

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 631**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/02** (2006.01)

**C12P 19/12** (2006.01)

**C12P 7/10** (2006.01)

**C13K 1/02** (2006.01)

**C12P 19/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2013 PCT/US2013/036497**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2013 WO13155496**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2013 E 13775895 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2836602**

54 Título: **Procedimientos y sistemas para la sacarificación de biomasa**

30 Prioridad:

**13.04.2012 US 201261623907 P**

**13.04.2012 US 201261623881 P**

**20.06.2012 US 201261662339 P**

**27.11.2012 US 201213686477**

**21.12.2012 US 201213724763**

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

**11.03.2019**

73 Titular/es:

**SWEETWATER ENERGY, INC. (100.0%)**

**500 Lee Road**

**Rochester, NY 14606, US**

72 Inventor/es:

**PAREKH, SARAD y**

**FELICE, CARL, P.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 703 631 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**

Procedimientos y sistemas para la sacarificación de biomasa

**5 ANTECEDENTES**

La biomasa es una fuente potencial abundante de combustibles y productos químicos especiales. Puede usarse cualquier clase de biomasa para extraer carbohidratos, proteínas, grasas y otros compuestos valiosos pero, en particular, se usan los polímeros de carbohidrato de biomasa derivados de plantas, algas o microorganismos para producir tales productos. La biomasa incluye generalmente tres elementos estructurales principales: lignina, hemicelulosa y celulosa. Ciertos componentes (p. ej. lignina) pueden reducir la accesibilidad química y física de celulosa y hemicelulosa, lo que a su vez reduce la susceptibilidad de estos polímeros de carbohidrato de conversión química y/o enzimática. Debido a las diferencias en la unión de compuestos en la biomasa y debido a la presencia de la vaina de lignina, puede ser más difícil procesar celulosa y hemicelulosa en la biomasa que procesar almidones en los granos. No obstante, para evitar el uso de cultivos alimentarios, se están promoviendo instalaciones de bioenergía que utilizan las porciones incomedibles para seres humanos de la biomasa.

Muchos de los procedimientos usados para hacer la hemicelulosa y celulosa de la biomasa más accesibles pueden generar compuestos inhibidores que pueden afectar negativamente al procesamiento posterior, tal como sacarificación y/o fermentación. Existe la necesidad de un proceso de pretratamiento que proporcione una fracción de biomasa que sea accesible para hidrólisis enzimática efectiva sin la formación o liberación de grandes volúmenes de inhibidores.

**RESUMEN**

La presente invención proporciona un procedimiento de producción de una composición que comprende sacáridos C5 y C6 a partir de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa, comprendiendo el procedimiento:

(a) pretratar la composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa produciendo una composición de biomasa tratada que comprende partículas sólidas, donde al menos un 50 % de las partículas sólidas son de menos de 1,5 mm en una o más dimensiones de tamaño, y monosacáridos y/o disacáridos C5 con un rendimiento que es al menos un 50 % del máximo teórico, donde el pretratamiento comprende:

(i) hidratación de la composición de biomasa en un medio acuoso de pH no neutro que comprende uno o más ácidos produciendo una composición de biomasa hidratada,  
 (ii) reducción mecánica del tamaño de la composición de biomasa hidratada produciendo partículas sólidas, y  
 (iii) calentamiento de la composición de biomasa hidratada durante un tiempo suficiente para producir la composición de biomasa pretratada que comprende monosacáridos y/o disacáridos C5 con un rendimiento que es al menos un 50 % del máximo teórico; e

(b) hidrolizar la composición de biomasa pretratada con una o más enzimas durante un tiempo suficiente para producir la composición que comprende los sacáridos C5 y C6.

La presente invención proporciona también un procedimiento de producción de uno o más alcoholes a partir de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa, comprendiendo el procedimiento:

(a) pretratar la composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa produciendo una composición de biomasa pretratada que comprende partículas sólidas, donde al menos un 50 % de las partículas sólidas son de menos de 1,5 mm en una o más dimensiones de tamaño, y una primera población de polímeros de sacárido, donde el pretratamiento comprende:

(i) hidratar la composición de biomasa en un medio acuoso produciendo una composición de biomasa hidratada,  
 (ii) reducir la composición de biomasa hidratada por reducción mecánica del tamaño produciendo partículas sólidas, y  
 (iii) calentar la composición de biomasa hidratada durante un tiempo suficiente para producir la composición de biomasa pretratada que comprende partículas sólidas, donde al menos un 50 % de las partículas sólidas son de menos de 1,5 mm en una o más dimensiones de tamaño, y la primera población de polímeros de sacáridos; e

(b) hidrolizar y fermentar la composición de biomasa pretratada con uno o más microorganismos durante un tiempo

suficiente para producir el uno o más alcoholes.

En algunas realizaciones, la una o más dimensiones de tamaño son longitud, anchura, altura o diámetro. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas en la composición de biomasa tratada son de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas en la composición de biomasa pretratada son de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas en la composición de biomasa pretratada son de menos de 1,5 mm, menos de 1 mm o menos de 0,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas en la composición de biomasa pretratada son de menos de 1,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño.

En algunas realizaciones, las partículas sólidas en la composición de biomasa pretratada comprenden una mezcla de partículas sólidas donde las partículas sólidas son uniformes en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, las partículas sólidas son uniformes en la una o más dimensiones de tamaño, donde aproximadamente un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % de las partículas sólidas son de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1,5 mm, de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1 mm, o de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 1 mm en la una o más dimensiones de tamaño.

En algunas realizaciones, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende adicionalmente uno o más inhibidores de la fermentación. En algunas realizaciones, los inhibidores de la fermentación comprenden furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) y/o uno o más ácidos orgánicos. En algunas realizaciones, el uno o más ácidos orgánicos comprenden ácido acético. En algunas realizaciones, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende menos de aproximadamente: 5 %, 2,5 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,005 % o 0,001 % p/v del uno o más inhibidores de la fermentación. En algunas realizaciones, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende menos de aproximadamente: 5 %, 2,5 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,005 % o 0,001 % p/v del uno o más ácidos orgánicos. En algunas realizaciones, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende menos de aproximadamente: 5 %, 2,5 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,005 % o 0,001 % p/v de ácido acético. En algunas realizaciones, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende menos de aproximadamente: 0,01 %, 0,005 %, 0,004 %, 0,003 %, 0,002 %, 0,001 %, 0,0005 %, 0,0001 %, 0,00005 % o 0,00001 % de hidroximetilfurfural. En algunas realizaciones, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende menos de aproximadamente: 0,01 %, 0,005 %, 0,004 %, 0,003 %, 0,002 %, 0,001 %, 0,0005 %, 0,0001 %, 0,00005 % o 0,00001 % de furfural. En algunas realizaciones, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende un nivel indetectable de furfural. En algunas realizaciones, la retirada de los inhibidores de la fermentación no aumenta significativamente el rendimiento de un proceso de fermentación posterior. En algunas realizaciones, las partículas sólidas en la composición de biomasa pretratada tienen una mayor relación de superficie a volumen que los sólidos en la composición de biomasa.

En algunas realizaciones, el rendimiento de monosacáridos y/o disacáridos C5 es de al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o al menos un 85 % del máximo teórico. En algunas realizaciones, los monosacáridos y/o disacáridos C5 en la composición de biomasa pretratada son monosacáridos. En algunas realizaciones, la composición de biomasa pretratada comprende además un rendimiento de glucosa que es de menos de aproximadamente 20 %, menos de aproximadamente 15 %, menos de aproximadamente 10 % o menos de aproximadamente 5 % del rendimiento de glucosa máximo teórico.

En algunas realizaciones, la composición de biomasa hidratada comprende de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % de sólidos, o aproximadamente 5 % de sólidos por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, el medio acuoso de pH no neutro está a una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 70 °C, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C o a aproximadamente 50 °C. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante la hidratación de la composición de biomasa en el medio acuoso no neutro a una mayor temperatura. En algunas realizaciones, la

hidratación de la composición de biomasa es durante un tiempo de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 60 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos o de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 20 minutos. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante la hidratación de la composición de biomasa durante un tiempo mayor. En algunas realizaciones, el calentamiento de la composición de biomasa es a una temperatura de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 250 °C, de aproximadamente 150 °C a aproximadamente 200 °C o de aproximadamente 160 °C a aproximadamente 180 °C. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante el calentamiento de la composición de biomasa hidratada a una mayor temperatura. En algunas realizaciones, el calentamiento de la composición de biomasa hidratada se efectúa a una presión mayor que la atmosférica. En algunas realizaciones, la presión es de aproximadamente 25 psig a aproximadamente 250 psig, de aproximadamente 75 psig a aproximadamente 200 psig o de aproximadamente 100 psig a aproximadamente 150 psig. Una psig es igual a 6894,75728 newton por metro cuadrado. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante el calentamiento de la composición de biomasa hidratada a una mayor presión. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante el calentamiento de una segunda composición de biomasa hidratada que comprende partículas mayores. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante el calentamiento de una segunda composición de biomasa hidratada que comprende partículas con un intervalo mayor de tamaños. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para producir el rendimiento de monosacáridos y/o disacáridos C5 es de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 60 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos o de aproximadamente 7,5 minutos a aproximadamente 12,5 minutos.

En algunas realizaciones, pretratar la composición de biomasa comprende adicionalmente deshidratar la composición de biomasa hidratada a aproximadamente 10 % a aproximadamente 40 % de sólidos, o a aproximadamente 30 % de sólidos por peso de biomasa seca antes del calentamiento. En algunas realizaciones, pretratar comprende adicionalmente explosión de vapor, explosión de vapor catalizada por ácido, explosión de fibra con amoníaco/congelación (AFEX) o una combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, el pretratamiento se efectúa en una única operación unitaria. En algunas realizaciones, la única operación unitaria comprende una o más de una unidad de hidratación, uno o más cortadores giratorios, una o más bombas, una unidad de deshidratación, una unidad de inyección de vapor, una unidad de calentamiento, una unidad de explosión de vapor o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la unidad de hidratación es un mezclador de vórtice equipado con uno o más cortadores giratorios. En algunas realizaciones, los uno o más cortadores giratorios están equipados con una pluralidad de cuchillas de corte y una pluralidad de perforaciones de inyección de vapor.

En algunas realizaciones, el pretratamiento se efectúa en un modo de operación continuo. En algunas realizaciones, el modo de operación continuo comprende alimentar la composición de biomasa a una unidad de hidratación. En algunas realizaciones, la unidad de hidratación es un mezclador de vórtice.

En algunas realizaciones, el pretratamiento se efectúa en un tiempo total de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 3 horas, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 90 minutos o de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 45 minutos. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante el pretratamiento durante un tiempo total mayor.

En algunas realizaciones, la una o más enzimas comprenden una o más hemicelulasas y/o una o más celulasas. En algunas realizaciones, la una o más enzimas no comprenden ninguna hemicelulasa. En algunas realizaciones, la una o más enzimas es un complejo de celulasa y hemicelulasa. En algunas realizaciones, el complejo de celulasa y hemicelulasa no está suplementado con enzimas hemicelulasas adicionales. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % p/p, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % p/p o de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % p/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de menos de 15 % p/p, menos de 10 % p/p, o menos de 5 % p/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para producir la composición que comprende sacáridos C6 y C5 es de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 100 horas o de aproximadamente 21 horas a aproximadamente 50 horas.

En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden adicionalmente ajustar el contenido de agua y/o el pH de la composición de biomasa pretratada antes de hidrolizar. En algunas realizaciones, el contenido de agua de la composición de biomasa pretratada se ajusta a aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 % de sólidos, o de aproximadamente 5 % a aproximadamente 20 % de sólidos por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, el pH de la composición de biomasa pretratada se ajusta a aproximadamente 4 a aproximadamente 7, o a

aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,5. En algunas realizaciones, la hidrolización se realiza a una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 70 °C, o de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 60 °C.

- 5 En algunas realizaciones, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende glucosa, xilosa, manosa, galactosa, ramnosa, arabinosa o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la composición que comprende sacáridos C5 y C6 es una composición acuosa. En algunas realizaciones, la composición que comprende sacáridos C5 y C6 comprende un rendimiento de glucosa con un rendimiento que es un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % del rendimiento máximo teórico de glucosa. En algunas realizaciones, la composición que comprende sacáridos C5 y C6 comprende un rendimiento de xilosa con un rendimiento que es un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % del rendimiento máximo teórico de xilosa. En algunas realizaciones, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende glucosa con un rendimiento que es mayor de 55 %, mayor de 60 %, mayor de 70 %, mayor de 80 % o mayor de 90 % del rendimiento máximo teórico de glucosa a las 21 horas de hidrólisis. En algunas realizaciones, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende glucosa con un rendimiento que es mayor de 70 %, mayor de 80 %, mayor de 90 % o mayor de 95 % del rendimiento máximo teórico de glucosa a las 48 horas de hidrólisis. En algunas realizaciones, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende xilosa con un rendimiento que es mayor de 60 %, mayor de 70 %, mayor de 80 % o mayor de 90 % del rendimiento máximo teórico de xilosa a las 21 horas de hidrólisis.

En algunas realizaciones, el máximo teórico está basado en una masa de un monosacárido dado suponiendo un 100 % de conversión de los oligosacáridos que comprenden el monosacárido dado en la composición de biomasa. En algunas realizaciones, el máximo teórico es la masa de un monosacárido dado medida después de hidrólisis de la composición de biomasa con ácido sulfúrico al 72 %.

En algunas realizaciones, la composición de biomasa comprende alfalfa, algas, bagazo, bambú, rastrojo de maíz, mazorcas de maíz, granos de maíz, pasta de maíz, líquido de maceración del maíz, sólidos de maceración del maíz, granos de destilería, productos solubles de destilería secados, granos de destilería secados, productos solubles de destilería condensados, granos de destilería húmedos, granos de destilería secados con productos solubles, eucalipto, desechos alimentarios, peladuras de fruta, residuos de jardinería, hierba, cáscaras de grano, plantas de cultivo modificadas, desechos municipales, cáscaras de avena, papel, pulpa de papel, hierba de tallo azul, álamo, cáscaras de arroz, cáscaras de semilla, forraje, sorgo, paja, caña de azúcar, pasto aguja, trigo, paja de trigo, salvado de trigo, salvado de trigo desalmidonado, sauces, madera, células vegetales, cultivos de tejido vegetal, cultivos de tejido o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, los procedimientos son para producción a escala industrial. En algunas realizaciones, la producción a escala industrial comprende el pretratamiento de más de 1 tonelada métrica (Tm), más de 20 Tm, más de 50 Tm o más de 100 Tm en 24 horas.

En algunas realizaciones, la reducción mecánica del tamaño comprende corte, inyección de vapor, explosión de vapor, explosión de vapor catalizada por ácido, explosión de fibra con amoníaco/congelación (AFEX) o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la reducción mecánica del tamaño no comprende molienda, molienda con martillos, molienda coloidal, molienda con perlas, homogeneización o ruptura a alta presión.

En algunas realizaciones, el medio acuoso no neutro comprende un ácido o una base a aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 5 % v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, el medio acuoso de pH no neutro comprende un ácido que es ácido sulfúrico, ácido peroxiacético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido sulfuroso, ácido cloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido oxálico, ácido benzoico o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, se producen menos inhibidores de la fermentación que cuando se usa una mayor cantidad de ácido o base.

Se divulgan también en la presente memoria procedimientos para producir una composición que comprende sacáridos a partir de una biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa, comprendiendo los procedimientos: (a) procesar la composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa produciendo una composición de biomasa pretratada que tiene partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm en una o más de las dimensiones de tamaño y al menos un 80 % de rendimiento de monómeros y/o dímeros C5, donde el procesamiento comprende: (i) hidratar y cortar la composición de biomasa alimentando la composición de biomasa a un mezclador de vórtice que comprende a una tasa que mantiene un nivel de sólidos de

aproximadamente 5 % p/p por peso de biomasa seca, donde el mezclador de vórtice comprende: (1) un medio acuoso que contiene un ácido a un nivel que es de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 % p/p por peso de biomasa seca, donde el medio acuoso está a aproximadamente 50 °C, (2) uno o más cortadores giratorios, donde los cortadores giratorios generan un vórtice en el medio acuoso que mezcla la composición de biomasa y el medio acuoso y arrastra la composición de biomasa a las cuchillas produciendo una primera composición de biomasa de corte, (ii) deshidratar la primera composición de biomasa de corte produciendo un tapón de sólidos que comprende aproximadamente un 30 % p/p de sólidos por peso de biomasa seca, (iii) calentar y cortar de forma fina simultáneamente el tapón de sólidos alimentando el tapón de sólidos a un cortador giratorio que comprende: (1) una pluralidad de cuchillas, donde la pluralidad de cuchillas corta finamente el tapón de biomasa produciendo una segunda composición de biomasa de corte que comprende partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm en una o más dimensiones de tamaño, y (2) una pluralidad de microperforaciones, donde se inyecta vapor a la segunda composición de biomasa de corte a través de la pluralidad de microperforaciones para mantener una temperatura de aproximadamente 160 a 180 °C y una presión de aproximadamente 135 psig, (iv) calentar la segunda composición de biomasa de corte durante un tiempo suficiente para producir al menos un 80 % de rendimiento de sacáridos C5 monoméricos y diméricos y (v) someter el tapón de sólidos a explosión de vapor produciendo la primera composición de biomasa pretratada que tiene partículas sólidas que son menores de 1,5 mm en una o más dimensiones de tamaño; (b) separar opcionalmente los sacáridos C5 solubles de los sólidos; (c) añadir agua a los sólidos hasta aproximadamente 5 % a aproximadamente 25 % en sólidos por peso seco; (d) añadir enzimas en una cantidad de 0,5 kg por kg de biomasa hasta aproximadamente 20 kg por kg de biomasa y (e) hidrolizar la biomasa durante un tiempo suficiente para producir la composición que comprende sacáridos C5 y C6.

Se proporcionan también en la presente memoria composiciones que comprenden sacáridos C5 y C6 producidos mediante los procedimientos divulgados en la presente memoria.

En otro aspecto, se proporcionan en la presente memoria procedimientos de producción de uno o más productos finales de fermentación a partir de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa, comprendiendo los procedimientos: (a) pretratar la composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa produciendo una composición de biomasa pretratada que comprende partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm en una o más dimensiones de tamaño y una primera población de polímeros de sacárido, donde el pretratamiento comprende: (i) hidratar la composición de biomasa en un medio acuoso produciendo una composición de biomasa hidratada, (ii) reducir la composición de biomasa hidratada por reducción mecánica del tamaño produciendo partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño, y (iii) calentar la composición de biomasa hidratada durante un tiempo suficiente para producir la composición de biomasa pretratada que comprende partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño y la primera población de polímeros de sacárido; y (b) hidrolizar y fermentar la composición de biomasa pretratada con uno o más microorganismos durante un tiempo suficiente para producir el uno o más productos finales de fermentación. En algunas realizaciones, la primera población de polímeros de sacárido es soluble.

En algunas realizaciones, hidrolizar y fermentar comprenden adicionalmente tratar con una o más enzimas. En algunas realizaciones, la una o más enzimas comprenden una o más hemicelulasas y/o una o más celulasas o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % p/p por peso de biomasa seca.

En algunas realizaciones, la una o más dimensiones de tamaño son longitud, anchura, altura o diámetro. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas en la composición de biomasa pretratada son de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas en la composición de biomasa pretratada son de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas en la composición de biomasa pretratada son de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 1 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas en la composición de biomasa pretratada son de menos de 1,5 mm, menos de 1 mm, o menos de 0,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas en la composición de biomasa pretratada son de menos de 1,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, las partículas sólidas en la composición de biomasa pretratada comprenden una mezcla de partículas sólidas, donde las partículas sólidas son uniformes en la una o

más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, las partículas sólidas son uniformes en la una o más dimensiones de tamaño, donde aproximadamente un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % de las partículas sólidas son de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1,5 mm, de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1 mm o de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 1 mm en la una o más dimensiones de tamaño.

En algunas realizaciones, la composición que comprende la primera población de polímeros de sacárido comprende adicionalmente uno o más inhibidores de la fermentación. En algunas realizaciones, los inhibidores de la fermentación comprenden furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) y/o uno o más ácidos orgánicos. En algunas realizaciones, el uno o más ácidos orgánicos comprenden ácido acético. En algunas realizaciones, la composición que comprende la primera población de polímeros de sacárido comprende menos de aproximadamente: 5 %, 2,5 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,005 % o 0,001 % p/v del uno o más inhibidores de la fermentación. En algunas realizaciones, la composición que comprende la primera población de polímeros de sacárido comprende menos de aproximadamente: 5 %, 2,5 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,005 % o 0,001 % p/v del uno o más ácidos orgánicos. En algunas realizaciones, la composición que comprende la primera población de polímeros de sacárido comprende menos de aproximadamente: 5 %, 2,5 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,005 % o 0,001 % p/v de ácido acético. En algunas realizaciones, la composición que comprende la primera población de polímeros de sacárido comprende menos de aproximadamente: 0,01 %, 0,005 %, 0,004 %, 0,003 %, 0,002 %, 0,001 %, 0,0005 %, 0,0001 %, 0,00005 % o 0,00001 % de hidroximetilfurfural. En algunas realizaciones, la composición que comprende la primera población de polímeros de sacárido comprende menos de aproximadamente: 0,01 %, 0,005 %, 0,004 %, 0,003 %, 0,002 %, 0,001 %, 0,0005 %, 0,0001 %, 0,00005 % o 0,00001 % de furfural. En algunas realizaciones, la composición que comprende la primera población de polímeros de sacárido comprende un nivel indetectable de furfural. En algunas realizaciones, la retirada del uno o más inhibidores de la fermentación no aumenta significativamente el rendimiento del uno o más productos finales de fermentación.

En algunas realizaciones, las partículas sólidas en la composición de biomasa pretratada tienen una mayor relación de superficie a volumen que los sólidos en la composición de biomasa.

En algunas realizaciones, la primera población de polímeros de sacárido en la composición de biomasa pretratada comprende oligosacáridos.

En algunas realizaciones, la composición de biomasa hidratada comprende de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % de sólidos, o aproximadamente 5 % de sólidos por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, el medio acuoso está a una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 70 °C, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C, o a aproximadamente 50 °C. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante la hidratación de la composición de biomasa en el medio acuoso a mayor temperatura. En algunas realizaciones, la hidratación de la composición de biomasa es durante un tiempo de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 60 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 20 minutos. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante la hidratación de la composición de biomasa durante más tiempo. En algunas realizaciones, el calentamiento de la biomasa hidratada es a una temperatura de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 250 °C, de aproximadamente 150 °C a aproximadamente 200 °C, o de aproximadamente 160 °C a aproximadamente 180 °C. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante el calentamiento de la composición de biomasa hidratada a una mayor temperatura. En algunas realizaciones, se efectúa el calentamiento de la composición de biomasa hidratada a una presión mayor que la atmosférica. En algunas realizaciones, la presión es de aproximadamente 25 psig a aproximadamente 250 psig, de aproximadamente 75 psig a aproximadamente 200 psig o de aproximadamente 100 psig a aproximadamente 150 psig. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante el calentamiento de la composición de biomasa hidratada a una mayor presión. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante el calentamiento de una segunda composición de biomasa hidratada que comprende partículas mayores. En algunas realizaciones, se producen menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante el calentamiento de una segunda composición de biomasa hidratada que comprende partículas con un mayor intervalo de tamaños. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para producir la primera población de polímeros de sacárido es de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 60 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos o de aproximadamente 7,5 minutos a aproximadamente 12,5 minutos. En algunas realizaciones, pretratar la composición de biomasa comprende adicionalmente deshidratar la composición de

biomasa hidratada de aproximadamente 10 % a aproximadamente 40 % de sólidos, o a aproximadamente 30 % de sólidos por peso de biomasa seca antes del calentamiento.

5 En algunas realizaciones, el pretratamiento comprende adicionalmente explosión de vapor, explosión de vapor catalizada por ácido, explosión de fibra con amoníaco/congelación (AFEX) o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el pretratamiento se efectúa en un modo de operación continuo.

10 En algunas realizaciones, el pretratamiento se efectúa en un tiempo total de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 3 horas, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 90 minutos o de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 45 minutos. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante el pretratamiento durante un tiempo total mayor.

15 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente ajustar el contenido de agua de la composición de biomasa pretratada de aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 % de sólidos, o de aproximadamente 5 % a aproximadamente 20 % de sólidos por peso de biomasa seca antes de hidrolizar y fermentar.

20 En algunas realizaciones, la primera población de polímeros de sacárido comprende disacáridos, trisacáridos, tetrasacáridos, pentasacáridos, hexasacáridos, heptasacáridos, octasacáridos, nonasacáridos, decasacáridos o una combinación de los mismos.

25 En algunas realizaciones, la composición de biomasa comprende alfalfa, algas, bagazo, bambú, rastrojo de maíz, mazorcas de maíz, granos de maíz, pasta de maíz, líquido de maceración del maíz, sólidos de maceración del maíz, granos de destilería, productos solubles de destilería secados, granos de destilería secados, productos solubles de destilería condensados, granos de destilería húmedos, granos de destilería secados con productos solubles, eucalipto, desechos alimentarios, peladuras de fruta, residuos de jardinería, hierba, cáscaras de grano, plantas de cultivo modificadas, desechos municipales, cáscaras de avena, papel, pulpa de papel, hierba de tallo azul, álamo, cáscaras de arroz, cáscaras de semilla, forraje, sorgo, paja, caña de azúcar, pasto aguja, trigo, paja de trigo, salvado de trigo, salvado de trigo desalmidonado, salsas, madera, células vegetales, cultivos de tejido vegetal, cultivos de  
30 tejido o una combinación de los mismos.

