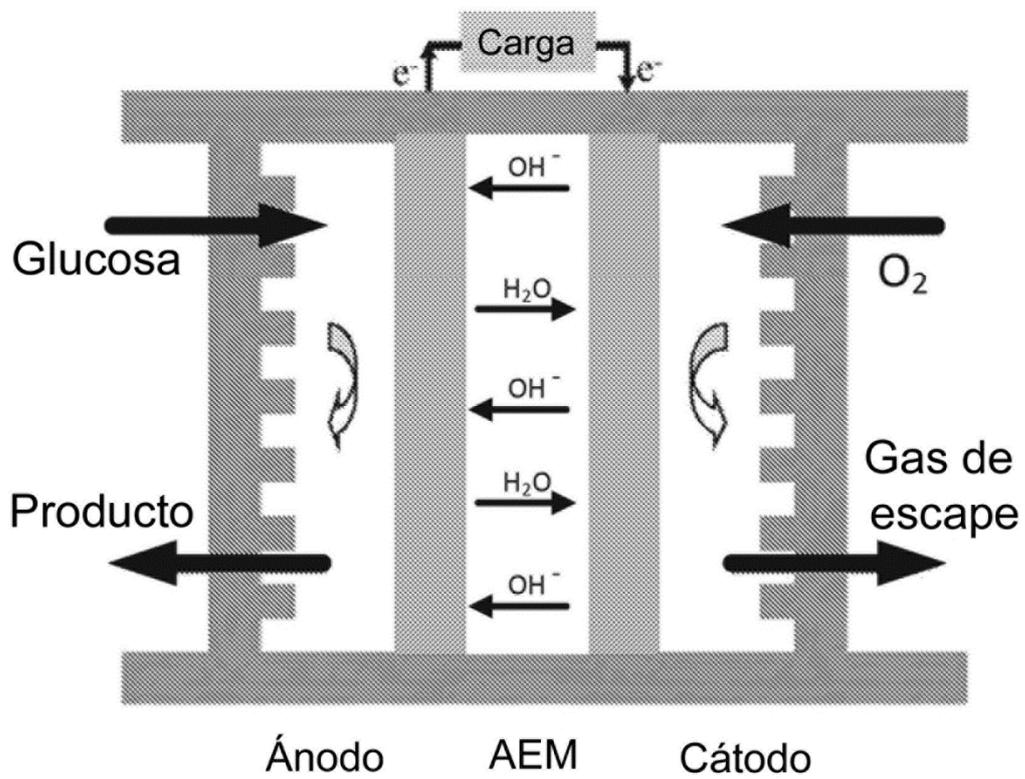


FIG. 5

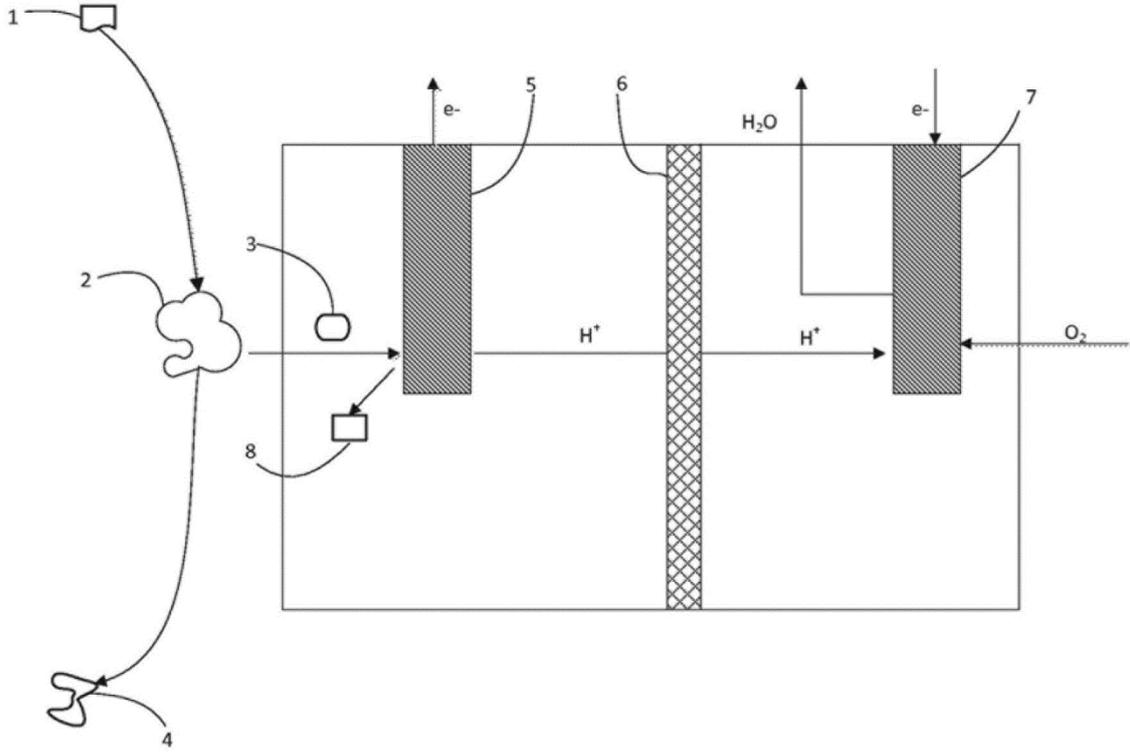


FIG. 6