35 En algunas realizaciones, la reducción mecánica de tamaño no comprende molienda. En algunas realizaciones, la reducción mecánica del tamaño comprende corte, inyección de vapor, explosión de vapor, explosión de vapor catalizada por ácido, explosión de fibra con amoníaco/congelación (AFEX) o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la reducción mecánica de tamaño comprende cortar con un primer cortador giratorio y/o un segundo cortador giratorio.

40 En algunas realizaciones, pretratar la composición de biomasa comprende adicionalmente hidrolizar la composición de biomasa hidratada con una o más enzimas. En algunas realizaciones, la una o más enzimas comprenden una o más endocelulasas, una o más exocelulasas, una o más endohemicelulasas, una o más exohemicelulasas o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están presentes a un nivel total de aproximadamente 0,1 % p/p a aproximadamente 20 % p/p por peso de biomasa seca.

45 En algunas realizaciones, pretratar la composición de biomasa comprende adicionalmente hidrolizar las partículas sólidas con un ácido produciendo una segunda población de polímeros de sacárido. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente separar las partículas sólidas de la composición de biomasa pretratada de la primera población de polímeros de sacárido antes de hidrolizar y fermentar. En algunas realizaciones, se hidrolizan las partículas sólidas con un ácido produciendo una segunda población de polímeros de sacárido.

50 En algunas realizaciones, la primera población polímeros de sacárido comprende residuos de glucosa, residuos de xilosa, residuos de manosa, residuos de galactosa, residuos de ramnosa, residuos de arabinosa o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la segunda población de polímeros de sacárido comprende residuos de glucosa. En algunas realizaciones, la segunda población de polímeros de sacárido comprende oligosacáridos. En algunas realizaciones, la segunda población de polímeros de sacárido es soluble.

55 En algunas realizaciones, la composición que comprende la segunda población de polímeros de sacárido comprende adicionalmente uno o más inhibidores de la fermentación. En algunas realizaciones, los inhibidores de la fermentación comprenden furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) y/o uno o más ácidos orgánicos. En algunas realizaciones, el uno o más ácidos orgánicos comprenden ácido acético. En algunas realizaciones, la composición  
60 que comprende la segunda población de polímeros de sacárido comprende menos de aproximadamente: 5 %,

2,5 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,005 % o 0,001 % p/v del uno o más inhibidores de la fermentación. En algunas realizaciones, la composición que comprende la segunda población de polímeros de sacárido comprende menos de aproximadamente: 5 %, 2,5 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,005 % o 0,001 % p/v del uno o más ácidos orgánicos. En algunas realizaciones, la composición que comprende la segunda población de polímeros de sacárido comprende menos de aproximadamente: 5 %, 2,5 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,005 % o 0,001 % p/v de ácido acético. En algunas realizaciones, la composición que comprende la segunda población de polímeros de sacárido comprende menos de aproximadamente: 0,01 %, 0,005 %, 0,004 %, 0,003 %, 0,002 %, 0,001 %, 0,0005 %, 0,0001 %, 0,00005 % o 0,00001 % de hidroximetilfurfural. En algunas realizaciones, la composición que comprende la segunda población de polímeros de sacárido comprende menos de aproximadamente: 0,01 %, 0,005 %, 0,004 %, 0,003 %, 0,002 %, 0,001 %, 0,0005 %, 0,0001 %, 0,00005 % o 0,00001 % de furfural. En algunas realizaciones, la composición que comprende la segunda población de polímeros de sacárido comprende un nivel indetectable de furfural. En algunas realizaciones, la retirada de uno o más inhibidores de la fermentación no aumenta significativamente el rendimiento del uno o más productos finales de fermentación.

En otro aspecto, se divulgan en la presente memoria procedimientos de producción de uno o más productos finales de fermentación a partir de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa, comprendiendo el procedimiento: (a) hidratar la composición de biomasa en un medio acuoso; (b) reducir la composición de biomasa mediante una primera reducción mecánica del tamaño; (c) deshidratar la composición de biomasa; (d) reducir la composición de biomasa mediante una segunda reducción mecánica del tamaño produciendo partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm en una o más dimensiones de tamaño; (e) hidratar la composición de biomasa en un medio acuoso no neutro; (f) hidrolizar la composición de biomasa calentando la composición de biomasa durante un tiempo suficiente para producir polímeros de sacárido; (g) hidrolizar los polímeros de sacárido con uno o más microorganismos y, opcionalmente, una o más enzimas, produciendo monosacáridos y/o disacáridos; y (h) fermentar los monosacáridos y/o disacáridos con uno o más microorganismos, produciendo el uno o más productos finales de fermentación.

En algunas realizaciones, el medio acuoso no neutro tiene un pH de entre 2,5 y 7. En algunas realizaciones, el medio acuoso no neutro comprende un ácido de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 % v/p por peso de biomasa seca.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente hidrolizar la composición de biomasa con una o más enzimas. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % p/p por peso de biomasa seca.

En algunas realizaciones, la una o más dimensiones de tamaño son longitud, anchura, altura o diámetro. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas son de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas son de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas son de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 1 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas son de menos de 1,5 mm, de menos de 1 mm o de menos de 0,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas son de menos de 1,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño.

En algunas realizaciones, las partículas sólidas comprenden una mezcla de partículas sólidas donde las partículas sólidas son uniformes en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, las partículas sólidas son uniformes en la una o más dimensiones de tamaño, donde aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % de las partículas sólidas son de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1,5 mm, de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1 mm, o de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 1 mm en la una o más dimensiones de tamaño.

En algunas realizaciones, la composición que comprende la primera población de polímeros de sacárido comprende adicionalmente uno o más inhibidores de la fermentación. En algunas realizaciones, los inhibidores de la

fermentación comprenden furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) y/o uno o más ácidos orgánicos. En algunas realizaciones, el uno o más ácidos orgánicos comprenden ácido acético. En algunas realizaciones, la composición que comprende los polímeros de sacárido comprende menos de aproximadamente: 5 %, 2,5 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,005 % o 0,001 % p/v del uno o más inhibidores de la fermentación. En algunas realizaciones, la composición que comprende los polímeros de sacárido comprende menos de aproximadamente: 5 %, 2,5 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,005 % o 0,001 % p/v del uno o más ácidos orgánicos. En algunas realizaciones, la composición que comprende los polímeros de sacárido comprende menos de aproximadamente: 5 %, 2,5 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,005 % o 0,001 % p/v de ácido acético. En algunas realizaciones, la composición que comprende los polímeros de sacárido comprende menos de aproximadamente: 0,01 %, 0,005 %, 0,004 %, 0,003 %, 0,002 %, 0,001 %, 0,0005 %, 0,0001 %, 0,00005 % o 0,00001 % de hidroximetilfurfural. En algunas realizaciones, la composición que comprende los polímeros de sacárido comprende menos de aproximadamente: 0,01 %, 0,005 %, 0,004 %, 0,003 %, 0,002 %, 0,001 %, 0,0005 %, 0,0001 %, 0,00005 % o 0,00001 % de furfural. En algunas realizaciones, la composición que comprende los polímeros de sacárido comprende un nivel indetectable de furfural. En algunas realizaciones, la retirada del uno o más inhibidores de la fermentación no aumenta significativamente el rendimiento del uno o más productos finales de fermentación.

En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido en la composición de biomasa pretratada comprenden oligosacáridos. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido se producen con un rendimiento que es al menos aproximadamente un 80 % del máximo teórico.

En algunas realizaciones, la composición de biomasa hidratada de (a) comprende de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % de sólidos, o aproximadamente 5 % de sólidos por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, el medio acuoso está a una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 70 °C, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C o a aproximadamente 50 °C. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante la hidratación de la composición de biomasa en el medio acuoso a una mayor temperatura. En algunas realizaciones, la hidratación de la composición de biomasa es durante un tiempo de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 60 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 20 minutos. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante la hidratación de la composición de biomasa durante más tiempo. En algunas realizaciones, el calentamiento de la composición de biomasa es a una temperatura de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 250 °C, de aproximadamente 150 °C a aproximadamente 200 °C o de aproximadamente 160 °C a aproximadamente 180 °C. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante el calentamiento de la composición de biomasa a una temperatura mayor. En algunas realizaciones, se efectúa el calentamiento de la composición de biomasa a una presión mayor que la atmosférica. En algunas realizaciones, la presión es de aproximadamente 25 psig a aproximadamente 250 psig, de aproximadamente 75 psig a aproximadamente 200 psig o de aproximadamente 100 psig a aproximadamente 150 psig. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante el calentamiento de la composición de biomasa a una mayor presión. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante el calentamiento de una segunda composición de biomasa que comprende partículas mayores. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante el calentamiento de una segunda composición de biomasa que comprende partículas con un mayor intervalo de tamaños. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para producir los polímeros de sacárido es de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 60 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos o de aproximadamente 7,5 minutos a aproximadamente 12,5 minutos.

En algunas realizaciones, la deshidratación de la composición de biomasa es de aproximadamente 10 % a aproximadamente 40 % de sólidos, o aproximadamente 30 % de sólidos por peso de biomasa seca antes del calentamiento. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente explosión de vapor, explosión de vapor catalizada por ácido, explosión de fibra con amoníaco/congelación (AFEX) o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido comprenden disacáridos, trisacáridos, tetrasacáridos, pentasacáridos, hexasacáridos, heptasacáridos, octasacáridos, nonasacáridos, decasacáridos o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la composición de biomasa comprende alfalfa, algas, bagazo, bambú, rastrojo de maíz, mazorcas de maíz, granos de maíz, pasta de maíz, líquido de maceración del maíz, sólidos de maceración del maíz,

granos de destilería, productos solubles de destilería secados, granos de destilería secados, productos solubles de destilería condensados, granos de destilería húmedos, granos de destilería secados con productos solubles, eucalipto, desechos alimentarios, peladuras de fruta, residuos de jardinería, hierba, cáscaras de grano, plantas de cultivo modificadas, desechos municipales, cáscaras de avena, papel, pulpa de papel, hierba de tallo azul, álamo, cáscaras de arroz, cáscaras de semilla, forraje, sorgo, paja, caña de azúcar, pasto aguja, trigo, paja de trigo, salvado de trigo, salvado de trigo desalmidonado, salsas, madera, células vegetales, cultivos de tejido vegetal, cultivos de tejido o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la primera reducción mecánica del tamaño y/o la segunda reducción mecánica del tamaño no comprenden molienda.

En algunas realizaciones, la una o más enzimas en (g) comprenden una o más hemicelulasas y/o una o más celulasas. En algunas realizaciones, la una o más enzimas en (g) están a un nivel total de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % p/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, se efectúan (g) y (h) simultáneamente. En algunas realizaciones, se efectúan (g) y (h) secuencialmente. En algunas realizaciones, el uno o más microorganismos en (g) comprenden el mismo uno o más microorganismos en (h).

Se proporcionan también los productos finales de fermentación producidos por cualquiera de los procedimientos divulgados en la presente memoria.

En otro aspecto, se proporcionan procedimientos de producción de una primera y segunda poblaciones de polímeros de sacárido a partir de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa, comprendiendo los procedimientos: (a) pretratar la composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa produciendo una composición de biomasa pretratada que comprende partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm en una o más dimensiones de tamaño y una primera población de polímeros de sacárido, donde el pretratamiento comprende: (i) hidratar la composición de biomasa en un medio acuoso produciendo una composición de biomasa hidratada; (ii) reducir la composición de biomasa hidratada mediante reducción mecánica del tamaño produciendo partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño, y (iii) calentar la composición de biomasa hidratada durante un tiempo suficiente para producir una composición de biomasa pretratada que comprende partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño y una primera población de polímeros de sacárido; y (b) hidrolizar las partículas sólidas durante un tiempo suficiente para producir una segunda población de polímeros de sacárido.

En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden adicionalmente separar las partículas sólidas de la primera población de polímeros de sacárido antes de hidrolizar. En algunas realizaciones, las partículas sólidas se hidrolizan con un ácido produciendo una segunda población de polímeros de sacárido. En algunas realizaciones, el ácido comprende ácido sulfúrico, ácido peroxiacético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido sulfuroso, ácido cloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido carbónico o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la primera población de polímeros de sacárido comprende residuos de glucosa, residuos de xilosa, residuos de manosa, residuos de galactosa, residuos de ramnosa, residuos de arabinosa o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la segunda población de polímeros de sacárido comprende residuos de glucosa. En algunas realizaciones, la primera y segunda poblaciones de polímeros de sacárido son solubles.

En algunas realizaciones, la una o más dimensiones de tamaño son longitud, anchura, altura o diámetro. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas son de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 2 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas son de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas son de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas son de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 1 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas son de menos de 1,5 mm, menos de 1 mm o menos de 0,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las

partículas sólidas son de menos de 1,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño.

- En algunas realizaciones, las partículas sólidas comprenden una mezcla de partículas sólidas donde las partículas sólidas son uniformes en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, las partículas sólidas son uniformes en la una o más dimensiones de tamaño, donde aproximadamente un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % de las partículas sólidas son de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1,5 mm, de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1 mm, o de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 1 mm en la una o más dimensiones de tamaño.
- 10 En algunas realizaciones, la primera población de polímeros de sacárido y/o la segunda población de polímeros de sacárido comprenden adicionalmente uno o más inhibidores de la fermentación. En algunas realizaciones, los inhibidores de la fermentación comprenden furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) y/o uno o más ácidos orgánicos. En algunas realizaciones, el uno o más ácidos orgánicos comprenden ácido acético. En algunas realizaciones, la primera población de polímeros de sacárido y/o la segunda población de polímeros de sacárido comprenden menos de aproximadamente: 5 %, 2,5 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,005 % o 0,001 % p/v del uno o más inhibidores de la fermentación. En algunas realizaciones, la primera población de polímeros de sacárido y/o la segunda población de polímeros de sacárido comprenden menos de aproximadamente: 5 %, 2,5 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,005 % o 0,001 % p/v del uno o más ácidos orgánicos. En algunas realizaciones, la primera población de polímeros de sacárido y/o la segunda población de polímeros de sacárido comprenden menos de aproximadamente: 5 %, 2,5 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,005 % o 0,001 % p/v de ácido acético. En algunas realizaciones, la primera población de polímeros de sacárido y/o la segunda población de polímeros de sacárido comprenden menos de aproximadamente: 0,01 %, 0,005 %, 0,004 %, 0,003 %, 0,002 %, 0,001 %, 0,0005 %, 0,0001 %, 0,00005 % o 0,00001 % de hidroximetilfurfural. En algunas realizaciones, la primera población de polímeros de sacárido y/o la segunda población de polímeros de sacárido comprenden menos de aproximadamente: 0,01 %, 0,005 %, 0,004 %, 0,003 %, 0,002 %, 0,001 %, 0,0005 %, 0,0001 %, 0,00005 % o 0,00001 % de furfural. En algunas realizaciones, la primera población de polímeros de sacárido y/o la segunda población de polímeros de sacárido comprenden un nivel indetectable de furfural. En algunas realizaciones, la retirada del uno o más inhibidores de la fermentación no aumenta significativamente el rendimiento del uno o más productos finales de fermentación.

En algunas realizaciones, la primera población de polímeros de sacárido y/o la segunda población de polímeros de sacárido comprenden oligosacáridos. En algunas realizaciones, la primera población de polímeros de sacárido y/o la segunda población de polímeros de sacárido son oligosacáridos.

- En algunas realizaciones, la composición de biomasa hidratada comprende de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % de sólidos, o aproximadamente 5 % de sólidos por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, el medio acuoso está a una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 70 °C, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C o a aproximadamente 50 °C. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante la hidratación de la composición de biomasa en el medio acuoso a mayor temperatura. En algunas realizaciones, la hidratación de la composición de biomasa es durante un tiempo de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 60 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 20 minutos. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante la hidratación de la composición de biomasa durante un tiempo mayor. En algunas realizaciones, el calentamiento de la composición de biomasa hidratada es a una temperatura de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 250 °C, de aproximadamente 150 °C a aproximadamente 200 °C o de aproximadamente 160 °C a aproximadamente 180 °C. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante el calentamiento de la composición de biomasa hidratada a una mayor temperatura. En algunas realizaciones, se efectúa el calentamiento de la composición de biomasa hidratada a una presión mayor que la atmosférica. En algunas realizaciones, la presión es de aproximadamente 25 psig a aproximadamente 250 psig, de aproximadamente 75 psig a aproximadamente 200 psig, o de aproximadamente 100 psig a aproximadamente 150 psig. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante el calentamiento de la composición de biomasa hidratada a una mayor presión. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante el calentamiento de una segunda composición de biomasa hidratada que comprende partículas mayores. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante el calentamiento de una segunda composición de biomasa hidratada que comprende partículas con un mayor intervalo de tamaños. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para producir los polímeros de sacárido es de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 60 minutos, de aproximadamente 5

minutos a aproximadamente 30 minutos o de aproximadamente 7,5 minutos a aproximadamente 12,5 minutos.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente deshidratar la composición de biomasa hidratada de aproximadamente 10 % a aproximadamente 40 % de sólidos, o a aproximadamente 30 % de sólidos por peso de biomasa seca antes de calentar. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente explosión de vapor, explosión de vapor catalizada por ácido, explosión de fibra de amoníaco/congelación (AFEX) o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la reducción mecánica del tamaño no comprende molienda. En algunas realizaciones, se efectúa el pretratamiento en un modo de operación continuo. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente ajustar el contenido de agua de la composición de biomasa tratada de a aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 % de sólidos por peso de biomasa seca antes de hidrolizar.

En algunas realizaciones, se efectúa el pretratamiento en un tiempo total de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 3 horas, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 90 minutos o de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 45 minutos. En algunas realizaciones, se produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que durante el pretratamiento durante un tiempo total mayor.

En algunas realizaciones, la primera población de polímeros de sacárido y/o la segunda población de polímeros de sacárido comprenden disacáridos, trisacáridos, tetrasacáridos, pentasacáridos, hexasacáridos, heptasacáridos, octasacáridos, nonasacáridos, decasacáridos o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la composición de biomasa comprende alfalfa, algas, bagazo, bambú, rastrojo de maíz, mazorcas de maíz, granos de maíz, pasta de maíz, líquido de maceración del maíz, sólidos de maceración del maíz, granos de destilería, productos solubles de destilería secados, granos de destilería secados, productos solubles de destilería condensados, granos de destilería húmedos, granos de destilería secados con productos solubles, eucalipto, desechos alimentarios, peladuras de fruta, residuos de jardinería, hierba, cáscaras de grano, plantas de cultivo modificadas, desechos municipales, cáscaras de avena, papel, pulpa de papel, hierba de tallo azul, álamo, cáscaras de arroz, cáscaras de semilla, forraje, sorgo, paja, caña de azúcar, pasto aguja, trigo, paja de trigo, salvado de trigo, salvado de trigo desalmidonado, salsas, madera, células vegetales, cultivos de tejido vegetal, cultivos de tejido o una combinación de los mismos.

Se proporcionan también composiciones que comprenden la primera y/o segunda poblaciones de polímeros de sacárido producidas por cualquiera de los procedimientos divulgados en la presente memoria.

En otro aspecto, se proporcionan sistemas para producir una composición que comprende sacáridos C5 y C6 a partir de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa, comprendiendo los sistemas: (a) un recipiente de pretratamiento para pretratar la composición de biomasa produciendo una composición de biomasa pretratada que comprende partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm en una o más dimensiones de tamaño y un rendimiento de monosacáridos y/o disacáridos C5 que es al menos un 50 % del máximo teórico, donde el recipiente de pretratamiento comprende: (i) una unidad de hidratación para hidratar la composición de biomasa en un medio acuoso de pH no neutro produciendo una composición de biomasa hidratada; (ii) una unidad de reducción del tamaño para reducir mecánicamente el tamaño de la composición de biomasa hidratada produciendo partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño y (iii) una unidad de calentamiento para calentar la composición de biomasa hidratada durante un tiempo suficiente para producir una composición de biomasa pretratada que comprende un rendimiento de monosacáridos y/o disacáridos C5 que es al menos un 50 % del máximo teórico; y (b) una unidad de hidrólisis para hidrolizar la composición de biomasa pretratada con una o más enzimas durante un tiempo suficiente para producir la composición que comprende sacáridos C6 y C5.

Se proporcionan también sistemas para producir una composición que comprende sacáridos C5 y C6 a partir de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa, comprendiendo los sistemas: (a) un recipiente de pretratamiento para pretratar la composición de biomasa produciendo una composición de biomasa pretratada que comprende partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm de tamaño y un rendimiento de monosacáridos y/o disacáridos C5 que es de al menos un 10 % del máximo teórico, donde el recipiente de pretratamiento comprende: (i) una unidad de hidratación para hidratar la composición de biomasa en un medio acuoso de pH neutro produciendo una composición de biomasa hidratada, (ii) una unidad de reducción del tamaño para reducir mecánicamente el tamaño de la composición de biomasa hidratada produciendo partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm de tamaño, donde la reducción mecánica del tamaño comprende cortar con un primer cortador giratorio y un segundo cortador giratorio y (iii) una unidad de calentamiento para calentar la composición de biomasa hidratada durante un tiempo suficiente para producir la composición de biomasa pretratada que comprende

un rendimiento de monosacáridos y disacáridos C5 que es al menos un 10 % del máximo teórico; y (b) una unidad de hidrólisis para hidrolizar la composición de biomasa pretratada con una o más enzimas durante un tiempo suficiente para producir la composición que comprende sacáridos C5 y C6.

5 Se proporcionan también sistemas para producir una composición que comprende sacáridos C5 y C6 a partir de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa, comprendiendo los sistemas: (a) un recipiente de pretratamiento para pretratar la composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa produciendo una composición de biomasa pretratada que comprende partículas sólidas que son de  
10 menos de 1,5 mm de tamaño y un rendimiento de monosacáridos y/o disacáridos C5 que es al menos un 10 % del máximo teórico, donde el recipiente de pretratamiento comprende: (i) una unidad de hidratación para hidratar la composición de biomasa en un medio acuoso que comprende un ácido al 0,1 a 5 % p/p o v/p por peso de biomasa  
15 hidratada, y (ii) una unidad de reducción del tamaño para reducción mecánica de tamaño de la composición de biomasa hidratada, produciendo partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm de tamaño, (iii) una unidad de calentamiento para calentar la composición de biomasa hidratada durante un tiempo suficiente para producir la composición de  
20 biomasa pretratada que comprende un rendimiento de monosacáridos y disacáridos C5 que es al menos un 50 % del máximo teórico; y (b) una unidad de hidrólisis para hidrolizar la celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa de la composición de biomasa pretratada con una o más enzimas durante un tiempo suficiente para producir la  
25 composición que comprende sacáridos C6 y C5.

20 Se proporcionan también sistemas para producir una composición que comprende sacáridos a partir de una biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa, comprendiendo los sistemas: (a) una unidad para el procesamiento de la composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa produciendo una composición de biomasa pretratada que tiene partículas sólidas que son menores de 10 mm en uno o más  
25 dimensiones de tamaño y al menos un 80 % de rendimiento de monómeros y/o dímeros C5, donde la unidad comprende: (i) un mezclador de vórtice para hidratar y cortar la composición de biomasa alimentando la composición de biomasa al mezclador de vórtice que la comprende a una tasa que mantenga un nivel de sólidos de  
30 aproximadamente 5 % p/p por peso de biomasa seca, donde el mezclador de vórtice comprende: (1) un medio acuoso que contiene un ácido a un nivel que es de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 % p/p por peso de biomasa seca, donde el medio acuoso está aproximadamente a 50 °C, (2) uno o más cortadores giratorios, donde  
35 los cortadores giratorios generan un vórtice en el medio acuoso que mezcla la composición de biomasa y el medio acuoso y arrastra la composición de biomasa a las cuchillas produciendo una primera composición de biomasa de corte, (ii) un canal para deshidratar la primera composición de biomasa de corte produciendo un tapón de sólidos que comprende aproximadamente 30 % p/p de sólidos por peso de biomasa seca, (iii) un cortador giratorio para  
40 calentar y cortar de forma simultáneamente alimentando el tapón de sólidos al cortador giratorio que comprende: (1) una pluralidad de cuchillas, donde la pluralidad de cuchillas corta finamente el tapón de biomasa produciendo una segunda composición de biomasa de corte que comprende partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm en una o  
45 más dimensiones de tamaño, y (2) una pluralidad de microperforaciones, donde se inyecta vapor en la segunda composición de biomasa de corte a través de la pluralidad de microperforaciones manteniendo una temperatura de aproximadamente 160 °C a 180 °C y una presión de aproximadamente 135 psig, (iv) una unidad de calentamiento para calentar la segunda composición de biomasa de corte durante un tiempo suficiente para producir al menos un  
50 80 % de rendimiento de sacáridos monoméricos y diméricos C5, y (v) una unidad para someter el tapón de sólidos a explosión de vapor produciendo la primera composición de biomasa pretratada que tiene partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm en una o más dimensiones de tamaño; (b) opcionalmente, un canal para separar los sacáridos C5 solubles de los sólidos; (c) un canal para añadir agua a los sólidos de aproximadamente 5 % a aproximadamente  
55 25 % de sólidos por peso seco; (d) un canal para añadir enzimas en una cantidad de 0,5 kg por kg de biomasa a aproximadamente 20 kg por kg de biomasa; y (e) una unidad de hidrolización para hidrolizar la biomasa durante un tiempo suficiente para producir la composición que comprende sacáridos C5 y C6.

Se proporcionan también sistemas para producir uno o más productos finales de fermentación a partir de una  
50 composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa, comprendiendo los sistemas: (a) una unidad de pretratamiento para pretratar la composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa produciendo una composición de biomasa pretratada que comprende partículas sólidas que son de  
55 menos de 1,5 mm en una o más dimensiones de tamaño y una primera población de polímeros de sacárido, donde la unidad de pretratamiento comprende: (i) una unidad de hidratación para hidratar la composición de biomasa en un medio acuoso produciendo una composición de biomasa hidratada, (ii) una unidad de reducción del tamaño para reducir la composición de biomasa hidratada mediante reducción mecánica del tamaño produciendo partículas  
60 sólidas que son de menos de 1,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño, y (iii) una unidad de calentamiento para calentar la composición de biomasa hidratada durante un tiempo suficiente para producir la composición de biomasa pretratada que comprende partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm en la una o más dimensiones  
de tamaño y la primera población de polímeros de sacárido; y (b) una unidad de hidrolización para hidrolizar y

fermentar la composición de biomasa pretratada con uno o más microorganismos durante un tiempo suficiente para producir el uno o más productos finales de fermentación.

Se proporcionan también sistemas para producir polímeros de sacárido a partir de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa, comprendiendo los sistemas: (a) una primera unidad de hidratación para hidratar la composición de biomasa en un medio acuoso; (b) una primera unidad de reducción del tamaño para reducir la composición de biomasa mediante una primera reducción mecánica del tamaño; (c) un canal para deshidratar la composición de biomasa; (d) una segunda unidad de reducción del tamaño para reducir la composición de biomasa por una segunda reducción mecánica del tamaño produciendo partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm en una o más dimensiones de tamaño; (e) una segunda unidad de hidratación para hidratar la composición de biomasa en un medio acuoso no neutro y (f) una unidad de hidrolización para hidrolizar la composición de biomasa calentando la composición de biomasa durante un tiempo suficiente para producir los polímeros de sacárido.

Se proporcionan también sistemas para producir uno o más productos finales de fermentación a partir de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa, comprendiendo los sistemas: (a) una primera unidad de hidratación para hidratar la composición de biomasa en un medio acuoso; (b) una primera unidad de reducción del tamaño para reducir la composición de biomasa mediante una primera reducción mecánica de tamaño; (c) un canal para deshidratar la composición de biomasa; (d) una segunda unidad de hidratación para reducir la composición de biomasa mediante una segunda reducción mecánica del tamaño produciendo partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm en una o más dimensiones de tamaño; (e) una segunda unidad de hidratación para hidratar la composición de biomasa en un medio acuoso no neutro; (f) una primera unidad de hidrolización para hidrolizar la composición de biomasa mediante el calentamiento de la composición de biomasa durante un tiempo suficiente para producir polímeros de sacárido; (g) una segunda unidad de hidrolización para hidrolizar los polímeros de sacárido con uno o más microorganismos y, opcionalmente, una o más enzimas produciendo monosacáridos y/o disacáridos; y (h) una unidad de fermentación para fermentar los monosacáridos y/o disacáridos con uno o más microorganismos produciendo el uno o más productos finales de fermentación.

Se proporcionan también sistemas para producir una primera y segunda poblaciones de polímeros de sacárido a partir de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa, comprendiendo el sistema: (a) una unidad de pretratamiento para pretratar la composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa produciendo una composición de biomasa pretratada que comprende partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm en una o más dimensiones de tamaño y una primera población de polímeros de sacárido, donde la unidad de pretratamiento comprende: (i) una unidad de hidratación para hidratar la composición de biomasa en un medio acuoso produciendo una composición de biomasa hidratada; (ii) una unidad de reducción del tamaño para reducir la composición de biomasa hidratada mediante reducción mecánica del tamaño produciendo partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño, y (iii) una unidad de calentamiento para calentar la composición de biomasa hidratada durante un tiempo suficiente para producir una composición de biomasa pretratada que comprende partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño y una primera población de polímeros de sacárido; y (b) una unidad de hidrolización para hidrolizar las partículas sólidas durante un tiempo suficiente para producir una segunda población de polímeros de sacárido.

En algunas realizaciones, la una o más dimensiones de tamaño son longitud, anchura, altura o diámetro. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas son de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas son de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas son de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 1 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas son de menos de 1,5 mm, menos de 1 mm o menos de 0,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 % de las partículas sólidas son de menos de 1,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño.

En algunas realizaciones, las partículas sólidas comprenden una mezcla de partículas sólidas donde las partículas sólidas son uniformes en la una o más dimensiones de tamaño. En algunas realizaciones, las partículas sólidas son uniformes en la una o más dimensiones de tamaño, donde aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de las partículas sólidas son uniformes en la una o más dimensiones de tamaño.

80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % de las partículas sólidas son de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1,5 mm, de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1 mm o de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 1 mm en la una o más dimensiones de tamaño.

- 5 En algunas realizaciones, el sistema produce menos de uno o más inhibidores de la fermentación que un sistema que produce partículas mayores. En algunas realizaciones, el sistema produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que un sistema que produce partículas con un intervalo de tamaño mayor. En algunas realizaciones, el sistema produce menos del uno más inhibidores de la fermentación que un sistema que produce partículas que no son de tamaño uniforme. En algunas realizaciones, el sistema produce menos del uno o más inhibidores de la fermentación que un sistema que produce partículas mayores. En algunas realizaciones, el uno o más inhibidores de fermentación comprenden furfural, hidroximetilfurfural, uno o más ácidos orgánicos o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el uno o más ácidos orgánicos comprenden ácido acético.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 15 Los rasgos novedosos divulgados en la presente memoria se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de los rasgos y ventajas por referencia a la siguiente descripción detallada, que expone realizaciones ilustrativas en que se utilizan los principios de la divulgación, y los dibujos acompañantes en que:

20 La **Figura 1** muestra la conversión de glucosa a partir de celulosa usando 1x, 0,5x y 0,25x carga enzimática con 8 % de sólidos.

La **Figura 2** muestra la conversión de xilosa a partir de hemicelulosa usando 1x, 0,5x y 0,25x carga enzimática con 8 % de sólidos.

La **Figura 3** muestra la conversión de glucosa a partir de celulosa usando 1x, 0,5x y 0,25x carga enzimática con 10 % de sólidos.

30 La **Figura 4** muestra la conversión de xilosa a partir de hemicelulosa usando 1x, 0,5x y 0,25x carga enzimática con 10 % de sólidos.

La **Figura 5** muestra la conversión de glucosa y xilosa a partir de celulosa y hemicelulosa, respectivamente, usando 1x carga enzimática con 20 % de sólidos.

35 La **Figura 6** muestra la conversión de glucosa y xilosa a partir de celulosa y hemicelulosa, respectivamente, usando 0,50x carga enzimática con 20 % de sólidos.

La **Figura 7** muestra la conversión de glucosa y xilosa a partir de celulosa y hemicelulosa, respectivamente, usando 40 0,25x carga enzimática con 20 % de sólidos.

La **Figura 8** muestra la conversión de glucosa y xilosa a partir de celulosa y hemicelulosa, respectivamente, usando 1x carga enzimática con 10 % de sólidos.

45 La **Figura 9** muestra un diagrama de procesamiento para la conversión de carga de alimentación en corrientes y residuos de sacáridos.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

50 Como se usan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares «un», «una» y «el/la» incluyen los referentes plurales a menos que el contexto imponga claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a «un monómero purificado» incluye mezclas de dos o más monómeros purificados. El término «comprende», como se usa en la presente memoria, es sinónimo de «incluye», «contiene» o «se caracteriza por» y es inclusivo o de extremos abiertos y no excluye elementos o etapas de procedimiento adicionales no indicados.

55 Todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción y demás usados en la memoria descriptiva han de entenderse como modificados en todos los aspectos por el término «aproximadamente». Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la presente memoria son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busque obtener. Como 60 mínimo, y no como intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de cualquier

reivindicación en cualquier solicitud que reivindique prioridad de la presente solicitud, cada parámetro numérico debería considerarse a la vista del número de dígitos significativos y los enfoques de redondeo ordinarios.

Siempre que se usen en la presente memoria las frases «por ejemplo», «tal como», «incluyendo» y similares, se entiende que sigue la frase «y sin limitación» a menos que se afirme explícitamente otra cosa. Por lo tanto, «por ejemplo producción de etanol» significa «por ejemplo y sin limitación producción de etanol».

En esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a una serie de términos que se definirán por tener los siguientes significados. A menos que se caractericen de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un especialista en la materia.

### Definiciones

«Opcional» u «opcionalmente» significa que el evento o circunstancia descrito a continuación puede o no ocurrir, y que la descripción incluye aspectos en que dicho evento o circunstancia ocurre y aspectos en que no. Por ejemplo, la frase «el medio puede contener opcionalmente glucosa» significa que el medio puede contener o no contener glucosa como ingrediente y que la descripción incluye tanto medios que contienen glucosa como medios que no contienen glucosa.

«Aproximadamente» significa una indicación numérica referenciada más o menos el 10 % de esa indicación numérica referenciada. Por ejemplo, el término aproximadamente 4 incluiría un intervalo de 3,6 a 4,4.

«Producto final fermentativo» y «producto final de fermentación» se usan intercambiamente en la presente memoria para incluir biocombustibles, productos químicos, compuestos adecuados como combustibles líquidos, combustibles gaseosos, triacilgliceroles (TAG), reactivos, cargas de alimentación químicas, aditivos químicos, auxiliares de procesamiento, aditivos alimentarios, bioplásticos y precursores de bioplásticos y otros productos. Los ejemplos de productos finales fermentativos incluyen, pero sin limitación, 1,4-diácidos (succínico, fumárico y málico), ácido 2,5-furanodicarboxílico, ácido 3-hidroxi propiónico, ácido aspártico, ácido glucárico, ácido glutámico, ácido itacónico, ácido levulínico, 3-hidroxi butirolactona, glicerol, sorbitol, xilitol/arabinitol, butanodiol, butanol, metano, metanol, etano, eteno, etanol, n-propano, 1-propeno, 1-propanol, propanal, acetona, propionato, n-butano, 1-buteno, 1-butanol, butanal, butanoato, isobutanol, isobutanal, 2-metilbutanal, 2-metilbutanol, 3-metilbutanal, 3-metilbutanol, 2-buteno, 2-butanol, 2-butanona, 2,3-butanodiol, 3-hidroxi-2-butanona, 2,3-butanodiona, etilbenceno, etenilbenceno, 2-feniletanol, fenilacetaldehído, 1-fenilbutano, 4-fenil-1-buteno, 4-fenil-2-buteno, 1-fenil-2-buteno, 1-fenil-2-butanol, 4-fenil-2-butanol, 1-fenil-2-butanona, 4-fenil-2-butanona, 1-fenil-2,3-butanodiol, 1-fenil-3-hidroxi-2-butanona, 4-fenil-3-hidroxi-2-butanona, 1-fenil-2,3-butanodiona, n-pentano, etilfenol, etenifenol, 2-(4-hidroxifenil)etanol, 4-hidroxifenilacetaldehído, 1-(4-hidroxifenil)butano, 4-(4-hidroxifenil)-1-buteno, 4-(4-hidroxifenil)-2-buteno, 1-(4-hidroxifenil)-1-buteno, 1-(4-hidroxifenil)-2-butanol, 4-(4-hidroxifenil)-2-butanol, 1-(4-hidroxifenil)-2-butanona, 4-(4-hidroxifenil)-2-butanona, 1-(4-hidroxifenil)-2,3-butandiol, 1-(4-hidroxifenil)-3-hidroxi-2-butanona, 4-(4-hidroxifenil)-3-hidroxi-2-butanona, 1-(4-hidroxifenil)-2,3-butanonadiona, indoliletano, indolileteno, 2-(indol-3)-etanol, n-pentano, 1-penteno, 1-pentanol, pentanal, pentanoato, 2-penteno, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-pentanona, 3-pentanona, 4-metilpentanal, 4-metilpentanol, 2,3-pentanodiol, 2-hidroxi-3-pentanona, 3-hidroxi-2-pentanona, 2,3-pentanodiona, 2-metilpentano, 4-metil-1-penteno, 4-metil-2-penteno, 4-metil-3-penteno, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-pentanol, 4-metil-2-pentanona, 2-metil-3-pentanona, 4-metil-2,3-pentanodiol, 4-metil-2-hidroxi-3-pentanona, 4-metil-3-hidroxi-2-pentanona, 4-metil-2,3-pentanodiona, 1-fenilpentano, 1-fenil-1-penteno, 1-fenil-2-penteno, 1-fenil-3-penteno, 1-fenil-2-pentanol, 1-fenil-3-pentanol, 1-fenil-2-pentanona, 1-fenil-3-pentanona, 1-fenil-2,3-pentanodiol, 1-fenil-2-hidroxi-3-pentanona, 1-fenil-3-hidroxi-2-pentanona, 1-fenil-2,3-pentanodiona, 4-metil-1-fenilpentano, 4-metil-1-fenil-1-penteno, 4-metil-1-fenil-2-penteno, 4-metil-1-fenil-3-penteno, 4-metil-1-fenil-2-pentanol, 4-metil-1-fenil-3-pentanol, 4-metil-1-fenil-2-pentanona, 4-metil-1-fenil-3-pentanona, 4-metil-1-fenil-2,3-pentanodiol, 4-metil-1-fenil-2,3-pentanodiona, 4-metil-1-fenil-3-hidroxi-2-pentanona, 4-metil-1-fenil-2-hidroxi-3-pentanona, 1-(4-hidroxifenil)pentano, 1-(4-hidroxifenil)-1-penteno, 1-(4-hidroxifenil)-2-penteno, 1-(4-hidroxifenil)-3-penteno, 1-(4-hidroxifenil)-2-pentanol, 1-(4-hidroxifenil)-3-pentanol, 1-(4-hidroxifenil)-2-pentanona, 1-(4-hidroxifenil)-3-pentanona, 1-(4-hidroxifenil)-2,3-pentanodiol, 1-(4-hidroxifenil)-2-hidroxi-3-pentanona, 1-(4-hidroxifenil)-3-hidroxi-2-pentanona, 1-(4-hidroxifenil)-2,3-pentanodiona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)pentano, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-penteno, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-penteno, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-1-penteno, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-pentanol, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-pentanol, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-pentanona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-pentanona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2,3-pentanodiol, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2,3-pentanodiona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-hidroxi-2-pentanona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-hidroxi-3-pentanona, 1-indol-3-pentano, 1-(indol-3)-1-penteno, 1-(indol-3)-2-penteno, 1-(indol-3)-3-penteno, 1-(indol-3)-2-pentanol, 1-(indol-3)-3-pentanol, 1-(indol-3)-2-pentanona, 1-(indol-3)-3-pentanona, 1-(indol-3)-2,3-pentanodiol, 1-(indol-3)-2-hidroxi-3-pentanona, 1-(indol-3)-3-hidroxi-2-pentanona, 1-(indol-3)-2,3-pentanodiona, 4-metil-1-(indol-3)-

pentano, 4-metil-1-(indol-3)-2-penteno, 4-metil-1-(indol-3)-3-penteno, 4-metil-1-(indol-3)-1-penteno, 4-metil-2-(indol-3)-3-pentanol, 4-metil-1-(indol-3)-2-pentanol, 4-metil-1-(indol-3)-3-pentanona, 4-metil-1-(indol-3)-2-pentanona, 4-metil-1-(indol-3)-2,3-pentanodiol, 4-metil-1-(indol-3)-2,3-pentanodiona, 4-metil-1-(indol-3)-3-hidroxi-2-pentanona, 4-metil-1-(indol-3)-2-hidroxi-3-pentanona, n-hexano, 1-hexeno, 1-hexanol, hexanal, hexanoato, 2-hexeno, 3-hexeno, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-hexanona, 3-hexanona, 2,3-hexanodiol, 2,3-hexanodiona, 3,4-hexanodiol, 3,4-hexanodiona, 2-hidroxi-3-hexanona, 3-hidroxi-2-hexanona, 3-hidroxi-4-hexanona, 4-hidroxi-3-hexanona, 2-metilhexano, 3-metilhexano, 2-metil-2-hexeno, 2-metil-3-hexeno, 5-metil-1-hexeno, 5-metil-2-hexeno, 4-metil-1-hexeno, 4-metil-2-hexeno, 3-metil-3-hexeno, 3-metil-2-hexeno, 3-metil-1-hexeno, 2-metil-3-hexanol, 5-metil-2-hexanol, 5-metil-3-hexanol, 2-metil-3-hexanona, 5-metil-2-hexanona, 5-metil-3-hexanona, 2-metil-3,4-hexanodiol, 2-metil-3,4-hexanodiona, 5-metil-2,3-hexanodiol, 5-metil-2,3-hexanodiona, 4-metil-2,3-hexanodiol, 4-metil-2,3-hexanodiona, 2-metil-3-hidroxi-4-hexanona, 2-metil-4-hidroxi-3-hexanona, 5-metil-2-hidroxi-3-hexanona, 5-metil-3-hidroxi-2-hexanona, 4-metil-2-hidroxi-3-hexanona, 4-metil-3-hidroxi-2-hexanona, 2,5-dimetilhexano, 2,5-dimetil-2-hexeno, 2,5-dimetil-3-hexeno, 2,5-dimetil-3-hexanol, 2,5-dimetil-3-hexanona, 2,5-dimetil-3,4-hexanodiol, 2,5-dimetil-3,4-hexanodiona, 2,5-dimetil-3-hidroxi-4-hexanona, 5-metil-1-fenilhexano, 4-metil-1-fenilhexano, 5-metil-1-fenil-1-hexeno, 5-metil-1-fenil-2-hexeno, 5-metil-1-fenil-3-hexeno, 4-metil-1-fenil-1-hexeno, 4-metil-1-fenil-2-hexeno, 4-metil-1-fenil-3-hexeno, 5-metil-1-fenil-2-hexanol, 5-metil-1-fenil-3-hexanol, 4-metil-1-fenil-2-hexanol, 4-metil-1-fenil-3-hexanol, 5-metil-1-fenil-2-hexanona, 5-metil-1-fenil-3-hexanona, 4-metil-1-fenil-2-hexanona, 4-metil-1-fenil-3-hexanona, 5-metil-1-fenil-2,3-hexanodiol, 4-metil-1-fenil-2,3-hexanodiol, 5-metil-1-fenil-3-hidroxi-2-hexanona, 5-metil-1-fenil-2-hidroxi-3-hexanona, 4-metil-1-fenil-3-hidroxi-2-hexanona, 4-metil-1-fenil-2-hidroxi-3-hexanona, 5-metil-1-fenil-2,3-hexanodiona, 4-metil-1-fenil-2,3-hexanodiona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)hexano, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-1-hexeno, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-hexeno, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-hexeno, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-1-hexeno, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-hexeno, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-hexeno, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-hexanol, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-hexanol, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-hexanol, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-hexanol, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-hexanona, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-hexanona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-hexanona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-hexanona, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-2,3-hexanodiol, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2,3-hexanodiol, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-hidroxi-2-hexanona, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-hidroxi-3-hexanona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-hidroxi-2-hexanona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-hidroxi-3-hexanona, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-2,3-hexanodiona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2,3-hexanodiona, 4-metil-1-(indol-3)-hexano, 5-metil-1-(indol-3)-1-hexeno, 5-metil-1-(indol-3)-2-hexeno, 5-metil-1-(indol-3)-3-hexeno, 4-metil-1-(indol-3)-1-hexeno, 4-metil-1-(indol-3)-2-hexeno, 4-metil-1-(indol-3)-3-hexeno, 5-metil-1-(indol-3)-2-hexanol, 5-metil-1-(indol-3)-3-hexanol, 4-metil-1-(indol-3)-2-hexanol, 4-metil-1-(indol-3)-3-hexanol, 5-metil-1-(indol-3)-2-hexanona, 5-metil-1-(indol-3)-3-hexanona, 4-metil-1-(indol-3)-2-hexanona, 4-metil-1-(indol-3)-3-hexanona, 5-metil-1-(indol-3)-2,3-hexanodiol, 4-metil-1-(indol-3)-2,3-hexanodiol, 5-metil-1-(indol-3)-3-hidroxi-2-hexanona, 5-metil-1-(indol-3)-2-hidroxi-3-hexanona, 4-metil-1-(indol-3)-3-hidroxi-2-hexanona, 4-metil-1-(indol-3)-2-hidroxi-3-hexanona, 5-metil-1-(indol-3)-2,3-hexanodiona, 4-metil-1-(indol-3)-2,3-hexanodiona, n-heptano, 1-hepteno, 1-heptanol, heptanal, heptanoato, 2-hepteno, 3-hepteno, 2-heptanol, 3-heptanol, 4-heptanol, 2-heptanona, 3-heptanona, 4-heptanona, 2,3-heptanodiol, 2,3-heptanodiona, 3,4-heptanodiol, 3,4-heptanodiona, 2-hidroxi-3-heptanona, 3-hidroxi-2-heptanona, 3-hidroxi-4-heptanona, 4-hidroxi-3-heptanona, 2-metilheptano, 3-metilheptano, 6-metil-2-hepteno, 6-metil-3-hepteno, 2-metil-3-hepteno, 2-metil-2-hepteno, 5-metil-2-hepteno, 5-metil-3-hepteno, 3-metil-3-hepteno, 2-metil-3-heptanol, 2-metil-4-heptanol, 6-metil-3-heptanol, 5-metil-3-heptanol, 3-metil-4-heptanol, 2-metil-3-heptanona, 2-metil-4-heptanona, 6-metil-3-heptanona, 5-metil-3-heptanona, 3-metil-4-heptanona, 2-metil-3,4-heptanodiol, 2-metil-3,4-heptanodiona, 6-metil-3,4-heptanodiol, 6-metil-3,4-heptanodiona, 5-metil-3,4-heptanodiol, 5-metil-3,4-heptanodiona, 2-metil-3-hidroxi-4-heptanona, 2-metil-4-hidroxi-3-heptanona, 6-metil-3-hidroxi-4-heptanona, 6-metil-4-hidroxi-3-heptanona, 5-metil-3-hidroxi-4-heptanona, 5-metil-4-hidroxi-3-heptanona, 2,6-dimetilheptano, 2,5-dimetilheptano, 2,6-dimetil-2-hepteno, 2,6-dimetil-3-hepteno, 2,5-dimetil-2-hepteno, 2,5-dimetil-3-hepteno, 3,6-dimetil-3-hepteno, 2,6-dimetil-3-heptanol, 2,6-dimetil-4-heptanol, 2,5-dimetil-3-heptanol, 2,5-dimetil-4-heptanol, 2,6-dimetil-3,4-heptanodiol, 2,6-dimetil-3,4-heptanodiona, 2,5-dimetil-3,4-heptanodiol, 2,5-dimetil-3,4-heptanodiona, 2,6-dimetil-3-hidroxi-4-heptanona, 2,6-dimetil-4-hidroxi-3-heptanona, 2,5-dimetil-3-hidroxi-4-heptanona, 2,5-dimetil-4-hidroxi-3-heptanona, n-octano, 1-octeno, 2-octeno, 1-octanol, octanal, octanoato, 3-octeno, 4-octeno, 4-octanol, 4-octanona, 4,5-octanodiol, 4,5-octanodiona, 4-hidroxi-5-octanona, 2-metiloctano, 2-metil-3-octeno, 2-metil-4-octeno, 7-metil-3-octeno, 3-metil-3-octeno, 3-metil-4-octeno, 6-metil-3-octeno, 2-metil-4-octanol, 7-metil-4-octanol, 3-metil-4-octanol, 6-metil-4-octanol, 2-metil-4-octanona, 7-metil-4-octanona, 3-metil-4-octanona, 6-metil-4-octanona, 2-metil-4,5-octanodiol, 2-metil-4,5-octanodiona, 3-metil-4,5-octanodiol, 3-metil-4,5-octanodiona, 2-metil-4-hidroxi-5-octanona, 2-metil-5-hidroxi-4-octanona, 3-metil-4-hidroxi-5-octanona, 3-metil-5-hidroxi-4-octanona, 2,7-dimetiloctano, 2,7-dimetil-3-octeno, 2,7-dimetil-4-octeno, 2,7-dimetil-4-octanol, 2,7-dimetil-4-octanona, 2,7-dimetil-4,5-octanodiol, 2,7-dimetil-4,5-octanodiona, 2,7-dimetil-4-hidroxi-5-octanona, 2,6-dimetiloctano, 2,6-dimetil-3-octeno, 2,6-dimetil-4-octeno, 3,7-dimetil-3-octeno, 2,6-dimetil-4-octanol, 3,7-dimetil-4-octanol, 2,6-dimetil-4-octanona, 3,7-dimetil-4-octanona, 2,6-dimetil-4,5-octanodiol, 2,6-dimetil-4,5-octanodiona, 2,6-dimetil-4-hidroxi-5-octanona, 2,6-dimetil-5-hidroxi-4-octanona, 3,6-dimetiloctano, 3,6-dimetil-3-octeno, 3,6-dimetil-4-octeno, 3,6-dimetil-4-octanol, 3,6-dimetil-4-octanona, 3,6-dimetil-4,5-octanodiol, 3,6-dimetil-4,5-octanodiona, 3,6-dimetil-4-hidroxi-5-octanona, n-nonano, 1-noneno, 1-nonanol, nonanal, nonanoato, 2-metilnonano,

2-metil-4-noneno, 2-metil-5-noneno, 8-metil-4-noneno, 2-metil-5-nonanol, 8-metil-4-nonanol, 2-metil-5-nonanona, 8-metil-4-nonanona, 8-metil-4,5-nonanodiol, 8-metil-4,5-nonanodiona, 8-metil-4-hidroxi-5-nonanona, 8-metil-5-hidroxi-4-nonanona, 2,8-dimetilnonano, 2,8-dimetil-3-noneno, 2,8-dimetil-4-noneno, 2,8-dimetil-5-noneno, 2,8-dimetil-4-nonanol, 2,8-dimetil-5-nonanol, 2,8-dimetil-4-nonanona, 2,8-dimetil-5-nonanona, 2,8-dimetil-4,5-nonanodiol, 2,8-dimetil-4,5-nonanodiona, 2,8-dimetil-4-hidroxi-5-nonanona, 2,8-dimetil-5-hidroxi-4-nonanona, 2,7-dimetilnonano, 3,8-dimetil-3-noneno, 3,8-dimetil-4-noneno, 3,8-dimetil-5-noneno, 3,8-dimetil-4-nonanol, 3,8-dimetil-5-nonanol, 3,8-dimetil-4-nonanona, 3,8-dimetil-5-nonanona, 3,8-dimetil-4,5-nonanodiol, 3,8-dimetil-4,5-nonanodiona, 3,8-dimetil-4-hidroxi-5-nonanona, 3,8-dimetil-5-hidroxi-4-nonanona, n-decano, 1-deceno, 1-decanol, decanoato, 2,9-dimetildecano, 2,9-dimetil-3-deceno, 2,9-dimetil-4-deceno, 2,9-dimetil-5-decanol, 2,9-dimetil-5-decanona, 2,9-dimetil-5,6-decanodiol, 2,9-dimetil-6-hidroxi-5-decanona, 2,9-dimetil-5,6-decanodionaundecano, 1-undeceno, 1-undecanol, undecanal, undecanoato, n-dodecano, 1-dodeceno, 1-dodecanol, dodecanal, dodecanoato, n-dodecano, 1-decadeceno, n-tridecano, 1-tridecano, 1-tridecanol, tridecanal, tridecanoato, n-tetradecano, 1-tetradeceno, 1-tetradecanol, tetradecanal, tetradecanoato, n-pentadecano, 1-pentadeceno, 1-pentadecanol, pentadecanal, pentadecanoato, n-hexadecano, 1-hexadeceno, 1-hexadecanol, hexadecanal, hexadecanoato, n-heptadecano, 1-heptadeceno, 1-heptadecanol, heptadecanal, heptadecanoato, n-octadecano, 1-octadeceno, 1-octadecanol, octadecanal, octadecanoato, n-nonadecano, 1-nonadeceno, 1-nonadecanol, nonadecanal, nonadecanoato, eicosano, 1-eicoseno, 1-eicosanol, eicosanal, eicosanoato, 3-hidroxiopropanal, 1,3-propanodiol, 4-hidroxiбутанол, 1,4-butanodiol, 3-hidroxi-2-butanona, 2,3-butanodiol, 1,5-pentanodiol, homocitrato, hemoisocitrato, b-hidroxiadipato, glutarato, glutarsemialdehído, glutaraldehído, 2-hidroxi-1-ciclopentanona, 1,2-ciclopentanodiol, ciclopentanona, ciclopentanol, (S)-2-acetolactato, (R)-2,3-dihidroxisovalerato, 2-oxoisovalerato, isobutil-CoA, isobutilirato, isobutilaldehído, 5-aminopentaldehído, 1,10-diaminodecano, 1,10-diamino-5-deceno, 1,10-diamino-5-hidroxi-decano, 1,10-diamino-5-decanona, 1,10-diamino-5,6-decanodiol, 1,10-diamino-6-hidroxi-5-decanona, fenilacetaldehído, 1,4-difenilbutano, 1,4-difenil-1-buteno, 1,4-difenil-2-buteno, 1,4-difenil-2-butanol, 1,4-difenil-2-butanona, 1,4-difenil-2,3-butanodiol, 1,4-difenil-3-hidroxi-2-butanona, 1-(4-hidroxiifenil)-4-fenilbutano, 1-(4-hidroxiifenil)-4-fenil-1-buteno, 1-(4-hidroxiifenil)-4-fenil-2-buteno, 1-(4-hidroxiifenil)-4-fenil-2-butanol, 1-(4-hidroxiifenil)-4-fenil-2-butanona, 1-(4-hidroxiifenil)-4-fenil-2,3-butanodiol, 1-(4-hidroxiifenil)-4-fenil-3-hidroxi-2-butanona, 1-(indol-3)-4-fenilbutano, 1-(indol-3)-4-fenil-1-buteno, 1-(indol-3)-4-fenil-2-buteno, 1-(indol-3)-4-fenil-2-butanol, 1-(indol-3)-4-fenil-2-butanona, 1-(indol-3)-4-fenil-2,3-butanodiol, 1-(indol-3)-4-fenil-3-hidroxi-2-butanona, 4-hidroxiifenilacetaldehído, 1,4-di(4-hidroxiifenil)butano, 1,4-di(4-hidroxiifenil)-1-buteno, 1,4-di(4-hidroxiifenil)-2-buteno, 1,4-di(4-hidroxiifenil)-2-butanol, 1,4-di(4-hidroxiifenil)-2-butanona, 1,4-di(4-hidroxiifenil)-2,3-butanodiol, 1,4-di(4-hidroxiifenil)-3-hidroxi-2-butanona, 1-(4-hidroxiifenil)-4-(indol-3)-butano, 1-(4-hidroxiifenil)-4-(indol-3)-1-buteno, 1-di(4-hidroxiifenil)-4-(indol-3)-2-buteno, 1-(4-hidroxiifenil)-4-(indol-3)-2-butanol, 1-(4-hidroxiifenil)-4-(indol-3)-2-butanona, 1-(4-hidroxiifenil)-4-(indol-3)-2,3-butanodiol, 1-(4-hidroxiifenil)-4-(indol-3)-3-hidroxi-2-butanona, indol-3-acetaldehído, 1,4-di(indol-3)butano, 1,4-di(indol-3)-1-buteno, 1,4-di(indol-3)-2-buteno, 1,4-di(indol-3)-2-butanol, 1,4-di(indol-3)-2-butanona, 1,4-di(indol-3)-2,3-butanodiol, 1,4-di(indol-3)-3-hidroxi-2-butanona, succinato semialdehído, ácido hexano-1,8-dicarboxílico, ácido 3-hexeno-1,8-dicarboxílico, ácido 3-hidroxihexano-1,8-dicarboxílico, ácido 3-hexanon-1,8-dicarboxílico, ácido 3,4-hexanodiol-1,8-dicarboxílico, ácido 4-hidroxi-3-hexanona-1,8-dicarboxílico, glicerol, fucoidano, yodo, clorofila, carotenoide, calcio, magnesio, hierro, potasio, fosfato, ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, isoprenoides y poliisoprenos, incluyendo caucho. Además, tales productos pueden incluir ácido succínico, ácido pirúvico, enzimas tales como celulasas, polisacaridas, lipasas, proteasas, ligninasas y hemicelulasas y pueden estar presentes como compuesto puro, una mezcla o una forma impura o diluida.

El término «material que comprende ácido graso» como se usa en la presente memoria tiene su significado ordinario conocido por los especialistas en la materia y puede comprender uno o más compuestos químicos que incluyen uno o más restos de ácido graso, así como derivados de estos compuestos y materiales que comprenden uno o más de estos compuestos. Los ejemplos comunes de compuestos que incluyen uno o más restos de ácido graso incluyen triacilglicéridos, diacilglicéridos, monoacilglicéridos, fosfolípidos, lisofosfolípidos, ácidos grasos libres, sales de ácido graso, jabones, amidas que comprenden ácido graso, ésteres de ácido graso y alcoholes monohidroxiácidos, ésteres de ácidos grasos y alcoholes polihidroxiácidos incluyendo glicoles (p. ej., etilenglicol, propilenglicol, etc.), ésteres de ácidos grasos y polietilenglicol, ésteres de ácido graso y poliéteres, ésteres de ácidos grasos y poliglicol, ésteres de ácidos grasos y sacáridos, ésteres de ácidos grasos con otros compuestos que contienen hidroxilo, etc. Un material que comprende ácido graso puede ser uno o más de estos compuestos en una forma aislada o purificada. Puede ser un material que incluye uno o más de estos compuestos que se combinan o mezclan con otros materiales similares o diferentes. Puede ser un material en que el material que comprende ácido graso aparece o se proporciona con otros materiales similares o diferentes, tales como aceites vegetales y animales; mezclas de aceites vegetales y animales; subproductos de aceite vegetal y animal; mezclas de subproductos de aceite vegetal y animal; ésteres de cera vegetal y animal; mezclas, derivados y subproductos de ésteres de cera vegetal y animal; semillas; semillas procesadas; subproductos de semilla; nueces; nueces procesadas; subproductos de nueces; materia animal; materia animal procesada; subproductos de materia animal; maíz; maíz procesado; subproductos de maíz; granos de destilación; judías; judías procesadas; subproductos de judías; productos de soja; materia vegetal, de pescado o

animal que contiene lípidos; materia vegetal o animal que contiene lípidos procesados; subproductos de materia vegetal, de pescado o animal que contiene lípidos; material microbiano que contiene lípidos; material microbiano que contiene lípidos procesados y subproductos de materia microbiana que contiene lípidos. Tales materiales pueden utilizarse en formas líquidas o sólidas. Las formas sólidas incluyen formas enteras, tales como células, judías y semillas; trituradas, cortadas, suspendidas, extraídas, laminadas, molidas, etc. La porción de ácido graso del compuesto que contiene ácido graso puede ser un ácido graso sencillo, tal como uno que incluya un grupo carboxilo enlazado con un grupo alquilo sustituido o no sustituido. El grupo alquilo sustituido o no sustituido puede ser lineal o ramificado, saturado o insaturado. Las sustituciones en el grupo alquilo pueden incluir grupos hidroxilo, fosfato, halógeno, alcoxi o arilo. El grupo alquilo sustituido o no sustituido puede tener de 7 a 29 carbonos y preferentemente de 11 a 23 carbonos (p. ej., de 8 a 30 carbonos y preferentemente de 12 a 24 carbonos contando el grupo carboxilo) dispuestos en una cadena lineal con o sin cadenas laterales y/o sustituciones. La adición del compuesto que contiene ácido graso puede ser mediante la adición de un material que comprende el compuesto que comprende ácido graso.

15 El término «modificador del pH», como se usa en la presente memoria, tiene su significado ordinario conocido por los especialistas en la materia y puede incluir cualquier material que tienda a aumentar, disminuir o mantener estacionario el pH del caldo o medio. Un modificador del pH puede ser un ácido, una base, un tampón o un material que reaccione con los otros materiales presentes sirviendo para elevar, rebajar o mantener estacionario el pH. En una realización, puede usarse más de un modificador del pH, tal como más de un ácido, más de una base, uno o más ácidos con una o más bases, uno o más ácidos con uno o más tampones, una o más bases con uno o más tampones o uno o más ácidos con una o más bases con uno o más tampones. En una realización, puede producirse un tampón en el caldo o medio o separadamente y usarse como ingrediente haciendo reaccionar al menos parcialmente en ácido o base con una base o un ácido, respectivamente. Cuando se utiliza más de un modificador del pH, pueden añadirse al mismo tiempo o en momentos diferentes. En una realización, se combinan uno o más ácidos y una o más bases, dando como resultado un tampón. En una realización, los componentes de los medios, tales como una fuente de carbono o una fuente de nitrógeno, sirven como modificador del pH; los componentes de medios adecuados incluyen aquellos con alto o bajo pH o aquellos con capacidad tamponadora. Los componentes de medios ejemplares incluyen polisacáridos vegetales hidrolizados con ácido o base que tienen ácido o base residual, material vegetal tratado con explosión de fibra con amoníaco (AFEX) con amoníaco, ácido láctico, sólidos o líquido de maceración del maíz residuales.

El término «fermentación», como se usa en la presente memoria, tiene su significado ordinario conocido por los especialistas en la materia y puede incluir el cultivo de un microorganismo o grupo de microorganismos en o sobre un medio adecuado para los microorganismos. Los microorganismos pueden ser aerobios, anaerobios, anaerobios facultativos, heterótrofos, autótrofos, fotoautótrofos, fotoheterótrofos, quimioautótrofos y/o quimioheterótrofos. Los microorganismos pueden crecer aeróbica o anaeróbicamente. Pueden estar en cualquier fase de crecimiento, incluyendo de latencia (o conducción), exponencial, de transición, estacionaria, de muerte, inactiva, vegetativa, esporulativa, etc.

40 «Fase de crecimiento», se usa en la presente memoria para describir el tipo de crecimiento celular que ocurre después de la «fase de iniciación» y antes de la «fase estacionaria» y la «fase de muerte». Se hace referencia a veces a la fase de crecimiento como la fase exponencial o fase logarítmica.

El término «polisacárido vegetal», como se usa en la presente memoria, tiene su significado ordinario conocido por los especialistas en la materia y puede comprender uno o más polímeros de sacáridos y derivados de sacáridos así como derivados de polímeros de sacáridos y/u otros materiales poliméricos que aparecen en la materia vegetal. Los polisacáridos vegetales ejemplares incluyen lignina, celulosa, almidón, pectina y hemicelulosa. Son otros quitina, polisacáridos sulfonados tales como ácido alginico, agarosa, carragenano, porfirano, furcelerano y funorano. Generalmente, el polisacárido puede tener dos o más unidades de sacárido o derivados de las unidades de sacárido, mientras que un oligosacárido puede tener 2 a 10 unidades de sacárido o derivados de unidades de sacárido. Las unidades de sacárido y/o derivados de unidades de sacárido pueden repetirse en un patrón regular, o de otro modo. Las unidades de sacárido pueden ser unidades de hexosa o unidades de pentosa, o combinaciones de estas. Los derivados de unidades de sacárido pueden ser alcoholes de azúcar, ácidos de azúcar, aminoazúcares, etc. Los polisacáridos pueden ser lineales, ramificados, reticulados o una mezcla de los mismos. Un tipo o clase de polisacárido puede estar reticulado con otro tipo o clase de polisacárido.

El término «sacáridos fermentables», como se usa en la presente memoria, tiene su significado ordinario conocido por los especialistas en la materia y puede incluir uno o más sacáridos y/o derivados de sacárido que pueden utilizarse como fuente de carbono por el microorganismo, incluyendo monómeros, dímeros y polímeros de estos compuestos, incluyendo dos o más de estos compuestos. En algunos casos, el organismo puede descomponer

estos polímeros, tal como por hidrólisis, antes de incorporar el material descompuesto. Los sacáridos fermentables ejemplares incluyen, pero sin limitación, glucosa, dextrosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, ramnosa, celobiosa, lactosa, sacarosa, maltosa y fructosa.

5 El término «sacarificación», como se usa en la presente memoria, tiene su significado ordinario conocido por los especialistas en la materia y puede incluir la conversión de polisacáridos vegetales en especie de menor peso molecular que pueden utilizarse por el organismo disponible. Para algunos organismos, esto incluiría la conversión en monosacáridos, disacáridos, trisacáridos y oligosacáridos de hasta aproximadamente 7 unidades monoméricas, así como cadenas de tamaño similar de derivados de sacárido y combinaciones de sacáridos y derivados de  
10 sacárido. Los términos «SSF» y «SHF» son conocidos por los especialistas en la materia; SSF significa sacarificación y fermentación simultáneas, o la conversión de polisacáridos u oligosacáridos en monosacáridos al mismo tiempo y en el mismo recipiente de fermentación, donde los monosacáridos se convierten en otro producto químico tal como etanol. «SHF» indica una separación física de los procesos de hidrólisis o sacarificación del polímero y fermentación.

15 El término «biomasa», como se usa en la presente memoria, tiene su significado ordinario conocido por los especialistas en la materia y puede incluir uno o más materiales biológicos que pueden convertirse en un biocombustible, producto químico u otro. La biomasa, como se usa en la presente memoria, es sinónima del término «carga de alimentación» e incluye jarabe de maíz, melazas, forraje, residuos agrícolas (tallos de maíz, hierba, paja, cáscaras de grano, bagazo, etc.), desechos animales (abono de ganado, aves de corral y cerdos), productos  
20 solubles de destilación secados (DDS), granos de destilación secados (DDG), productos solubles de destilación condensados (CDS), granos de destilación húmedos (DWG), granos de destilación secados con productos solubles (DDGS), materiales leñosos (madera o corteza, serrín, madera de tala y residuos de molienda), desechos municipales (papel de desecho, papel higiénico reciclado, residuos de poda, etc.) y cultivos energéticos (álamos, saucos, eucalipto, pasto aguja, alfalfa, hierba de tallo azul, algas incluyendo macroalgas, etc.). Es una fuente  
25 ejemplar de biomasa la materia vegetal. La materia vegetal puede ser, por ejemplo, materia vegetal leñosa, materia vegetal no leñosa, material celulósico, material lignocelulósico, material hemicelulósico, carbohidratos, pectina, almidón, inulina, fructanos, glucanos, maíz, caña de azúcar, hierbas, pasto aguja, sorgo, sorgo de alta biomasa, bambú, algas y material derivado de estas. Las plantas pueden estar en su estado natural o modificadas genéticamente, p. ej. para aumentar la porción celulósica o hemicelulósica de la pared celular, o para producir  
30 enzimas exógenas o endógenas adicionales para aumentar la separación de los componentes de la pared celular. La materia vegetal puede describirse adicionalmente por referencia a las especies químicas presentes, tales como proteínas, polisacáridos y aceites. Los polisacáridos incluyen polímeros de diversos monosacáridos y derivados de monosacáridos, incluyendo glucosa, fructosa, lactosa, ácido galacturónico, ramnosa, etc. La materia vegetal incluye  
35 también subproductos de desecho agrícolas o corrientes secundarias tales como orujo, líquido de maceración del maíz, sólidos de maceración del maíz, granos de destilación, peladuras, huesos, desechos de fermentación, paja, maderas, aguas residuales, basura y sobras alimentarias. Las peladuras pueden ser cítricas incluyendo, pero sin limitación, peladura de mandarina, peladura de pomelo, peladura de naranja, peladura de mandarina, peladura de lima y peladura de limón. Estos materiales pueden proceder de granjas, bosques, fuentes industriales, hogares, etc.  
40 Es otro ejemplo no limitante de biomasa la materia animal incluyendo, por ejemplo, leche, carne, grasa, desechos de procesamiento animal y desechos animales. La biomasa puede incluir cultivos celulares o tisulares; por ejemplo, la biomasa puede incluir un cultivo o cultivos de células vegetales o un cultivo o cultivos de tejido vegetal. «Carga de alimentación» se usa frecuentemente para hacer referencia a la biomasa que se usa para un proceso, tal como los descritos en la presente memoria.

45 «Caldo» se usa en la presente memoria para hacer referencia a medio inoculado en cualquier etapa de crecimiento, incluyendo el punto inmediatamente después de la inoculación y el periodo después de cesar cualquiera o todas las actividades celulares, y puede incluir el material después de procesamiento después de fermentación. Incluye todos los contenidos de la combinación de materia soluble e insoluble, materia suspendida, células y medio, de acuerdo  
50 con sea apropiado.

El término «productividad», como se usa en la presente memoria, tiene su significado ordinario conocido por los especialistas en la materia y puede incluir la masa de un material de interés producido en un tiempo dado en un volumen dado. Las unidades pueden ser, por ejemplo, gramos por litro y hora, o alguna otra combinación de masa,  
55 volumen y tiempo. En la fermentación, la productividad se usa frecuentemente para caracterizar lo rápido que puede elaborarse un producto en un volumen de fermentación dado. El volumen puede referenciarse al volumen total del recipiente de reacción, el volumen de trabajo del recipiente de fermentación o el volumen real de caldo que está fermentando. El contexto de la frase indicará el significado pretendido a un especialista en la materia. La productividad es diferente del «título» en que la productividad incluye un término temporal, y el título es análogo a la  
60 concentración. Título y productividad pueden medirse generalmente en cualquier momento durante la fermentación,

tal como al inicio, el final o en algún momento intermedio, relacionándose el título con la cantidad de un material particular presente o producido en el punto temporal de interés en una cantidad de tiempo dada. La cantidad de tiempo usada en la determinación de la productividad puede ser desde el inicio de la fermentación o desde algún otro momento, e ir hasta el final de la fermentación, tal como cuando no se produce material adicional o cuando ocurre la recolección, o algún otro momento como se indica por el contexto de uso del término. «Productividad global» hace referencia a la productividad determinada utilizando el título final y el tiempo de fermentación global.

«Título» hace referencia a la cantidad de un material particular presente en un caldo de fermentación. Es similar a la concentración y puede hacer referencia a la cantidad de material elaborado por el organismo en el caldo de todos los ciclos de fermentación, o la cantidad de material elaborado en el ciclo de fermentación actual o durante un periodo dado de tiempo, o la cantidad de material presente de cualquier fuente, tal como el producido por el organismo o añadido al caldo. Frecuentemente, el título de las especies solubles se referenciará a la porción líquida del caldo, con los productos insolubles retirados, y el título de las especies insolubles se referenciará a la cantidad total de caldo estando las especies insolubles presentes, sin embargo, el título de especies solubles puede referenciarse al volumen de caldo total y el título de especies insolubles puede referenciarse a la porción líquida, indicando el contexto en qué sistema se usa con ambos sistemas de referencia pretendidos en algunos casos. Frecuentemente, el valor determinado referenciado a un sistema será el mismo o una aproximación suficiente del valor referenciado a otro.

«Concentración», cuando se hace referencia al material en el caldo, hace referencia generalmente a la cantidad de material presente de todas las fuentes, tanto elaborado por el organismo como añadido al caldo. La concentración puede hacer referencia a especies solubles o especies insolubles, y se referencia a la porción líquida del caldo o al volumen total del caldo, como para «título».

El término «biocatalizador», como se usa en la presente memoria, tiene su significado ordinario conocido por los especialistas en la materia y puede incluir una o más enzimas y/o microorganismos, incluyendo soluciones, suspensiones y mezclas de enzimas y microorganismos. En algunos contextos, esta palabra hará referencia al posible uso de enzimas o bien microorganismos para servir para una función particular, en otros contextos, la palabra hará referencia al uso combinado de los dos, y en otros contextos la palabra hará referencia a solo uno de los dos. El contexto de la frase indicará el significado pretendido para un especialista en la materia.

Los términos «eficiencia de conversión» o «rendimiento», como se usan en la presente memoria, tienen su significado ordinario conocido por los especialistas en la materia y pueden incluir la masa de producto elaborado a partir de una masa de sustrato. El término puede expresarse como rendimiento porcentual del producto a partir de una masa de sustrato de partida. Para la producción de sacáridos C5 y C6 (p. ej., monosacáridos, p. ej. glucosa, xilosa, arabinosa, etc.) o polímeros de sacárido solubles (p. ej., polímeros que comprenden dos o más unidades o residuos de sacárido), el rendimiento está basado en el peso real de los sacáridos liberados en comparación con el peso de los oligosacáridos o polisacáridos (p. ej., celulosa, hemicelulosa) en la biomasa de entrada. Para la producción de etanol a partir de glucosa, la reacción neta se acepta generalmente como:



y la eficiencia de conversión máxima teórica, o rendimiento, es de 51 % (en peso). Frecuentemente, la eficiencia de conversión se referenciará al máximo teórico, por ejemplo «80 % del máximo teórico». En el caso de conversión de glucosa en etanol, esta afirmación indicaría una eficiencia de conversión del 41 % (en peso). El contexto de la frase indicará el sustrato y producto pretendidos a un especialista en la materia.

Para sustratos (p. ej., una composición de biomasa) que comprenden una mezcla de diferentes fuentes de carbono (p. ej. xilano, xilosa, glucosa, celobiosa, arabinosa, celulosa, hemicelulosa, etc.), la eficiencia de conversión máxima teórica de la biomasa en sacáridos o etanol puede calcularse como la media de los rendimientos máximos o eficiencias de conversión de los constituyentes fuentes de carbono individuales ponderados por la concentración relativa de cada fuente de carbono. En algunos casos, la eficiencia de conversión máxima teórica puede calcularse basándose en una eficiencia de sacarificación supuesta. Solo a modo de ejemplo, dada una fuente de carbono que comprende 10 g de celulosa, la eficiencia de conversión máxima teórica puede calcularse suponiendo una sacarificación de la celulosa en fuente de carbono asimilable (glucosa) de aproximadamente 75 % en peso. En este ejemplo, 10 g de celulosa pueden proporcionar 7,5 g de glucosa que pueden proporcionar una eficiencia de conversión teórica máxima de aproximadamente 7,5 g x 51 % o 3,8 g de etanol. En otro aspecto, la fuente de carbono asimilable puede ser un azúcar o polímero u oligómero de sacárido que contiene múltiples residuos o unidades de sacárido. En este aspecto, suponiendo una eficiencia de conversión teórica máxima de aproximadamente 75 % en peso, una fuente de carbono que comprende 10 g de un polisacárido puede proporcionar

7,5 g de polímeros de azúcar que pueden hidrolizarse y/o fermentarse adicionalmente usando un biocatalizador y/o enzimas exógenas. En otros casos, la eficiencia de la etapa de sacarificación puede calcularse o determinarse basándose en una medida del contenido de azúcares de una biomasa de entrada, p. ej. después de hidrólisis con ácido sulfúrico al 72 %. Véase A Sluiter, y *col.*, Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass (NREL, revisado en junio de 2010). Las eficiencias de sacarificación previstas por la presente invención incluyen aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o aproximadamente 100 % para cualquier fuente de carbono carbohidratada mayor que una única subunidad de monosacárido.

«Pretratamiento» o «pretratado» se usa en la presente memoria para hacer referencia a cualquier proceso mecánico, químico, térmico, bioquímico o combinación de estos procesos, tanto en una etapa combinada como efectuado secuencialmente, que consigue la perturbación o expansión de la biomasa para volver la biomasa más susceptible al ataque por enzimas y/o microbios. En una realización, el pretratamiento incluye la retirada o perturbación de lignina para hacer más disponibles los polímeros de celulosa y hemicelulosa en la biomasa vegetal a las enzimas y/o microbios celulolíticos y/o hemicelulolíticos, por ejemplo mediante tratamiento con ácido o base. En una realización, el pretratamiento incluye la perturbación o expansión de material celulósico y/o hemicelulósico. La explosión de vapor y expansión (o explosión) de fibra con amoníaco (AFEX) son técnicas térmicas/químicas bien conocidas. Puede usarse hidrólisis, incluyendo procedimientos que utilizan ácidos, bases y/o enzimas. Puede usarse también otras técnicas térmicas, químicas, bioquímicas y enzimáticas.

«Alimentado por lotes» o «fermentación alimentada por lotes» se usa en la presente memoria para incluir procedimientos de cultivo de microorganismos en que los nutrientes, otros componentes del medio o biocatalizadores (incluyendo, por ejemplo, enzimas, organismos recientes, caldo extracelular, plantas y/u organismos modificados genéticamente, etc.) se suministran al fermentador durante el cultivo, pero el caldo de cultivo no se recolecta del fermentador hasta el final de la fermentación, aunque pueden incluirse también técnicas de «autosiembra» o «recolección parcial» en que se recoge una porción del volumen de fermentador y se añade entonces medio reciente al caldo restante en el fermentador, siendo al menos una porción del inóculo el caldo que se dejó en el fermentador. Durante una fermentación alimentada por lotes, el volumen de caldo puede aumentar, al menos durante un periodo, al añadir medio o nutrientes al caldo mientras están presentes organismos de fermentación. Los nutrientes adecuados que pueden utilizarse incluyen aquellos que son solubles, insolubles y parcialmente solubles, incluyendo gases, líquidos y sólidos. En una realización, se hace referencia a un proceso alimentado por lotes con una frase tal como «alimentado por lotes con aumento celular». Esta frase puede incluir una operación en que se añaden nutrientes y células o una en que se añaden células sin una cantidad sustancial de nutrientes. La frase más general «alimentado por lotes» engloba estas operaciones también. El contexto en que se use cualquiera de estas frases indicará a un especialista en la materia las técnicas que se están considerando.

«Compuestos sacáridos» o «corrientes de sacárido» se usan en la presente memoria para indicar principalmente sacáridos monosacáridos disueltos, cristalizados, evaporados o parcialmente disueltos, incluyendo pero sin limitación hexosas y pentosas; alcoholes de azúcar; ácidos de azúcar; aminos de azúcar; compuestos que contienen dos o más de estos ligados directa o indirectamente mediante enlaces covalentes o iónicos y mezclas de los mismos. Se incluyen en esta descripción disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y cadenas sacáridas ramificadas y/o lineales de cualquier longitud. Una corriente de sacárido puede consistir principal o sustancialmente en sacáridos C6, sacáridos C5 o mezclas tanto de sacáridos C6 como C5 en relaciones variables de dichos sacáridos. Los sacáridos C6 tienen un esqueleto molecular de 6 carbonos y los sacáridos C5 tienen un esqueleto molecular de 5 carbonos.

«Oligómero de sacárido» se usa en la presente memoria para indicar un sacárido que contiene de 2 a 10 residuos o unidades de sacárido o derivados de unidades de sacárido. En una realización, un oligómero de sacárido puede ser soluble. En una realización, un oligómero de sacárido puede ser soluble en un medio acuoso. En algunas realizaciones, el oligómero de sacárido comprende de 2 a 10 o 2 a 9, 2 a 8, 2 a 7, 2 a 6, 2 a 5, 2 a 4 o 2 a 3 residuos o unidades de sacárido, o entre 2 y 5 unidades de sacárido. En algunas realizaciones, el oligómero de sacárido comprende más de 2 residuos de sacárido. En algunas realizaciones, los oligómeros de sacárido comprenden 2 residuos de sacárido. En algunas realizaciones, los oligómeros de sacárido comprenden menos de 10 residuos de sacárido. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido comprenden 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos o unidades de sacárido.

«Polímero de sacárido» se usa en la presente memoria para indicar un sacárido que contiene dos o más residuos o unidades de sacárido o derivados de unidades de sacárido. En una realización, un polímero de sacárido puede ser soluble. En una realización, un polímero de sacárido puede ser soluble en un medio acuoso. En algunas realizaciones, el polímero de sacárido comprende de 2 a 10 residuos o unidades de sacárido. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido comprenden de 2 a 10 o 2 a 20, 2 a 30, 2 a 40, 2 a 50, 2 a 60, 2 a 70, 2 a

80, 2 a 90, o 2 a 100 residuos o unidades de sacárido. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido comprenden más de 2 residuos de sacárido. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido comprenden 2 residuos de sacárido. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido comprenden menos de 10 residuos de sacárido. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido comprenden más de 10 residuos de sacárido. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido comprenden más de 100 residuos de sacárido. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido comprenden más de 200 residuos de sacárido. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido comprenden más de 300 residuos de sacárido. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido comprenden más de 10 y menos de 100 residuos de sacárido. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido comprenden entre 10 y 100 residuos de sacárido. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido comprenden de 10 a 100 residuos de sacárido. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido comprenden de 10 a 100 residuos de sacárido. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido comprenden entre 10 y 100 residuos de sacárido. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido comprenden de 10 a 100 residuos de sacárido.

#### Descripción

La siguiente descripción y ejemplos ilustran algunas realizaciones ejemplares de la divulgación con detalle. Los especialistas en la materia reconocerán que hay numerosas variaciones y modificaciones de esta divulgación que están englobadas por su alcance. Por consiguiente, la descripción de una cierta realización ejemplar no debería considerarse que limite el alcance de la presente divulgación.

#### Introducción

Muchos de los procedimientos usados para hacer más accesibles la hemicelulosa y celulosa de biomasa pueden generar compuestos inhibidores que pueden afectar negativamente al procesamiento posterior, tal como sacarificación y/o fermentación. Existe la necesidad de un proceso de pretratamiento que proporcione una fracción de biomasa que sea accesible a la hidrólisis enzimática efectiva sin la formación o liberación de grandes volúmenes de inhibidores.

Algunos procedimientos usados en el pretratamiento de biomasa utilizan altas temperaturas, presiones y/o vapor sin un resultado altamente satisfactorio para extraer la mayoría o todos los carbohidratos en la biomasa. Puede usarse pretratamiento alcalino, pero puede ser costoso debido al alto volumen de agua que puede ser necesario para aclarar la biomasa. Puede usarse hidrólisis ácida para extraer y reducir la hemicelulosa y celulosa a sacáridos C5 y C6. Debido a que el proceso usa ácido, el equipo de proceso, tales como bombas y tuberías, debe ser resistente a la corrosión y puede ser más caro que los usados para procesar granos. Este proceso puede generar también subproductos de neutralización, tales como sulfato de calcio o yeso, que pueden tener que aislarse y desecharse. Los procesos descritos pueden producir también inhibidores que pueden ser difíciles de retirar y pueden afectar negativamente el proceso de fermentación.

Se han investigado también procedimientos de pretratamiento de biomasa para evitar el procesamiento ácido. Pro ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.846.787 divulga un proceso en que se pretrata material que contiene celulosa combinando el material con agua en un reactor y calentando la combinación resultante a una temperatura de 160 °C a 220 °C manteniendo el pH de 5 a 8. El material resultante puede hidrolizarse entonces usando enzimas. Sin embargo, este proceso solo funciona en materiales herbáceos y biomasa que se ha preprocesado (aguas residuales municipales, materiales reciclados, etc.). Puede no funcionar bien en una biomasa leñosa. Además, los procedimientos anteriores dan como resultado solo suspensiones que deben diluirse significativamente para ser manejables. Y los procesos ácido y de explosión de vapor pueden estar limitados al 8 a 15 % en peso de los sólidos basado en el peso total de la suspensión.

Los procesos descritos anteriormente se diseñan para hacer accesibles los polímeros carbohidratados a la hidrólisis enzimática para producir monómeros, tanto si la adición de enzimas está separada de la fermentación posterior a biocombustibles y productos químicos como si hay una sacarificación y fermentación simultáneas mediante adición enzimática aislada y/o acción enzimática microbiana en la conversión de polímeros en producto final. Además, las cargas de enzima necesarias para hidrolizar tales materiales procesados imperfectamente pueden ser altas y por lo tanto costosas. A pesar de las altas cargas enzimáticas, los inhibidores liberados durante el pretratamiento pueden interferir con la hidrólisis enzimática y fermentación simultánea o posterior.

#### Biomasa y pretratamiento de las composición de biomasa

10 Se divulgan en la presente memoria procedimientos de producción de composiciones que comprenden sacáridos C5 y/o C6 a partir de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa. Los procedimientos pueden comprender pretratamiento de la composición de biomasa y/o hidrólisis enzimática de la biomasa pretratada. El pretratamiento de la composición de biomasa puede reducir el tamaño de partícula sólida.

15 Reducir el tamaño de los sólidos de biomasa puede aumentar la eficiencia de otras etapas de procesamiento tales como tratamiento químico, tratamiento térmico y tratamiento enzimático. Una eficiencia aumentada puede significar que se requiere menos tiempo en otra etapa de procesamiento. Eficiencia aumentada puede significar que se produce un mayor rendimiento de un producto deseable tal como sacáridos C5 y/o C6 en otra etapa de procesamiento. Una eficiencia aumentada puede significar que se producen menos inhibidores en otra etapa de

20 procesamiento.

La biomasa puede derivar de cultivos agrícolas, residuos de cultivo, árboles, astillas, serrín, papel, cartón, hierbas, algas, desechos municipales y otras fuentes como se describen anteriormente. En una realización, la biomasa contiene material celulósico, hemicelulósico y/o lignocelulósico. En una realización, la biomasa es leñosa (álamo,

25 eucalipto, sauce, pino, etc.). En otra realización, la biomasa es material vegetal no leñoso, tal como hierbas, dicotiledóneas, monocotiledóneas, etc. Otras biomasa incluyen biomasa de algas, biomasa vegetal no vascular y materiales procesados derivados de plantas, p. ej. cáscaras, granos de destilación, aguas residuales municipales y similares.

30 En una realización, una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa comprende alfalfa, algas, bagazo, bambú, rastrojo de maíz, granos de maíz, mazorcas de maíz, pasta de maíz, líquido de maceración del maíz, sólidos de maceración del maíz, granos de destilería, productos solubles de destilería secados, granos de destilería secados, productos solubles de destilería condensados, granos de destilería húmedos, granos de destilería secados con productos solubles, eucalipto, desechos alimentarios, peladuras de fruta,

35 residuos de jardinería, hierba, cáscaras de grano, plantas de cultivo modificadas, desechos municipales, cáscaras de avena, papel, pulpa de papel, hierba de tallo azul, álamo, cáscaras de arroz, cáscaras de semilla, forraje, sorgo, paja, caña de azúcar, pasto aguja, trigo, paja de trigo, salvado de trigo, salvado de trigo desalmidonado, salsas, madera, células vegetales, cultivos de tejido vegetal, cultivos de tejido o una combinación de los mismos.

40 La celulosa puede ser un polímero lineal de glucosa en que las unidades de glucosa están conectadas a través de enlaces  $\beta(1\rightarrow4)$ . La hemicelulosa puede ser un polímero ramificado de una serie de monómeros de sacárido incluyendo glucosa, xilosa, manosa, galactosa, ramnosa y arabinosa, y puede tener ácidos de azúcar tales como ácido manurónico y ácido galacturónico presentes también. La lignina puede ser una macromolécula racémica reticulada de alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico. Estos tres polímeros pueden aparecer

45 juntos en materiales lignocelulósicos en la biomasa. Las diferentes características de los tres polímeros pueden hacer difícil la hidrólisis de la combinación, ya que cada polímero tiende a proteger a los demás del ataque enzimático.

Antes del pretratamiento de una composición de biomasa, puede ocurrir cierto procesamiento. Por ejemplo, pueden

50 retirarse residuos tales como suciedad, materia inerte (rocas, guijarros) y otro material no biológico por tamizado o clasificación de alguna manera. La composición de biomasa puede limpiarse por lavado con agua u otros productos químicos. La composición de biomasa puede secarse. La composición de biomasa puede procesarse mecánicamente (p. ej., cortarse o triturarse en bruto) para reducir el tamaño de cualquier sólido antes del tratamiento. La cantidad de procesamiento mecánico antes del pretratamiento puede depender de la biomasa. Por

55 ejemplo, los materiales leñosos pueden astillarse, cortarse, molerse y triturarse antes o reducirse de tamaño de otra forma antes del pretratamiento. En una realización, los materiales leñosos se reducen de tamaño a aproximadamente 1 cm o menos antes del pretratamiento. En otra realización, los materiales leñosos se reducen a menos de 0,5 cm antes del pretratamiento. En otro ejemplo, los residuos agrícolas (p. ej., rastrojo de maíz, trigo, paja, etc.) pueden cortarse, trocearse, fragmentarse o reducirse de tamaño de otra forma antes del pretratamiento.

60 En una realización, los residuos agrícolas se reducen de tamaño a menos de 10 cm de longitud antes del

pretratamiento. En otra realización, los residuos agrícolas se reducen de tamaño a menos de 5 cm de longitud antes del pretratamiento.

En algunas realizaciones, el tamaño de partícula de biomasa preferida para suspender varía dependiendo de una serie de factores, incluyendo: la composición del material de biomasa, la composición del material hidrocarburo líquido, la velocidad del material hidrocarburo líquido, la temperatura y presión de la suspensión, el material del conducto (p. ej., tubería o tanque) que mantiene la suspensión, la cantidad de tiempo que la suspensión va a permanecer junta y consideraciones similares. En una realización, la suspensión del material de biomasa y material hidrocarburo líquido está contenida en una tubería en una refinería y el material de biomasa puede considerarse portado eficientemente por el material hidrocarburo líquido a condición de que la tubería no se obstruya sustancialmente después de uso continuado.

Los consumidores de corrientes de sacárido producidas a partir de biomasa tienen una variedad de necesidades respecto a la pureza y concentración de los sacáridos. En general, cuanto más reducida sea la concentración de inhibidor, más fermentables son los sacáridos. Los sacáridos purificados pueden usarse para producir productos finales de fermentación limpios concentrados tales como ácido succínico, que se usa como precursor para la fabricación de plástico. Para satisfacer un amplio intervalo de consumidores de sacáridos, debe controlarse la cantidad de sacáridos C5 y C6 que entra en cada lote para distribución. La capacidad de solubilizar casi todos los sacáridos C5 en el pretratamiento es el único modo de separar las corrientes eficientemente. Un pretratamiento que da como resultado un tamaño de partícula fina homogénea (uniforme) permite la solubilización de más del 85 % de la hemicelulosa disponible antes de la hidrólisis enzimática. Esto reduce la evaporación necesaria para conseguir una corriente de C5 concentrada y, por lo tanto, reduce los productos fenólicos y otros inhibidores presentes en el sistema, haciendo la corriente de C5 más fermentable que lo que podría conseguirse por la mala solubilización de la hemicelulosa durante el pretratamiento. Cuando se reduce el tamaño de partícula, la cocción del material durante el pretratamiento es mucho más uniforme. Con material heterogéneo, algunas partículas se subcucen y algunas se sobrecucen. A medida que el tamaño de partícula se vuelve más homogéneo o uniforme, puede optimizarse la cocción por todo el sistema. Este calentamiento regular previene la carbonización del material, que puede conducir a pérdidas significativas de sacáridos y una producción mayor de inhibidores. El calor uniforme por toda la biomasa previene también la subcocción que puede conducir a celulosa no hidrolizada durante la hidrólisis enzimática.

Pretratar una composición de biomasa puede comprender procesos mecánicos, térmicos, de presión, químicos, termoquímicos y/o bioquímicos. Estos procesos pueden efectuarse individualmente o en combinación. El pretratamiento de la composición de biomasa puede efectuarse de tal modo que cualquier sólido se reduzca en tamaño. Reducir el tamaño de los sólidos en la composición de biomasa puede ser ventajoso debido a que las partículas más pequeñas tienen mayores relaciones de área superficial a volumen. Aumentar la relación de área superficial a volumen puede ser ventajoso debido a que puede, por ejemplo, aumentar la tasa de humectación de partícula (p. ej., con agua o un agente químico tal como un ácido o una base), aumentar la accesibilidad de las enzimas a los polisacáridos en la biomasa, posibilitar el uso de una dosis menor de enzimas durante una hidrólisis de la biomasa, posibilitar el uso de cantidades menores o más bajas de productos químicos (p. ej., ácidos o bases) durante una etapa de pretratamiento y/o hidrólisis, posibilitar el uso de ácidos o bases más débiles en una etapa de pretratamiento o hidrólisis, posibilitar el uso de mayores concentraciones de sólidos en cualquier etapa de procesamiento posterior (p. ej., durante una etapa de hidrólisis) y/o aumentar el rendimiento de sacáridos a partir de la hidrólisis de biomasa.

Las composiciones de biomasa pueden reducirse en tamaño a una mezcla de partículas que tienen un tamaño uniforme, o sustancialmente uniforme. Puede hacerse referencia a tales mezclas como mezclas homogéneas o mezclas uniformes. Las mezclas homogéneas de partículas pueden tener muchas ventajas frente a las mezclas de partículas que tienen tamaños heterogéneos con respecto a procesos de pretratamiento posteriores y/o durante la hidrólisis para producir corrientes de sacárido. El tamaño puede hacer referencia a las dimensiones de tamaño. Las dimensiones de tamaño hacen referencia a la longitud, anchura o altura de una partícula o partícula sólida. La dimensión de tamaño hace referencia también al diámetro de una partícula o partícula sólida. Por ejemplo, las mezclas heterogéneas de partículas pueden experimentar un calentamiento irregular durante las etapas de procesamiento térmico y termoquímico. El calentamiento irregular puede conducir a supercocción (p. ej., carbonización/combustión) de partículas y/o a la subcocción de partículas. La carbonización o combustión de partículas puede reducir el rendimiento de sacáridos a partir de la hidrólisis de las partículas; esto puede deberse a la degradación o desnaturalización de los polímeros de sacárido tales como almidón, hemicelulosa y/o celulosa. La subcocción de partículas puede conducir a polímeros de sacárido no hidrolizados (p. ej., almidón, hemicelulosa, celulosa) durante la hidrólisis enzimática o química, que también puede reducir el rendimiento de sacárido. En contraposición, pueden conseguirse un calentamiento, humectación, tratamiento químico (p. ej., tratamiento ácido o básico) y/o hidrólisis enzimática uniformes con mezclas de partículas que tienen tamaños uniformes (p. ej., mezclas

homogéneas). En una realización, el pretratamiento de composiciones de biomasa usando los procedimientos como se describen en la presente memoria produce mezclas de partículas con tamaños uniformes u homogéneos. En una realización, la mezcla de partículas con tamaños uniformes u homogéneos puede hidrolizarse usando cargas enzimáticas menores o reducidas.

5

En una realización, se proporcionan procedimientos para el pretratamiento de biomasa usada en la producción de corrientes de sacárido y/o la producción de productos finales de fermentación, tales como biocombustibles y productos químicos.

- 10 En una realización, se proporcionan procedimientos para el pretratamiento de carga de alimentación usada en la fermentación y producción de biocombustibles y productos químicos. Las etapas de pretratamiento pueden incluir pretratamiento de pruebas mecánicas, térmicas, de presión, químicas, termoquímicas y/o bioquímicas antes de usarse en un bioproceso para la producción de combustibles y productos químicos, pero puede usarse también en el proceso material de biomasa no tratado. Los procesos mecánicos pueden reducir el tamaño de partícula del material
- 15 de biomasa de modo que pueda manejarse más convenientemente en el bioproceso y pueda aumentar el área superficial de la carga de alimentación para facilitar el contacto con productos químicos/productos bioquímicos/biocatalizadores. Los procesos mecánicos pueden también separar un tipo de material de biomasa de otro. El material de biomasa puede someterse también a pretratamientos térmicos y/o químicos para volver los polímeros vegetales más accesibles. Pueden usarse también múltiples etapas de tratamiento. Los procesos
- 20 mecánicos incluyen, sin limitación, lavado, empapado, molienda, reducción del tamaño, cribado, cizallamiento, troceamiento, presurización y similares, así como procesos de clasificación por tamaño y clasificación por densidad. Puede usarse cualquier proceso que reduzca el tamaño de la carga de alimentación a una mezcla homogénea o uniforme de partículas de menos de 1,5 mm o 1 mm de tamaño (p. ej., diámetro o longitud, anchura o altura). Es uno de dichos procedimientos usar un generador de vórtice y un sistema de corte tales como los encontrados en las
- 25 solicitudes de patente de EE. UU. n.º 2002192774A1, 2012037325A1 y 2011275860A1.

- En una realización, se transporta biomasa a un mezclador de vórtice equipado con cuchillas. Se dispersa agua con o sin uno o más ácidos, bases u otros productos químicos (p. ej., ácido sulfúrico diluido) con estos sólidos en una
- 30 mezcla de 5 % de sólidos a 95 % de agua a aproximadamente 50 °C. Se pretende que el vórtice arrastre los materiales mientras se ajusta el pH y se mantiene la temperatura. El material se deposita en una segunda cámara donde tiene lugar la deshidratación hasta que la carga de alimentación es un tapón. El tapón de carga de alimentación pasa entonces a través de otras cuchillas con microperforaciones. Se añade vapor para mantener calor y presión y se mantiene el tapón a temperaturas regulares de 160 a 180 °C y cocción y mezclado concienzudos durante un periodo de tiempo a medida que se empuja a través de una tubería. Al final de la tubería, se somete el
- 35 material a explosión de vapor y se recoge en un contenedor donde se añade agua a una relación de sólido a líquido deseada.

- Los procesos de pretratamiento químico incluyen, pero sin limitación, blanqueamiento, oxidación, reducción, tratamiento ácido, tratamiento básico, tratamiento con sulfito, tratamiento con sulfito ácido, tratamiento con sulfito
- 40 básico, tratamiento con amoníaco e hidrólisis. Los procesos de pretratamiento térmicos incluyen, pero sin limitación, esterilización, expansión o explosión de fibra con amoníaco («AFEX»), explosión de vapor, mantenimiento a temperaturas elevadas, presurizado o no presurizado, en presencia o ausencia de agua y congelación. Los procesos bioquímicos incluyen, pero sin limitación, tratamiento con enzimas, incluyendo enzimas producidas por plantas modificadas genéticamente, y tratamiento con microorganismos. Las diversas enzimas que pueden utilizarse
- 45 incluyen celulasa, amilasa,  $\beta$ -glucosidasa, xilanasas, gluconasa y otras polisacaridas; lisozima; lacasa y otras enzimas modificadoras de lignina; lipoxigenasa, peroxidasa y otras enzimas oxidativas; proteasas y lipasas. Uno o más de los procesos mecánicos, químicos, térmicos, termoquímicos y bioquímicos pueden combinarse o usarse separadamente. Tales procesos combinados pueden incluir también aquellos usados en la producción de papel, productos de celulosa, celulosa microcristalina y productos celulósicos y pueden incluir pulpeo, pulpeo Kraft y
- 50 procesamiento con sulfito ácido. La carga de alimentación puede ser una corriente secundaria o corriente de desecho de una instalación que utiliza uno o más de estos procesos en un material de biomasa, tal como material celulósico, hemicelulósico o lignocelulósico. Los ejemplos incluyen plantas de papel, plantas celulósicas, plantas de destilación, plantas de procesamiento de algodón y plantas de celulosa microcristalina. La carga de alimentación puede incluir también materiales de desecho que contienen celulosa o que contienen productos celulósicos. La
- 55 carga de alimentación puede ser también materiales de biomasa, tales como madera, hierbas, maíz, almidón o sacárido, producidos o recolectados como carga de alimentación pretendida para la producción de etanol u otros productos tales como biocatalizadores.

- Un procedimiento puede utilizar un proceso de pretratamiento divulgado en las patentes de EE. UU. y solicitudes de
- 60 patente US20040152881, US20040171136, US20040168960, US20080121359, US20060069244, US20060188980,

US20080176301, 5693296, 6262313, US20060024801, 5969189, 6043392, US20020038058, US5865898, US5865898, US6478965, 5986133 o US20080280338.

5 En otra realización, se usa el proceso AFEX para el pretratamiento de biomasa. El proceso AFEX puede usarse en la preparación de materiales celulósicos, hemicelulósicos o lignocelulósicos para fermentación a etanol u otros productos. El proceso incluye generalmente combinar la carga de alimentación con amoníaco, calentar bajo presión y liberar súbitamente la presión. El agua puede estar presente en diversas cantidades. El proceso AFEX ha sido sujeto de numerosas patentes y publicaciones.

10 En otra realización, el pretratamiento de biomasa comprende la adición de hidróxido de calcio a una biomasa para volver la biomasa susceptible de degradación. El pretratamiento comprende la adición de hidróxido de calcio y agua a la biomasa para formar una mezcla, y el mantenimiento de la mezcla a una temperatura relativamente alta. Como alternativa, puede añadirse un agente oxidante, seleccionado de entre el grupo consistente en oxígeno y gases que contienen oxígeno, bajo presión a la mezcla. Se divulgan ejemplos de tratamientos con hidróxido de carbono en la  
15 patente de EE. UU. n.º 5865898 de Holtzaple y S. Kim y M. T. Holtzaple, Bioresource Technology, 96, (2005) 1994.

En una realización, el pretratamiento de biomasa comprende hidrólisis con ácido diluido. Se divulgan ejemplos de tratamiento de hidrólisis con ácido diluido en T. A. Lloyd y C. E. Wyman, Bioresource Technology, (2005) 96, 1967).

20 En otra realización, el pretratamiento de biomasa comprende tratamiento con agua caliente líquida a pH controlado. Se divulgan ejemplos de tratamientos con agua caliente líquida a pH controlado en N. Mosier y *col.*, Bioresource Technology, (2005) 96, 1986.

En una realización, el pretratamiento de biomasa comprende el proceso de reciclado de amoníaco acuoso (ARP). Se describen ejemplos de proceso de reciclado de amoníaco acuoso en T. h. Kim e Y. Y. Lee, Bioresource Technology, (2005) 96, 2007.

En una realización, los procedimientos anteriormente mencionados tienen dos etapas: una etapa de pretratamiento que conduce a una corriente de lavado y una etapa de hidrólisis enzimática de biomasa pretratada que produce una  
30 corriente de hidrolizado. En los procedimientos anteriores, el pH al que se lleva a cabo la etapa de pretratamiento incluye hidrólisis ácida, pretratamiento con agua caliente, explosión de vapor o procedimientos basados en reactivos alcalinos (AFEX, ARP y pretratamientos con cal). Los procedimientos de tratamiento con ácido diluido y agua caliente solubilizan la mayoría de la hemicelulosa, mientras que los procedimientos que emplean reactivos alcalinos retiran la mayoría de lignina durante la etapa de pretratamiento. Como resultado, la corriente de lavado de la etapa  
35 de pretratamiento en los procedimientos anteriores contiene en su mayoría sacáridos basados en hemicelulosa, mientras que esta corriente tiene en su mayoría lignina para los procedimientos de alto pH. La hidrólisis enzimática posterior de la biomasa residual conduce a sacáridos mixtos (C5 y C6) en los procedimientos de pretratamiento basados en bases, mientras que la glucosa es el producto principal en el hidrolizado de los procedimientos de pH bajo y neutro. En una realización, el material tratado se trata adicionalmente con catalasa u otro producto químico  
40 similar, agentes quelantes, tensioactivos y otros compuestos para retirar impurezas o productos químicos tóxicos o liberar adicionalmente polisacáridos.

En una realización, el pretratamiento de biomasa comprende pretratamiento líquido iónico (IL). La biomasa puede pretratarse por incubación con un líquido iónico, seguido de extracción de IL con un disolvente de lavado tal como  
45 alcohol o agua. La biomasa tratada puede separarse entonces de la solución de líquido iónico/disolvente de lavado por centrifugación o filtración, y enviarse al reactor o recipiente de sacarificación. Se divulgan ejemplos de pretratamiento con líquido iónico en la publicación de EE. UU. n.º 2008/0227162.

Un procedimiento puede utilizar un proceso de pretratamiento divulgado en la patente de EE. UU. n.º 4600590 de Dale, la patente de EE. UU. n.º 4644060 de Chou, la patente de EE. UU. n.º 5037663 de Dale, la patente de EE. UU. n.º 5171592 de Holtzaple, y *col.*, la patente de EE. UU. n.º 5939544 de Karstens, y *col.*, la patente de EE. UU. n.º 5473061 de Bredereck, y *col.*, la patente de EE. UU. n.º 6416621 de Karstens., la patente de EE. UU. n.º 6106888 de Dale, y *col.*, la patente de EE. UU. n.º 6176176 de Dale, y *col.*, la publicación PCT WO2008/020901 de Dale, y *col.*, Felix, A., y *col.*, Anim. Prod. 51,47-61 (1990), Wais, A.C., Jr., y *col.*, Journal of Animal Science, 35, n.º 1, 109-  
55 112 (1972).

La alteración del pH de una carga de alimentación pretratada puede lograrse lavando la carga de alimentación (p. ej. con agua) una o más veces para retirar una sustancia alcalina o ácida, u otra sustancia usada o producida durante el pretratamiento. El lavado puede comprender exponer la carga de alimentación pretratada a un volumen igual de  
60 agua 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más veces. En otra

realización, puede añadirse un modificador del pH. Por ejemplo, puede añadirse un ácido, un tampón o un material que reaccione con otros materiales presentes para modular el pH de la carga de alimentación. En una realización, puede usarse más de un modificador del pH, tal como una o más bases, una o más bases con uno o más tampones, uno o más ácidos, uno o más ácidos con uno o más tampones, o uno o más tampones. Cuando se utilizan más de 5 un modificador del pH, pueden añadirse al mismo tiempo o en momentos diferentes. Se han descrito otros procedimientos ejemplares no limitantes para neutralizar cargas de alimentación tratadas con sustancias alcalinas, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 4.048.341, 4.182.780 y 5.693.296.

En una realización, pueden combinarse uno o más ácidos, dando como resultado un tampón. Los ácidos y tampones 10 adecuados que pueden usarse como modificadores del pH incluyen cualquier ácido líquido o gaseoso que sea compatible con el microorganismo. Los ejemplos no limitantes incluyen ácido peroxiacético, ácido sulfúrico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido fosfórico y ácido clorhídrico. En algunos aspectos, el pH puede rebajarse a pH neutro o pH ácido, por ejemplo un pH de 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0 o menor. En algunas realizaciones, el pH se rebaja y/o mantiene dentro de un intervalo de aproximadamente pH 4,5 a aproximadamente 7,1, o de aproximadamente 4,5 a 15 aproximadamente 6,9, o de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente 6,3, o de aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente 6,3, o de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente 6,5, o de aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente 6,9 o de aproximadamente pH 6,2 a aproximadamente 6,7.

En otra realización, la biomasa puede pretratarse a una temperatura y/o presión elevadas. En una realización, la 20 biomasa se trata en un intervalo de temperatura de 20 °C a 400 °C. En otra realización, la biomasa se trata a una temperatura de aproximadamente 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 80 °C, 90 °C, 100 °C, 120 °C, 150 °C, 200 °C, 250 °C, 300 °C, 350 °C, 400 °C o mayor. En otra realización, se proporcionan temperaturas elevadas mediante el uso de vapor, agua caliente o gases calientes. En una realización, puede inyectarse vapor en un recipiente que contiene biomasa. En otra realización, puede inyectarse vapor, agua caliente o 25 gas caliente en una camisa del recipiente de tal modo que caliente, pero no esté en contacto directo con la biomasa.

En otra realización, puede tratarse una biomasa a una presión elevada. En una realización, la biomasa se pretrata en un intervalo de presión de aproximadamente 1 psi a aproximadamente 30 psi. En otra realización, se pretrata la biomasa a una presión de aproximadamente 1 psi, 2 psi, 3 psi, 4 psi, 5 psi, 6 psi, 7 psi, 8 psi, 9 psi, 10 psi, 12 psi, 30 15 psi, 18 psi, 20 psi, 22 psi, 24 psi, 26 psi, 28 psi, 30 psi o más. En algunas realizaciones, la biomasa puede tratarse con presiones elevadas mediante la inyección de vapor en un recipiente que contiene biomasa. En una realización, la biomasa puede tratarse en condiciones a vacío antes o después de tratamiento alcalino o ácido o cualquier otro procedimiento de tratamiento proporcionado en la presente memoria.

En una realización, se lava la biomasa pretratada con base o ácido (p. ej. con agua (caliente o fría) u otro disolvente tal como alcohol (p. ej. etanol)), se neutraliza el pH con un ácido, base o agente de tamponación (p. ej., sal fosfato, citrato, borato o carbonato) o se seca antes de la fermentación. En una realización, puede efectuarse la etapa de secado a vacío para aumentar la tasa de evaporación de agua u otros disolventes. Como alternativa, o 40 adicionalmente, la etapa de secado puede efectuarse a temperaturas elevadas tales como de aproximadamente 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 80 °C, 90 °C, 100 °C, 120 °C, 150 °C, 200 °C, 250 °C, 300 °C o más.

En una realización de la presente invención, la etapa de pretratamiento incluye una etapa de recuperación de sólidos. La etapa de recuperación de sólidos puede ser durante o después del pretratamiento (p. ej., pretratamiento 45 ácido o alcalino) o antes de la etapa de secado. En una realización, la etapa de recuperación de sólidos proporcionada por los procedimientos de la presente invención incluye el uso de un tamiz, filtro, criba o membrana para separar las fracciones líquidas y sólidas. En una realización, el diámetro de poro de tamiz adecuado oscila de aproximadamente 0,001 micrómetros a 8 mm, tal como de aproximadamente 0,005 micrómetros a 3 mm o de aproximadamente 0,01 micrómetros a 1 mm. En una realización, el tamaño de poro de tamiz tiene un diámetro de 50 poro de aproximadamente 0,01 micrómetros, 0,02 micrómetros, 0,05 micrómetros, 0,1 micrómetros, 0,5 micrómetros, 1 micrómetro, 2 micrómetros, 4 micrómetros, 5 micrómetros, 10 micrómetros, 20 micrómetros, 25 micrómetros, 50 micrómetros, 75 micrómetros, 100 micrómetros, 125 micrómetros, 150 micrómetros, 200 micrómetros, 250 micrómetros, 300 micrómetros, 400 micrómetros, 500 micrómetros, 750 micrómetros, 1 mm o más. En una realización, se procesa o pretrata la biomasa (p. ej., rastrojo de maíz) antes de la fermentación. En una realización, 55 un procedimiento de pretratamiento incluye, pero sin limitación, reducción del tamaño de partícula de biomasa, tal como por ejemplo fragmentación, molienda, astillado, aplastamiento, trituración o pulverización. En una realización, la reducción del tamaño de partícula de biomasa puede incluir procedimientos de separación por tamaño tales como tamizado, u otros procedimientos adecuados conocidos en la materia para separar materiales basándose en el tamaño. En una realización, la separación por tamaño puede proporcionar rendimientos potenciados. En una 60 realización, la separación de biomasa finamente fragmentada (p. ej., partículas menores de aproximadamente 3 mm

- de diámetro, tal como 3, 2,9, 2,7, 2,5, 2,3, 2, 1,9, 1,7, 1,5, 1,3, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 mm) a partir de partículas mayores permite el reciclado de las partículas mayores de vuelta al proceso de reducción del tamaño, aumentando así el rendimiento final de la biomasa procesada. En una realización, se proporciona una mezcla fermentativa que comprende una carga de alimentación lignocelulósica pretratada que comprende menos de
- 5 aproximadamente un 50 % de un componente de lignina presente en la carga de alimentación antes del pretratamiento y que comprende más de aproximadamente un 60 % de un componente de hemicelulosa presente en la carga de alimentación antes del pretratamiento, y un microorganismo capaz de fermentar un sacárido de 5 carbonos, tal como xilosa, arabinosa o una combinación de los mismos, y un sacárido de 6 carbonos, tal como glucosa, galactosa, manosa o una combinación de los mismos. En algunos aspectos, el pretratamiento de la carga
- 10 de alimentación lignocelulósica comprende añadir una sustancia alcalina que eleva el pH a un nivel alcalino, por ejemplo NaOH. En una realización, se añade NaOH a una concentración de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 2 % en peso de la carga de alimentación. En una realización, el pretratamiento comprende también la adición de un agente quelante.
- 15 Se divulgan en la presente memoria procedimientos de producción de una composición que comprenden sacáridos C5 y/o C6 y/o polímeros de sacárido a partir de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden pretratar la composición de biomasa produciendo una composición de biomasa pretratada. Pretratar la composición de biomasa puede comprender hidratar la composición de biomasa, reducir mecánicamente el tamaño de los sólidos en la composición de biomasa,
- 20 calentar la composición de biomasa o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la composición de biomasa pretratada comprende partículas sólidas que son de 1,5 mm, o 1 mm de tamaño (p. ej., diámetro o longitud, anchura o altura). En algunas realizaciones, la composición de biomasa pretratada comprende adicionalmente un rendimiento de monosacáridos y/o disacáridos C5 que es al menos un 50 % del máximo teórico. En algunas realizaciones, la composición de biomasa pretratada comprende adicionalmente un rendimiento de polímeros de
- 25 sacárido que es al menos un 50 % del máximo teórico. En algunas realizaciones, la composición de biomasa pretratada comprende adicionalmente un rendimiento de polímeros de sacárido derivados de hemicelulosa que es al menos un 50 % del máximo teórico. En algunas realizaciones, la composición de biomasa pretratada comprende adicionalmente un rendimiento de polímeros de sacárido derivados de celulosa que es al menos un 50 % del máximo teórico.
- 30 En algunas realizaciones, el pretratamiento de una composición de biomasa comprende la hidratación de la composición de biomasa produciendo una composición de biomasa hidratada. La hidratación de la composición de biomasa puede comprender mezclar o empapar la composición de biomasa en un medio acuoso. El medio acuoso puede comprender agua. El medio acuoso puede estar a un pH neutro. El medio acuoso puede ser un medio acuoso
- 35 no neutro. El medio acuoso no neutro puede comprender uno o más ácidos y una o más bases. El uno o más ácidos pueden ser ácido sulfúrico, ácido peroxiacético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido sulfuroso, ácido cloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido carbónico o una combinación de los mismos. La una o más bases pueden ser hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, amoníaco, hidróxido de amonio,
- 40 peróxido de hidrógeno o una combinación de los mismos. La hidratación de la composición de biomasa con uno o más ácidos o una o más bases puede preacondicionar la composición de biomasa para hidrólisis termoquímica por impregnación de los sólidos de la composición de biomasa con el uno o más ácidos o la una o más bases. En algunas realizaciones, las condiciones de hidrólisis son tales que no hay sustancialmente hidrólisis de celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa en la composición de biomasa.
- 45 En algunas realizaciones, el pretratamiento de una composición de biomasa comprende la hidratación de la composición de biomasa en un medio acuoso no neutro que comprende de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 50 % p/p o v/p por peso de biomasa seca de uno o más ácidos o una o más bases. Por ejemplo, el medio acuoso no neutro puede comprender aproximadamente 25-50 %, 10-50 %, 10-25 %, 5-50 %, 5-25 %, 5-
- 50 10 %, 4-50 %, 4-25 %, 4-10 %, 4-5 %, 3-50 %, 3-25 %, 3-10 %, 3-5 %, 3-4 %, 2-50 %, 2-25 %, 2-10 %, 2-5 %, 2-4 %, 2-3 %, 1-50 %, 1-25 %, 1-10 %, 1-5 %, 1-4 %, 1-3 %, 1-2 %, 0,5-50 %, 0,5-25 %, 0,5-10 %, 0,5-5 %, 0,5-4 %, 0,5-3 %, 0,5-2 %, 0,5-1 %, 0,5- %, 0,1-50 %, 0,1-25 %, 0,1-10 %, 0,1-5 %, 0,1-4 %, 0,1-3 %, 0,1-2 %, 0,1-1 %, 0,1-0,5 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9,5 %, 9 %, 8,5 %, 8 %, 7,5 %, 7 %, 6,5 %, 6 %, 5,5 %, 5 %, 4,9 %, 4,8 %, 4,7 %, 4,6 %, 4,5 %, 4,4 %, 4,3 %, 4,2 %, 4,1 %, 4 %, 3,9 %, 3,8 %, 3,7 %, 3,6 %, 3,5 %, 3,4 %, 3,3 %, 3,2 %, 3,1 %, 3 %, 2,9 %, 2,8 %, 2,7 %, 2,6 %, 2,5 %, 2,4 %, 2,3 %, 2,2 %, 2,1 %, 2 %, 1,9 %, 1,8 %, 1,7 %, 1,6 %, 1,5 %, 1,4 %, 1,3 %, 1,2 %, 1,1 %, 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 % o 0,1 % del uno o más ácidos o la una o más bases. El uno o más ácidos pueden ser ácido sulfúrico, ácido sulfuroso, ácido peroxiacético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido sulfuroso, ácido cloroacético, ácido dicloroacético,
- 60 ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido carbónico o una combinación de los

mismos. La una o más bases pueden ser hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, amoníaco, hidróxido de amonio, peróxido de hidrogeno o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el medio acuoso no neutro comprende el uno o más ácidos o la una o más bases a aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 % v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, el medio acuoso no neutro comprende ácido sulfúrico a aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 % v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, el medio acuoso no neutro comprende ácido sulfúrico a aproximadamente 1,8 % v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, el medio acuoso no neutro comprende un ácido débil (concretamente, ácido acético, ácido fórmico, ácido oxálico, ácido carbónico o cualquier otro ácido débil o cualquier ácido que no sea un ácido fuerte) a aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 % v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, el medio acuoso no neutro comprende un ácido débil (es decir, ácido acético, ácido fórmico, ácido oxálico, ácido carbónico o cualquier otro ácido débil o cualquier ácido que no sea un ácido fuerte) a aproximadamente 1,8 % v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, el medio acuoso no neutro comprende un ácido débil (concretamente, ácido acético, ácido fórmico, ácido oxálico, ácido carbónico o cualquier otro ácido débil o cualquiera ácido que no sea un ácido fuerte) a aproximadamente 1 % v/p por peso de biomasa seca.

En algunas realizaciones, el pretratamiento de la composición de biomasa comprende la hidratación de la composición de biomasa en un medio acuoso no neutro que tiene un pH que es de menos de 7. Por ejemplo, el medio acuoso no neutro puede tener un pH que es de menos de 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5 o 1. Por ejemplo, el medio acuoso no neutro puede tener un pH que es de aproximadamente 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6, 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5, 4,9, 4,8, 4,7, 4,6, 4,5, 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4, 3,9, 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1, 3, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 o menor. El medio acuoso no neutro que tiene un pH que es de menos de 7 puede comprender uno o más ácidos tales como ácido sulfúrico, ácido sulfuroso, ácido peroxiacético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido sulfuroso, ácido cloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido carbónico o una combinación de los mismos. El uno o más ácidos pueden estar a cualquier concentración adecuada, tal como cualquiera de las concentraciones divulgadas en la presente memoria.

En algunas realizaciones, el pretratamiento de la composición de biomasa comprende la hidratación de la composición de biomasa en un medio acuoso no neutro que tiene un pH que es mayor de 7. Por ejemplo, el medio acuoso no neutro puede tener un pH que es mayor de 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5 o mayor. Por ejemplo, el medio acuoso no neutro puede tener un pH que es de aproximadamente 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9, 11, 11,1, 11,2, 11,3, 11,4, 11,5, 11,6, 11,7, 11,8, 11,9, 12, 12,1, 12,2, 12,3, 12,4, 12,5, 12,6, 12,7, 12,8, 12,9, 13, 13,1, 13,2, 13,3, 13,4, 13,5, 13,6, 13,7, 13,8, 13,9 o mayor. El medio acuoso no neutro que tiene un pH mayor de 7 puede comprender una o más bases tales como hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, amoníaco, hidróxido de amonio, peróxido de hidrógeno o una combinación de los mismos. La una o más bases pueden estar a cualquier concentración adecuada, tal como cualquiera de las concentraciones divulgadas en la presente memoria.

En algunas realizaciones, la hidratación de una composición de biomasa en un medio acuoso, tal como cualquiera de los medios acuosos divulgados en la presente memoria, puede efectuarse a una temperatura que es de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 100 °C. Por ejemplo, la temperatura de hidratación puede ser de aproximadamente 10-100 °C, 20-80 °C, 30-70 °C, 40-60 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C, 90 °C, 95 °C o 100 °C. En una realización, la temperatura es de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 70 °C. En otra realización, la temperatura es de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C. En otra realización, la temperatura es de aproximadamente 50 °C.

En algunas realizaciones, la hidratación de una composición de biomasa en un medio acuoso, tal como cualquiera de los medios acuosos divulgados en la presente memoria, es durante un tiempo de hidratación de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 24 horas. Por ejemplo, el tiempo de hidratación puede ser de aproximadamente 1-24 h, 1-18 h, 1-12 h, 1-6 h, 6-24 h, 6-18 h, 6-12 h, 12-24 h, 12-18 h, 18-24 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h, 9 h, 10 h, 11 h, 12 h, 13 h, 14 h, 15 h, 16 h, 17 h, 18 h, 19 h, 20 h, 21 h, 22 h, 23 h, 24 h. En otro ejemplo, el tiempo de hidratación puede ser de aproximadamente 1-60 min, 1-45 min, 1-30 min, 1-15 min, 1-10 min, 1-5 min, 5-45 min, 5-30 min, 5-15 min, 5-10 min, 10-30 min, 10-15 min, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 6 min, 7 min, 8 min, 9 min, 10 min, 11 min, 12 min, 13 min, 14 min, 15 min, 16 min, 17 min, 18 min, 19 min, 20 min, 21 min, 22 min, 23 min, 24 min, 25 min, 26 min, 27 min, 28 min, 29 min, 30 min, 31 min, 32 min, 33 min, 34 min, 35 min, 36 min, 37 min, 38 min, 39 min, 40 min, 41 min, 42 min, 43 min, 44 min, 45 min, 46 min, 47 min, 48 min, 49 min,

50 min, 51 min, 52 min, 53 min, 54 min, 55 min, 56 min, 57 min, 58 min, 59 min o 60 min. En una realización, la hidratación de la composición de biomasa es durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 60 minutos. En otra realización, la hidratación de la composición de biomasa es de durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos. En otra realización, la hidratación de la biomasa es de durante aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 20 minutos.

En algunas realizaciones, la hidratación de una composición de biomasa en un medio acuoso produce una composición de biomasa hidratada que comprende de aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 % de sólidos por peso de biomasa seca. Por ejemplo, la composición de biomasa hidratada puede comprender aproximadamente  
 10 1-40 %, 1-30 %, 1-20 %, 1-10 %, 1-5 %, 1-2,5 %, 2,5-20 %, 2,5-10 %, 2,5-5 %, 5-20 %, 5-10 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % o 40 % de sólidos por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la composición de biomasa hidratada comprende de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % de sólidos por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la composición de biomasa hidratada comprende aproximadamente 5 % de sólidos por peso de  
 15 biomasa.

En algunas realizaciones, se pretrata una composición de biomasa produciendo una composición de biomasa pretratada, donde el pretratamiento comprende la reducción mecánica del tamaño de los sólidos en la composición de biomasa. En algunas realizaciones, la composición de biomasa es una composición de biomasa hidratada. En algunas realizaciones, la composición de biomasa pretratada comprende partículas sólidas que son de 1,5 mm, 1 mm o 0,5 mm de tamaño, o menos (p. ej., diámetro o longitud, anchura altura) o menos. La reducción mecánica del tamaño puede comprender corte, astillamiento, trituración, molienda, fragmentación, criba, cizallamiento, inyección de vapor, explosión de vapor, explosión de vapor catalizada por ácido, explosión de fibra de amonio/congelación (AFEX) o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la reducción mecánica del  
 20 tamaño comprende molienda que es molienda de martillos, molienda de bolas, molienda de perlas, molienda de rulos, molienda coloidal o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la reducción mecánica del tamaño comprende simultáneamente corte e inyección de vapor. En algunas realizaciones, la reducción mecánica del tamaño comprende inyección de vapor, corte y explosión de vapor. En algunas realizaciones, la reducción mecánica del tamaño comprende simultáneamente corte e inyección de vapor usando un cortador giratorio con una pluralidad de cuchillas de corte y una pluralidad de perforaciones de inyección de vapor. En algunas realizaciones, la reducción mecánica del tamaño comprende cortar con un primer cortador giratorio y un segundo cortador giratorio. En algunas realizaciones, el segundo cortador giratorio comprende una pluralidad de cuchillas de corte y una pluralidad de perforaciones de inyección de vapor.

En algunas realizaciones, se pretrata una composición de biomasa produciendo una composición de biomasa pretratada, donde el pretratamiento comprende una reducción mecánica del tamaño de sólidos en la composición de biomasa. En algunas realizaciones, la composición de biomasa es una composición de biomasa hidratada. Por ejemplo, la composición de biomasa pretratada puede comprender partículas sólidas que tienen un tamaño de menos de aproximadamente 0,01 mm, 0,02 mm, 0,03 mm, 0,04 mm, 0,05 mm, 0,06 mm, 0,07 mm, 0,08 mm, 0,09 mm, 0,1 mm, 0,15 mm, 0,2 mm, 0,25 mm, 0,3 mm, 0,35 mm, 0,4 mm, 0,45 mm, 0,5 mm, 0,55 mm, 0,6 mm, 0,65 mm, 0,7 mm, 0,75 mm, 0,8 mm, 0,85 mm, 0,9 mm, 0,95 mm, 1 mm, 1,1 mm, 1,2 mm, 1,3 mm, 1,4 mm o 1,5 mm. En otra realización, la composición de biomasa tratada comprende partículas sólidas que son de menos de aproximadamente 1,5 mm de tamaño (p. ej., longitud, anchura, altura o diámetro). En otra realización, la composición de biomasa pretratada comprende partículas sólidas que son de menos de aproximadamente 1 mm de tamaño (p. ej., longitud, anchura, altura o diámetro). En otra realización, todas las partículas sólidas en la biomasa pretratada son de menos de 1,5 mm de tamaño (p. ej., longitud, anchura, altura o diámetro). En otra realización, todas las partículas sólidas en la biomasa tratada son de menos de 1 mm de tamaño (p. ej., longitud, anchura, altura o diámetro). En algunas realizaciones, las partículas en la composición de biomasa pretratada tienen tamaños uniformes o sustancialmente uniformes.

En algunas realizaciones, se pretrata una composición de biomasa produciendo una composición de biomasa pretratada, donde el pretratamiento comprende la reducción mecánica del tamaño de sólidos en la composición de biomasa. En algunas realizaciones, la composición de biomasa es una composición de biomasa hidratada. Por ejemplo, la mezcla de partículas puede tener un tamaño medio de partícula (p. ej., longitud, anchura, altura o diámetro) de aproximadamente 0,01-1,5 mm, 0,01-1 mm, 0,01-0,5 mm, 0,01-0,1 mm, 0,1-1,5 mm, 0,1-1 mm, 0,1-0,5 mm, 0,5-1,5 mm, 0,5-1 mm, 1-1,5 mm, 0,01 mm, 0,05 mm, 0,1 mm, 0,2 mm, 0,3 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1 mm, 1,1 mm, 1,2 mm, 1,3 mm, 1,4 mm. En otra realización, la composición de biomasa pretratada comprende partículas sólidas que tienen un tamaño medio de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1,5 mm. En otra realización, la composición de biomasa pretratada comprende partículas sólidas que tienen un tamaño medio de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1 mm. En otra realización, la

composición de biomasa pretratada comprende partículas sólidas que tienen un tamaño medio de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 1 mm. En algunas realizaciones, las partículas en la composición de biomasa pretratada tienen tamaños uniformes o sustancialmente uniformes.

- 5 En algunas realizaciones, se pretrata una composición de biomasa produciendo una composición de biomasa pretratada, donde el pretratamiento comprende la reducción mecánica del tamaño de sólidos en la composición de biomasa. En algunas realizaciones, la composición de biomasa es una composición de biomasa hidratada. En algunas realizaciones, las partículas sólidas en la composición de biomasa pretratada son homogéneas o de tamaño uniforme o sustancialmente homogéneas o de tamaño uniforme. Las partículas sólidas en la composición de biomasa pretratada pueden considerarse homogéneas o sustancialmente homogéneas si más de aproximadamente un 50 % de las partículas entran dentro de un intervalo de tamaño dado. Por ejemplo, la mezcla de partículas puede considerarse homogénea o uniforme o sustancialmente homogénea o sustancialmente uniforme si aproximadamente un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % de las partículas sólidas entran dentro de un intervalo de tamaño dado; por ejemplo, aproximadamente 0,01-1,5 mm, 0,01-1 mm, 0,01-0,5 mm, 0,01-0,1 mm, 0,1-1,5 mm, 0,1-1 mm, 0,1-0,5 mm, 0,5-1,5 mm o 0,5-1 mm. En otra realización, el intervalo de tamaño dado es de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1,5 mm. En otra realización, el intervalo de tamaño dado es de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1 mm.

- 20 En algunas realizaciones, se pretrata la composición de biomasa produciendo una composición de biomasa pretratada, donde el pretratamiento comprende la reducción mecánica del tamaño de sólidos en la composición de biomasa. En algunas realizaciones, la composición de biomasa es una composición de biomasa hidratada. En otra realización, se produce una mezcla homogénea de partículas durante el pretratamiento de biomasa, donde más de un 50 % (p. ej. aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 %) de las partículas en la mezcla tienen un tamaño (p. ej., diámetro o longitud, anchura o altura) que es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,5 mm. En una realización, se produce una mezcla homogénea de partículas durante el pretratamiento de biomasa, donde más de un 50 % (p. ej., aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 %) de las partículas en la mezcla tienen un tamaño (p. ej., diámetro o longitud, anchura o altura) que es de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1 mm. En una realización, se produce una mezcla homogénea o uniforme de partículas durante el pretratamiento de una composición de biomasa, donde más de un 50 % (p. ej., aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 %) de las partículas en la mezcla tienen un diámetro (p. ej., diámetro o longitud, anchura o altura) que es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 mm. En una realización, se produce una mezcla homogénea de partículas durante el pretratamiento de biomasa, donde la relación de área superficial a volumen aumenta varias veces. Por ejemplo, el cambio en veces de relación de área superficial a volumen puede aumentar aproximadamente 100 veces, 75 veces, 50 veces, 40 veces, 30 veces, 25 veces, 20 veces, 19 veces, 18 veces, 17 veces, 16 veces, 15 veces, 11 veces, 10 veces, 9 veces, 8 veces, 7 veces, 6 veces, 5 veces, 4 veces, 3 veces, 2 veces o 1 vez. En otra realización, se produce la mezcla homogénea de partículas durante el pretratamiento de biomasa, donde la relación de área superficial a volumen aumenta aproximadamente 1-5 veces, 5-10 veces, 10-15 veces, 15-20 veces, 20-25 veces, 25-30 veces, 30-35 veces, 35-40 veces, 40-45 veces, 45-50 veces, 50-55 veces, 55-60 veces, 60-65 veces, 65-70 veces, 70-75 veces, 75-80 veces, 80-85 veces, 85-90 veces, 90-95 veces o 95-100 veces. En otra realización, se produce una mezcla homogénea de partículas durante el pretratamiento de biomasa, donde la relación de área superficial a volumen aumenta más de 100 veces, 75 veces, 50 veces, 40 veces, 30 veces, 25 veces, 20 veces, 19 veces, 18 veces, 17 veces, 16 veces, 15 veces, 11 veces, 10 veces, 9 veces, 8 veces, 7 veces, 6 veces, 5 veces, 4 veces, 3 veces, 2 veces o 1 vez. En una realización, se produce una mezcla homogénea de partículas durante el pretratamiento de biomasa, donde la relación de área superficial a volumen es mayor que en los sólidos de la composición de biomasa.

- 50 En algunas realizaciones, cuando el pretratamiento comprende la hidratación de una composición de biomasa produciendo una composición de biomasa hidratada y una reducción mecánica del tamaño de la composición de biomasa hidratada produciendo partículas sólidas de menos de 1,5 mm, 1 mm o 0,5 mm de tamaño, la relación de área superficial a volumen de las partículas sólidas puede aumentar aproximadamente 100 veces, 75 veces, 50 veces, 40 veces, 30 veces, 25 veces, 20 veces, 19 veces, 18 veces, 17 veces, 16 veces, 15 veces, 11 veces, 10 veces, 9 veces, 8 veces, 7 veces, 6 veces, 5 veces, 4 veces, 3 veces, 2 veces o 1 vez. En otra realización, se produce una mezcla homogénea de partículas durante el pretratamiento de biomasa, donde la relación de área superficial a volumen aumenta aproximadamente 1-5 veces, 5-10 veces, 10-15 veces, 15-20 veces, 20-25 veces, 25-30 veces, 30-35 veces, 35-40 veces, 40-45 veces, 45-50 veces, 50-55 veces, 55-60 veces, 60-65 veces, 65-70 veces, 70-75 veces, 75-80 veces, 80-85 veces, 85-90 veces, 90-95 veces o 95-100 veces. En otra realización, se produce una mezcla homogénea de partículas durante el pretratamiento de biomasa, donde la relación de área superficial a volumen aumenta más de 100 veces, 75 veces, 50 veces, 40 veces, 30 veces, 25 veces, 20 veces, 19

veces, 18 veces, 17 veces, 16 veces, 15 veces, 11 veces, 10 veces, 9 veces, 8 veces, 7 veces, 6 veces, 5 veces, 4 veces, 3 veces, 2 veces o 1 vez. En una realización, se produce una mezcla homogénea de partículas durante el pretratamiento de biomasa, donde la relación de área superficial a volumen es mayor que en los sólidos de la composición de biomasa.

5

En algunas realizaciones, cuando el pretratamiento comprende la hidratación de una composición de biomasa produciendo una composición de biomasa hidratada y una reducción mecánica del tamaño de la composición de biomasa hidratada produciendo partículas sólidas de menos de 1,5 mm, o 1 mm de tamaño, comprende

- 10 adicionalmente deshidratar la composición de biomasa hidratada hasta un contenido de sólidos de aproximadamente 5 % a aproximadamente 40 % por peso de biomasa seca. Por ejemplo, el contenido de sólidos puede ser de aproximadamente 5-40 %, 5-35 %, 5-30 %, 5-25 %, 5-20 %, 5-15 %, 5-10 %, 10-40 %, 10-35 %, 10-30 %, 10-25 %, 10-20 %, 10-15 %, 15-40 %, 15-35 %, 15-30 %, 15-25 %, 15-20 %, 20-40 %, 20-35 %, 20-30 %, 20-25 %, 25-40 %, 25-35 %, 25-30 %, 30-40 %, 30-35 %, 35-40 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 15 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 % o 40 % por peso de biomasa seca. En una realización, se deshidrata la biomasa hidratada hasta un contenido de sólidos de aproximadamente 30 % por peso de biomasa seca. La deshidratación puede efectuarse antes, durante y/o después de la reducción mecánica del tamaño. La deshidratación puede efectuarse con un filtro, un filtro prensa, una centrífuga o cualquier otro aparato adecuado. En algunas realizaciones, la biomasa hidratada puede deshidratarse sometida a reducción mecánica del tamaño e hidratarse después de la reducción mecánica del tamaño del tamaño. En algunas realizaciones, la biomasa hidratada puede deshidratarse sometida a reducción mecánica del tamaño e hidratarse después de reducción mecánica del tamaño en un medio acuoso no neutro.

- 25 En algunas realizaciones, el pretratamiento de una composición de biomasa comprende calentar la composición de biomasa. El pretratamiento puede comprender adicionalmente hidratar la composición de biomasa y/o reducir mecánicamente el tamaño de los sólidos en la composición de biomasa. En algunas realizaciones, el pretratamiento puede comprender adicionalmente hidrolizar la composición de biomasa. En algunas realizaciones, el pretratamiento puede comprender adicionalmente hidrolizar la composición de biomasa con una o más enzimas. En algunas realizaciones, el pretratamiento puede comprender adicionalmente hidrolizar la composición de biomasa alterando el 30 pH del medio acuoso de tal modo que el pH sea no neutro. El calentamiento, hidratación y/o reducción mecánica del tamaño de la composición de biomasa durante el pretratamiento pueden efectuarse en cualquier orden. El calentamiento, hidratación y/o reducción mecánica del tamaño de la composición de biomasa pueden efectuarse secuencialmente, al mismo tiempo, o pueden superponerse parcialmente en el tiempo. El calentamiento, hidratación, reducción mecánica del tamaño de la composición de biomasa y/o hidrólisis de la composición de biomasa durante 35 el pretratamiento pueden efectuarse en cualquier orden. El calentamiento, hidratación, reducción mecánica del tamaño de la composición de biomasa y/o hidrólisis de la composición de biomasa pueden efectuarse secuencialmente, al mismo tiempo, o pueden solaparse parcialmente en el tiempo.

- 40 En algunas realizaciones, calentar la composición de biomasa hidroliza una porción de la hemicelulosa de la composición de biomasa a monosacáridos y disacáridos C5. En algunas realizaciones, el rendimiento de monosacáridos y/o disacáridos C5 es al menos un 50 % del máximo teórico. En algunas realizaciones, el rendimiento de monosacáridos y/o disacáridos C5 es de al menos un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % del máximo teórico. En algunas realizaciones, los monosacáridos y/o disacáridos C5 son monosacáridos. En algunas realizaciones la composición de biomasa es una composición de biomasa hidratada. En algunas realizaciones, la 45 composición de biomasa se impregna con uno o más ácidos o una o más bases.

- En algunas realizaciones, calentar la composición de biomasa hidroliza una porción de la hemicelulosa de la composición de biomasa a polímeros de sacárido. En algunas realizaciones, calentar la composición de biomasa hidroliza una porción de la hemicelulosa de la composición de biomasa a polímeros de sacárido que son solubles. 50 En algunas realizaciones, calentar la composición de biomasa hidroliza una porción de la hemicelulosa de la composición de biomasa a polímeros de sacárido que son solubles en un medio acuoso. En algunas realizaciones, el pretratamiento comprende hidratar la composición de biomasa en un medio acuoso y/o reducir mecánicamente el tamaño de la composición de biomasa y/o calentar la composición de biomasa para hidrolizar una porción de la hemicelulosa de la composición de biomasa a polímeros de sacárido derivados de hemicelulosa. En algunas realizaciones, el rendimiento de polímeros de sacárido es de al menos un 50 % del máximo teórico. En algunas 55 realizaciones, el rendimiento de polímeros de sacárido es de al menos un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % del máximo teórico. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido derivado de hemicelulosa comprenden oligosacáridos. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido derivado de hemicelulosa comprenden disacáridos, trisacáridos, tetrasacáridos, pentasacáridos, hexasacáridos, heptasacáridos, 60 octasacáridos, nonasacáridos, y/o deca-sacáridos. En algunas realizaciones, la composición de biomasa es una

composición de biomasa hidratada. En algunas la composición de biomasa se impregna con uno o más ácidos o una o más bases. En algunas realizaciones, la composición hidratada no se impregna con uno o más ácidos o una o más bases. En algunas realizaciones, la composición hidratada se hidrata con agua. En algunas realizaciones, la composición hidratada se hidrata con agua y se calienta.

5

En algunas realizaciones, calentar una composición de biomasa no hidroliza, o no sustancialmente, la celulosa de la composición de biomasa. En algunas realizaciones, el rendimiento de glucosa después de calentar la composición de biomasa es menor del 20 % del máximo teórico. En algunas realizaciones, el rendimiento de glucosa es de menos del 15 %, 10 %, 5 %, 2,5 % o 1 % del máximo teórico. En algunas realizaciones, el rendimiento de polímeros de sacárido derivados de celulosa después de calentar la composición de biomasa es de menos del 20 % del máximo teórico. En algunas realizaciones, el rendimiento de polímeros de sacárido derivados de celulosa es de menos del 15 %, 10 %, 5 %, 2,5 % o 1 % del máximo teórico.

En algunas realizaciones, el calentamiento de la composición de biomasa (que opcionalmente se hidrató, redujo mecánicamente de tamaño y/o deshidrató) se efectúa a una temperatura de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 250 °C. Por ejemplo, la temperatura puede ser de aproximadamente 100-250 °C, 100-200 °C, 100-180 °C, 100-160 °C, 100-140 °C, 100-120 °C, 120-200 °C, 120-180 °C, 120-160 °C, 120-140 °C, 140-180 °C, 140-160 °C, 160-180 °C, 100 °C, 110 °C, 120 °C, 130 °C, 140 °C, 150 °C, 155 °C, 160 °C, 165 °C, 170 °C, 175 °C, 180 °C, 185 °C, 190 °C, 200 °C, 210 °C, 220 °C, 230 °C, 240 °C o 250 °C. En una realización, el calentamiento de la composición de biomasa es a una temperatura de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 250 °C. En otra realización, el calentamiento de la composición de biomasa es a una temperatura de aproximadamente 150 °C a aproximadamente 200 °C. En otra realización, el calentamiento de la composición de biomasa es a una temperatura de aproximadamente 160 °C a aproximadamente 180 °C.

En algunas realizaciones, se efectúa el calentamiento de la composición de biomasa (que opcionalmente se hidrató, redujo mecánicamente de tamaño y/o deshidrató) a una presión mayor que la atmosférica. La presión puede ser de aproximadamente 25 psig a aproximadamente 250 psig. Por ejemplo, la presión puede ser de aproximadamente 25-250 psig, 25-225 psig, 25-200 psig, 25-175 psig, 25-150 psig, 25-125 psig, 25-100 psig, 25-75 psig, 25-50 psig, 50-225 psig, 50-200 psig, 50-175 psig, 50-150 psig, 50-125 psig, 50-100 psig, 50-75 psig, 75-200 psig, 75-175 psig, 75-150 psig, 75-125 psig, 75-100 psig, 100-175 psig, 100-150 psig, 100-125 psig, 125-150 psig, 25 psig, 30 psig, 35 psig, 40 psig, 45 psig, 50 psig, 55 psig, 60 psig, 65 psig, 70 psig, 75 psig, 80 psig, 85 psig, 90 psig, 95 psig, 100 psig, 105 psig, 110 psig, 115 psig, 120 psig, 125 psig, 130 psig, 135 psig, 140 psig, 145 psig, 150 psig, 155 psig, 160 psig, 165 psig, 170 psig, 175 psig, 180 psig, 185 psig, 190 psig, 195 psig, 200 psig, 205 psig, 210 psig, 215 psig, 220 psig, 225 psig, 230 psig, 235 psig, 240 psig, 245 psig o 250 psig. En una realización, la presión es de aproximadamente 25 psig a aproximadamente 250 psig. En otra realización, la presión es de aproximadamente 75 psig a aproximadamente 200 psig. En otra realización, la presión es de aproximadamente 100 psig a aproximadamente 150 psig.

En algunas realizaciones, el pretratamiento comprende calentar una composición de biomasa (que opcionalmente se hidrató, redujo mecánicamente de tamaño y/o deshidrató) en cualquiera de las condiciones divulgadas en la presente memoria durante un tiempo suficiente para producir un rendimiento de monosacáridos y/o disacáridos C5 que es al menos el 50 % del máximo teórico. El tiempo suficiente para producir el rendimiento de monosacáridos y/o disacáridos C5 puede ser de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 120 minutos. Por ejemplo, el tiempo puede ser de aproximadamente 1-120 min, 1-90 min, 1-60 min, 1-30 min, 1-15 min, 1-10 min, 1-5 min, 5-60 min, 5-30 min, 5-15 min, 5-10 min, 120 min, 110 min, 100 min, 90 min, 80 min, 70 min, 60 min, 50 min, 45 min, 40 min, 35 min, 30 min, 25 min, 20 min, 19 min, 18 min, 17 min, 16 min, 15 min, 14 min, 13 min, 12 min, 11 min, 10 min, 9 min, 8 min, 7 min, 6 min, 5 min, 4 min, 3 min, 2 min o 1 min. En una realización, el tiempo suficiente para producir el rendimiento de monosacáridos y/o disacáridos C5 es de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 60 minutos. En otra realización, el tiempo suficiente para producir el rendimiento de monosacáridos y/o disacáridos C5 es de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos. En otra realización, el tiempo suficiente para producir el rendimiento de monosacáridos y/o disacáridos C5 es de aproximadamente 7,5 minutos a aproximadamente 12,5 minutos.

En algunas realizaciones, el pretratamiento comprende calentar una composición de biomasa (que opcionalmente se hidrató, redujo mecánicamente de tamaño y/o deshidrató) en cualquiera de las condiciones divulgadas en la presente memoria durante un tiempo suficiente para producir un rendimiento de polímeros de sacárido que es al menos el 50 % del máximo teórico. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido pueden derivar de hemicelulosas. El tiempo suficiente para producir el rendimiento de polímeros de sacárido puede ser de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 120 minutos. Por ejemplo, el tiempo puede ser de aproximadamente 1-120 min, 1-90 min, 1-60 min, 1-30 min, 1-15 min, 1-10 min, 1-5 min, 5-60 min, 5-30 min, 5-15 min, 5-10 min,

120 min, 110 min, 100 min, 90 min, 80 min, 70 min, 60 min, 50 min, 45 min, 40 min, 35 min, 30 min, 25 min, 20 min, 19 min, 18 min, 17 min, 16 min, 15 min, 14 min, 13 min, 12 min, 11 min, 10 min, 9 min, 8 min, 7 min, 6 min, 5 min, 4 min, 3 min, 2 min o 1 min. En una realización, el tiempo suficiente para producir el rendimiento de polímeros de sacárido es de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 60 minutos. En otra realización, el tiempo suficiente para producir el rendimiento de polímeros de sacárido es de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos. En otra realización, el tiempo suficiente para producir el rendimiento de polímeros de sacárido es de aproximadamente 7,5 minutos a aproximadamente 12,5 minutos.

En algunas realizaciones, los procedimientos divulgados en la presente memoria son para la producción a escala industrial de composiciones que comprenden sacáridos C5 y C6. En una realización, la producción a escala industrial comprende pretratar más de 1 tonelada métrica (TM) en 24 horas. En otra realización, la producción a escala industrial comprende pretratar más de 20 Tm en 24 horas. En otra realización, la producción a escala industrial comprende pretratar más de 50 Tm en 24 horas. En otra realización, la producción a escala industrial comprende pretratar más de 100 Tm en 24 horas.

En algunas realizaciones, los procedimientos divulgados en la presente memoria son para la producción de composiciones que comprenden polímeros de sacárido. En algunas realizaciones, el pretratamiento de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa de acuerdo con cualquiera de los procedimientos divulgados en la presente memoria puede comprender calentar, hidratar, reducir mecánicamente el tamaño de la composición de biomasa y/o hidrolizar la composición de biomasa y pueden efectuarse secuencialmente, al mismo tiempo o pueden superponerse en el tiempo.

En algunas realizaciones, los procedimientos divulgados en la presente memoria son para la producción a escala industrial de composiciones que comprenden polímeros de sacárido.

#### Hidrólisis

Se divulgan en la presente memoria procedimientos de producción de una composición que comprende sacáridos C5 y/o C6 a partir de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa. Los procedimientos pueden comprender pretratar la composición de biomasa de acuerdo con cualquiera de los procedimientos divulgados en la presente memoria. En algunas realizaciones, se pretrata la composición de biomasa produciendo una composición de biomasa pretratada, donde el pretratamiento comprende la reducción mecánica del tamaño de sólidos en la composición de biomasa. En algunas realizaciones, la composición de biomasa pretratada comprende partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm, 1 mm o 0,5 mm de tamaño o menos. La composición de biomasa pretratada puede comprender adicionalmente un rendimiento de monosacáridos y/o disacáridos C5 que es de al menos un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % del máximo teórico. Los procedimientos de producción de una composición pueden comprender adicionalmente hidrolizar la composición de biomasa o composición de biomasa pretratada con una o más enzimas durante un tiempo suficiente para producir la composición que comprende sacáridos C5 y C6. Los sacáridos C5 y C6 pueden comprender glucosa, xilosa, manosa, galactosa, ramnosa, arabinosa o una combinación de los mismos. La composición que comprende sacáridos C5 y/o C6 puede ser una composición acuosa.

En una realización, los procedimientos divulgados en la presente memoria son procedimientos de producción de una composición que comprende polímeros de sacárido a partir de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa. En una realización, los procedimientos para producir una composición que comprende polímeros de sacárido comprenden un proceso de dos etapas. En una primera etapa, la composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa puede hidratarse en un medio acuoso, calentarse y/o reducirse mecánicamente de tamaño de acuerdo con cualquiera de los procedimientos divulgados en la presente memoria produciendo una composición de biomasa pretratada. En una realización, la composición de biomasa puede calentarse a una temperatura y durante un tiempo de acuerdo con cualquiera de los procedimientos divulgados en la presente memoria. En una realización, la composición de biomasa puede calentarse a 50 °C durante 1-30 minutos. En una realización, el medio acuoso puede ser agua. En una realización, la composición de biomasa pretratada comprende sólidos y polímeros de sacárido. En una realización, los sólidos en la biomasa pretratada comprenden partículas sólidas. En algunas realizaciones, la composición de biomasa pretratada comprende polímeros de sacárido y partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm, 1 mm o 0,5 mm de tamaño, o menos. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido en la composición de biomasa pretratada pueden derivar de hemicelulosa. La composición de biomasa pretratada puede comprender un rendimiento de polímeros de sacárido que es de al menos el 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % del máximo teórico. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido de la composición de biomasa pretratada pueden comprender una primera población de polímeros de sacárido. En algunas realizaciones, los polímeros de sacárido de la composición de

- biomasa pretratada pueden separarse de los sólidos de la composición de biomasa pretratada. En algunas realizaciones, la primera población de polímeros de sacárido puede hidrolizarse y/o fermentarse adicionalmente. En una segunda etapa, los sólidos de la composición de biomasa pretratada pueden hidrolizarse produciendo polímeros de sacárido. En una segunda etapa, los sólidos de la composición de biomasa pretratada pueden separarse de la
- 5 primera población de polímeros de sacárido y pueden hidrolizarse produciendo una segunda población de polímeros de sacárido. En una realización, los sólidos de la composición de biomasa pretratada pueden ajustarse a un contenido de sólidos de 8 %-25 % p/v en agua. En una realización, los sólidos de la composición de biomasa pretratada pueden ajustarse a un contenido de sólidos de 20-25 % (p/v) en agua. En una realización, los sólidos de la composición de biomasa pretratada pueden hidrolizarse produciendo una segunda población de polímeros de
- 10 sacárido. En una realización, los sólidos pueden hidrolizarse por una o más enzimas. La una o más enzimas pueden comprender enzimas que hidrolizan polisacáridos procurando polímeros de sacárido. En una realización, la una o más enzimas comprenden una o más endocelulasas, una o más exocelulasas, una o más endohemicelulasas, una o más exohemicelulasas o una combinación de las mismas. La una o más enzimas pueden estar presentes a un nivel total de aproximadamente 0,1 % p/p a aproximadamente 20 % p/p por peso de biomasa seca. En una realización,
- 15 los sólidos pueden hidrolizarse por tratamiento en un medio acuoso no neutro. El medio acuoso no neutro puede estar a un pH mayor de 7 o un pH menor de 7. Por ejemplo, el medio acuoso no neutro puede tener un pH que es de menos de 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5 o 1. Por ejemplo, el medio acuoso no neutro puede tener un pH que es mayor de 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5 o mayor. En una realización, los sólidos de la composición de biomasa pretratada pueden hidrolizarse con un ácido. El ácido puede comprender uno o más
- 20 ácidos tales como aquellos descritos en la presente memoria. El uno o más ácidos pueden estar a cualquier concentración adecuada, tal como cualquiera de las concentraciones divulgadas en la presente memoria. En una realización, los sólidos de la biomasa pretratada pueden hidrolizarse en ácido sulfúrico al 1 % v/p basado en el peso seco de los sólidos. En una realización, los sólidos de la biomasa pretratada pueden hidrolizarse con 1-3 % v/p de un ácido débil (es decir, ácido fórmico o ácido oxálico) basado en el peso seco de los sólidos. En una realización, los
- 25 sólidos de la biomasa tratada pueden hidrolizarse en un ácido y calentarse. En una realización, los sólidos de la biomasa pretratada pueden hidrolizarse en un ácido y calentarse a una temperatura de aproximadamente 140 °C a 220 °C. En una realización, los sólidos de la biomasa pretratada pueden hidrolizarse en un ácido y calentarse a una presión de aproximadamente 135-260 psig. En una realización, las partículas sólidas de la biomasa pretratada pueden hidrolizarse en un ácido durante 10-30 minutos. La hidrólisis de los sólidos de la biomasa pretratada pueden
- 30 comprender un rendimiento de polímeros de sacárido que es de al menos un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % del máximo teórico. En una realización, pueden combinarse la primera etapa y la segunda etapa. En una realización, la primera etapa y la segunda etapa pueden ser secuenciales. En una realización, la primera etapa y la segunda etapa pueden ser simultáneas.
- 35 En algunas realizaciones, la primera población de polímeros de sacárido comprende polímeros de sacárido derivados de hemicelulosa. En una realización, la primera población de polímeros de sacárido comprende residuos de glucosa, residuos de xilosa, residuos de manosa, residuos de galactosa, residuos de ramnosa, residuos de arabinosa o una combinación de los mismos. En una realización, la primera población de polímeros de sacárido comprende oligosacáridos. En algunas realizaciones, la segunda población de polímeros de sacárido comprende
- 40 polímeros de sacárido derivados de celulosa. En una realización, la segunda población de polímeros de sacárido comprende residuos de glucosa. En una realización, la segunda población de polímeros de sacárido comprende 95-100 % de residuos de glucosa. En una realización, la segunda población de polímeros de sacárido comprende 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 %, 70-75 %, 75-80 %, 80-85 %, 85-90 %, 90-95 % o 95-100 % de residuos de glucosa. En una realización, la segunda población de polímeros de sacárido comprende 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % de residuos de glucosa. En una
- 45 realización, la segunda población de polímeros de sacárido comprende oligosacáridos. En una realización, la primera y segunda poblaciones de polímeros de sacárido pueden hidrolizarse y/o fermentarse adicionalmente. En una realización, la primera y segunda poblaciones de polímeros de sacárido pueden hidrolizarse y/o fermentarse adicionalmente de forma separada. En una realización, la primera y segunda poblaciones de polímeros de sacárido
- 50 pueden combinarse para elaborar una composición que comprende polímeros de sacárido. Los polímeros de sacárido pueden hidrolizarse y/o fermentarse adicionalmente. En una realización, la primera y segunda poblaciones de polímeros de sacárido pueden hidrolizarse y/o fermentarse adicionalmente por uno o más biocatalizadores.
- En algunas realizaciones, la hidrólisis de la composición de biomasa pretratada y/o partículas sólidas de la biomasa
- 55 tratada produciendo polímeros de sacárido puede comprender hidratar en un medio acuoso no neutro. El medio acuoso no neutro puede comprender uno o más ácidos o una o más bases. El uno o más ácidos pueden ser ácido sulfúrico, ácido peroxiacético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido sulfuroso, ácido cloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido carbónico o una combinación de los mismos. La una o más bases pueden ser
- 60 hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, amoniaco, hidróxido de amonio, peróxido de hidrógeno

o una combinación de las mismas.

- En algunas realizaciones, la hidrólisis de la composición de biomasa pretratada y/o sólidos de la biomasa pretratada produciendo polímeros de sacárido comprende la hidratación de la composición de biomasa pretratada en un medio acuoso no neutro que comprende de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 50 % p/p o v/p por peso de biomasa seca de uno o más ácidos o una o más bases. Por ejemplo, el medio acuoso no neutro puede comprender aproximadamente 25-50 %, 10-50 %, 10-25 %, 5-50 %, 5-25 %, 5-10 %, 4-50 %, 4-25 %, 4-10 %, 4-5 %, 3-50 %, 3-25 %, 3-10 %, 3-5 %, 3-4 %, 2-50 %, 2-25 %, 2-10 %, 2-5 %, 2-4 %, 2-3 %, 1-50 %, 1-25 %, 1-10 %, 1-5 %, 1-4 %, 1-3 %, 1-2 %, 0,5-50 %, 0,5-25 %, 0,5-10 %, 0,5-5 %, 0,5-4 %, 0,5-3 %, 0,5-2 %, 0,5-1 %, 0,5- %, 0,1-50 %, 0,1-25 %, 0,1-10 %, 0,1-5 %, 0,1-4 %, 0,1-3 %, 0,1-2 %, 0,1-1 %, 0,1-0,5 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9,5 %, 9 %, 8,5 %, 8 %, 7,5 %, 7 %, 6,5 %, 6 %, 5,5 %, 5 %, 4,9 %, 4,8 %, 4,7 %, 4,6 %, 4,5 %, 4,4 %, 4,3 %, 4,2 %, 4,1 %, 4 %, 3,9 %, 3,8 %, 3,7 %, 3,6 %, 3,5 %, 3,4 %, 3,3 %, 3,2 %, 3,1 %, 3 %, 2,9 %, 2,8 %, 2,7 %, 2,6 %, 2,5 %, 2,4 %, 2,3 %, 2,2 %, 2,1 %, 2 %, 1,9 %, 1,8 %, 1,7 %, 1,6 %, 1,5 %, 1,4 %, 1,3 %, 1,2 %, 1,1 %, 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 % o 0,1 % del uno o más ácidos o la una o más bases. El uno o más ácidos puede ser ácido sulfúrico, ácido sulfuroso, ácido peroxiacético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido sulfuroso, ácido cloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido carbónico o una combinación de los mismos. La una o más bases pueden ser hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, amoníaco, hidróxido de amonio, peróxido de hidrógeno o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el medio acuoso no neutro comprende el uno o más ácidos o la una o más bases de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 % v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, el medio acuoso no neutro comprende ácido sulfúrico de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 % v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, el medio acuoso no neutro comprende ácido sulfúrico a aproximadamente 1,8 % v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, el medio acuoso no neutro comprende ácido sulfúrico a aproximadamente 1 % v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, el medio acuoso no neutro comprende un ácido débil (es decir, ácido acético, ácido fórmico, ácido oxálico, ácido carbónico o cualquier otro ácido débil o cualquier ácido que no sea un ácido fuerte) de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 % v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, el medio acuoso no neutro comprende un ácido débil (es decir, ácido acético, ácido fórmico, ácido oxálico, ácido carbónico o cualquier otro ácido débil o cualquier ácido que no sea un ácido fuerte) a aproximadamente 1,8 % v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, el medio acuoso no neutro comprende un ácido débil (es decir, ácido acético, ácido fórmico, ácido oxálico, ácido carbónico o cualquier otro ácido débil o cualquier ácido que no sea un ácido fuerte) a aproximadamente 1 % v/p por peso de biomasa seca.
- 35 En algunas realizaciones, la hidrólisis de la composición de biomasa pretratada y/o sólidos de la biomasa pretratada para producir polímeros de sacárido comprende la hidratación de la composición de biomasa en un medio acuoso no neutro que tiene un pH que es de menos de 7. Por ejemplo, el medio acuoso no neutro puede tener un pH que es de menos de 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5 o 1. Por ejemplo, el medio acuoso no neutro puede tener un pH que es de aproximadamente 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6, 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5, 4,9, 4,8, 4,7, 4,6, 4,5, 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4, 3,9, 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1, 3, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 o menos. El medio acuoso no neutro que tiene un pH que es de menos de 7 puede comprender uno o más ácidos, tales como ácido sulfúrico, ácido sulfuroso, ácido peroxiacético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido sulfuroso, ácido cloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido carbónico o una combinación de los mismos. El uno o más ácidos pueden estar a cualquier concentración adecuada, tal como cualquiera de las concentraciones divulgadas en la presente memoria. En algunas realizaciones, la hidrólisis ácida de la composición de biomasa pretratada hidroliza polímeros de sacárido derivados de hemicelulosas hasta monosacáridos y/o disacáridos.
- 50 En algunas realizaciones, la hidrólisis de la composición de biomasa pretratada y/o sólidos de la biomasa pretratada produciendo polímeros de sacárido comprende la hidratación de la composición de biomasa en un medio acuoso no neutro que tiene un pH que es mayor de 7. Por ejemplo, el medio acuoso no neutro puede tener un pH que es mayor de 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5 o mayor. Por ejemplo, el medio acuoso no neutro puede tener un pH que es de aproximadamente 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9, 11, 11,1, 11,2, 11,3, 11,4, 11,5, 11,6, 11,7, 11,8, 11,9, 12, 12,1, 12,2, 12,3, 12,4, 12,5, 12,6, 12,7, 12,8, 12,9, 13, 13,1, 13,2, 13,3, 13,4, 13,5, 13,6, 13,7, 13,8, 13,9 o mayor. El medio acuoso no neutro que tiene un pH mayor de 7 puede comprender una o más bases tales como hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, amoníaco, hidróxido de amonio, peróxido de hidrógeno o una combinación de los mismos. La una o más bases pueden estar a cualquier concentración adecuada, tal como cualquiera de las concentraciones divulgadas en la presente memoria.

En algunas realizaciones, la hidrólisis de la composición de biomasa pretratada y/o sólidos de la biomasa pretratada produciendo polímeros de sacárido comprende calentar la composición de biomasa pretratada y/o partículas sólidas de la biomasa pretratada. En algunas realizaciones, el calentamiento de la composición de biomasa pretratada y/o sólidos de la biomasa pretratada se efectúa a una temperatura de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 250 °C. Por ejemplo, la temperatura puede ser de aproximadamente 100-250 °C, 100-200 °C, 100-180 °C, 100-160 °C, 100-140 °C, 100-120 °C, 120-200 °C, 120-180 °C, 120-160 °C, 120-140 °C, 140-180 °C, 140-160 °C, 160-180 °C, 140-220 °C, 100 °C, 110 °C, 120 °C, 130 °C, 140 °C, 150 °C, 155 °C, 160 °C, 165 °C, 170 °C, 175 °C, 180 °C, 185 °C, 190 °C, 200 °C, 210 °C, 220 °C, 230 °C, 240 °C o 250 °C. En una realización, el calentamiento de la composición de biomasa es a una temperatura de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 250 °C. En otra realización, el calentamiento de la composición de biomasa pretratada y/o partículas sólidas de la biomasa pretratada es a una temperatura de aproximadamente 140 °C a aproximadamente 220 °C. En otra realización, el calentamiento de la composición de biomasa es a una temperatura de aproximadamente 160 °C a aproximadamente 180 °C.

En algunas realizaciones, el calentamiento de la composición de biomasa pretratada y/o sólidos de la biomasa pretratada se efectúa a una presión mayor que la atmosférica. La presión puede ser de aproximadamente 25 psig a aproximadamente 250 psig. Por ejemplo, la presión puede ser de aproximadamente 25-250 psig, 25-225 psig, 25-200 psig, 25-175 psig, 25-150 psig, 25-125 psig, 25-100 psig, 25-75 psig, 25-50 psig, 50-225 psig, 50-200 psig, 50-175 psig, 50-150 psig, 50-125 psig, 50-100 psig, 50-75 psig, 75-200 psig, 75-175 psig, 75-150 psig, 75-125 psig, 75-100 psig, 100-175 psig, 100-150 psig, 100-125 psig, 125-150 psig, 25 psig, 30 psig, 35 psig, 40 psig, 45 psig, 50 psig, 55 psig, 60 psig, 65 psig, 70 psig, 75 psig, 80 psig, 85 psig, 90 psig, 95 psig, 100 psig, 105 psig, 110 psig, 115 psig, 120 psig, 125 psig, 130 psig, 135 psig, 140 psig, 145 psig, 150 psig, 155 psig, 160 psig, 165 psig, 170 psig, 175 psig, 180 psig, 185 psig, 190 psig, 195 psig, 200 psig, 205 psig, 210 psig, 215 psig, 220 psig, 225 psig, 230 psig, 235 psig, 240 psig, 245 psig o 250 psig. En una realización, la presión es de aproximadamente 25 psig a aproximadamente 250 psig. En otra realización, la presión es de aproximadamente 75 psig a aproximadamente 200 psig. En otra realización, la presión es de aproximadamente 100 psig a aproximadamente 150 psig.

Algunas realizaciones comprenden ajustar el contenido de agua de la composición de biomasa pretratada y/o sólidos de una composición de biomasa pretratada antes de hidrolizar con un medio acuoso no neutro.

El contenido de agua de los sólidos de una composición de biomasa pretratada puede ajustarse de aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 % de sólidos por peso de biomasa seca antes de hidrolizar con un medio acuoso no neutro. Por ejemplo, el contenido de agua puede ajustarse a aproximadamente 5-30 %, 5-25 %, 5-20 %, 5-15 %, 5-12 %, 5-10 %, 5-8 %, 8-30 %, 8-25 %, 8-20 %, 8-15 %, 8-12 %, 8-10 %, 10-30 %, 10-25 %, 10-20 %, 10-15 %, 10-12 %, 12-30 %, 12-25 %, 12-20 %, 12-15 %, 15-30 %, 15-25 %, 15-20 %, 20-30 %, 20-25 %, 25-30 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 % o 30 % de sólidos por peso de biomasa seca. En una realización, el contenido de agua de la composición de biomasa pretratada y/o sólidos de una composición de biomasa pretratada se ajusta de aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 % de sólidos por peso de biomasa seca. En otra realización, el contenido de agua de la composición de biomasa pretratada y/o sólidos de una composición de biomasa pretratada se ajusta de aproximadamente 5 % a aproximadamente 20 % de sólidos por peso de biomasa seca.

En algunas realizaciones, la hidrólisis de la composición de biomasa pretratada y/o sólidos de la biomasa pretratada produciendo polímeros de sacárido comprende tratar con una o más enzimas. La una o más enzimas pueden comprender enzimas que hidrolizan polisacáridos procurando polímeros de sacárido. En una realización, la una o más enzimas comprenden una o más endocelulasas, una o más exocelulasas, una o más endohemicelulasas, una o más exohemicelulasas o una combinación de las mismas. Un polímero de sacárido puede comprender residuos de glucosa, residuos de xilosa, residuos de manosa, residuos de galactosa, residuos de ramnosa o una combinación de los mismos. La composición que comprende polímeros de sacárido puede ser una composición acuosa. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % p/p o v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % p/p o v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % p/p o v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de menos de 15 % p/p o v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de menos de 10 % p/p o v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de menos de 5 % p/p o v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de menos de 1 % p/p o v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un

nivel total de menos de 0,5 % p/p o v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1,0 % p/p o v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de menos de 0,1 % por peso de biomasa seca.

- 5 En otra realización, los procedimientos divulgados en la presente memoria son procedimientos de producción de una composición que comprende polímeros de sacárido a partir de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa. En esta realización, los procedimientos pueden comprender pretratar la composición de biomasa de acuerdo con cualquiera de los procedimientos divulgados en la presente memoria. En algunas realizaciones, la composición de biomasa se pretrata produciendo una composición de biomasa pretratada,
- 10 donde el pretratamiento comprende hidratación y reducción mecánica del tamaño de sólidos en la composición de biomasa. En algunas realizaciones, la biomasa puede hidratarse en agua, y pretratarse posteriormente de acuerdo con cualquiera de los procedimientos divulgados en la presente memoria. En algunas realizaciones, la composición de biomasa pretratada comprende partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm, 1 mm o 0,5 mm de tamaño, o menos. En algunas realizaciones, la composición de biomasa hidratada y de tamaño reducido mecánicamente
- 15 puede calentarse durante cualquier tiempo o temperatura divulgado en la presente memoria. La composición de biomasa pretratada puede comprender un rendimiento de polímeros de sacárido que es de al menos un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % del máximo teórico. Los procedimientos de producción de una composición pueden comprender adicionalmente hidrolizar la composición de biomasa o composición de biomasa pretratada con una o más enzimas durante el tiempo suficiente para producir la composición que comprende polímeros de sacárido.
- 20 Los niveles de la una o más enzimas pueden ser cualquiera de los niveles descritos en la presente memoria para cualquier enzima descrita en la presente memoria. La una o más enzimas pueden comprender enzimas que hidrolizan polisacáridos procurando polímeros de sacárido. En una realización, la una o más enzimas comprenden una o más endocelulasas, una o más exocelulasas, una o unas endohemicelulasas, una o más exohemicelulasas o una combinación de las mismas. Los polímeros de sacárido pueden comprender polímeros de residuos de glucosa,
- 25 polímeros de residuos de xilosa, polímeros de residuos de manosa, polímeros de residuos de galactosa, polímeros de residuos de ramnosa, polímeros de residuos de arabinosa o una combinación de los mismos. Un polímero de sacárido puede comprender residuos de glucosa, residuos de xilosa, residuos de manosa, residuos de galactosa, residuos de ramnosa o una combinación de los mismos. La composición que comprende polímeros de sacárido puede ser una composición acuosa.
- 30 En otra realización, los procedimientos divulgados en la presente memoria son procedimientos de producción de una composición que comprende polímeros de sacárido a partir de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa. En esta realización, los procedimientos pueden comprender pretratar la composición de biomasa de acuerdo con cualquiera de los procedimientos divulgados en la presente memoria. En algunas realizaciones, la composición de biomasa se pretrata produciendo una composición de biomasa pretratada,
- 35 donde el pretratamiento comprende reducción mecánica del tamaño de sólidos en la composición de biomasa. En algunas realizaciones, la composición de biomasa pretratada comprende partículas sólidas que son de menos de 1,5 mm, 1 mm o 0,5 mm de tamaño, o menos. En algunas realizaciones, la biomasa puede rehidratarse en agua y pretratarse posteriormente de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria. La composición de biomasa pretratada puede comprender un rendimiento de polímeros de sacárido que es de al menos un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % del máximo teórico. Los procedimientos de producción de una composición pueden comprender adicionalmente hidrolizar la composición de biomasa o composición de biomasa pretratada por calentamiento de la composición de biomasa o composición de biomasa pretratada en un medio acuoso no neutro durante un tiempo suficiente para producir la composición que comprende polímeros de sacárido.
- 40 El medio acuoso no neutro puede estar a un pH por encima de 7 o a un pH por debajo de 7. Por ejemplo, el medio acuoso no neutro puede tener un pH que es de menos de 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5 o 1. Por ejemplo, el medio acuoso no neutro puede tener un pH que es de aproximadamente 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6, 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5, 4,9, 4,8, 4,7, 4,6, 4,5, 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4, 3,9, 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1, 3, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 o menor. Por ejemplo, el medio acuoso no neutro puede tener un pH que es mayor de 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5,
- 45 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5 o mayor. Por ejemplo, el medio acuoso no neutro puede tener un pH que es de aproximadamente 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9, 11, 11,1, 11,2, 11,3, 11,4, 11,5, 11,6, 11,7, 11,8, 11,9, 12, 12,1, 12,2, 12,3, 12,4, 12,5, 12,6, 12,7, 12,8, 12,9, 13, 13,1, 13,2, 13,3, 13,4, 13,5, 13,6, 13,7, 13,8, 13,9 o mayor.
- 50 El medio acuoso no neutro que tiene un pH que es de menos de 7 puede comprender uno o más ácidos tales como aquellos descritos en la presente memoria. El uno o más ácidos pueden estar a cualquier concentración adecuada, tal como cualquiera de las concentraciones divulgadas en la presente memoria. El medio acuoso no neutro que tiene un pH mayor de 7 puede comprender una o más bases tales como aquellas descritas en la presente memoria. La una o más bases pueden estar a cualquier concentración adecuada, tal como cualquiera de las concentraciones divulgadas en la presente memoria. El tiempo suficiente para producir el rendimiento de
- 55 60

polímeros de sacárido puede ser de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 120 minutos. Por ejemplo, el tiempo puede ser de aproximadamente 1-120 min, 1-90 min, 1-60 min, 1-30 min, 1-15 min, 1-10 min, 1-5 min, 5-60 min, 5-30 min, 5-15 min, 5-10 min, 120 min, 110 min, 100 min, 90 min, 80 min, 70 min, 60 min, 50 min, 45 min, 40 min, 35 min, 30 min, 25 min, 20 min, 19 min, 18 min, 17 min, 16 min, 15 min, 14 min, 13 min, 12 min, 11 min, 10 min, 9 min, 8 min, 7 min, 6 min, 5 min, 4 min, 3 min, 2 min o 1 min. En una realización, el tiempo suficiente para producir el rendimiento de polímeros de sacárido es de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 60 minutos. En otra realización, el tiempo suficiente para producir el rendimiento de polímeros de sacárido es de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos. En otra realización, el tiempo suficiente para producir el rendimiento de polímeros de sacárido es de aproximadamente 7,5 minutos a aproximadamente 12,5 minutos. El calentamiento de la composición de biomasa o composición de biomasa pretratada en un medio acuoso no neutro puede efectuarse a una temperatura de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 250 °C. Por ejemplo, la temperatura puede ser de aproximadamente 100-250 °C, 100-200 °C, 100-180 °C, 100-160 °C, 100-140 °C, 100-120 °C, 120-200 °C, 120-180 °C, 120-160 °C, 120-140 °C, 140-180 °C, 140-160 °C, 160-180 °C, 100 °C, 110 °C, 120 °C, 130 °C, 140 °C, 150 °C, 155 °C, 160 °C, 165 °C, 170 °C, 175 °C, 180 °C, 185 °C, 190 °C, 200 °C, 210 °C, 220 °C, 230 °C, 240 °C o 250 °C. En una realización, el calentamiento de la composición de biomasa o composición de biomasa pretratada es a una temperatura de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 250 °C. En otra realización, el calentamiento de la composición de biomasa o composición de biomasa pretratada es a una temperatura de aproximadamente 150 °C a aproximadamente 200 °C. En otra realización, el calentamiento de la composición de biomasa o composición de biomasa pretratada es a una temperatura de aproximadamente 160 °C a aproximadamente 180 °C. En algunas realizaciones, el calentamiento de la composición de biomasa o composición de biomasa pretratada en un medio acuoso no neutro se efectúa a una presión mayor que la atmosférica. La presión puede ser de aproximadamente 25 psig a aproximadamente 250 psig. Por ejemplo, la presión puede ser de aproximadamente 25-250 psig, 25-225 psig, 25-200 psig, 25-175 psig, 25-150 psig, 25-125 psig, 25-100 psig, 25-75 psig, 25-50 psig, 50-225 psig, 50-200 psig, 50-175 psig, 50-150 psig, 50-125 psig, 50-100 psig, 50-75 psig, 75-200 psig, 75-175 psig, 75-150 psig, 75-125 psig, 75-100 psig, 100-175 psig, 100-150 psig, 100-125 psig, 125-150 psig, 25 psig, 30 psig, 35 psig, 40 psig, 45 psig, 50 psig, 55 psig, 60 psig, 65 psig, 70 psig, 75 psig, 80 psig, 85 psig, 90 psig, 95 psig, 100 psig, 105 psig, 110 psig, 115 psig, 120 psig, 125 psig, 130 psig, 135 psig, 140 psig, 145 psig, 150 psig, 155 psig, 160 psig, 165 psig, 170 psig, 175 psig, 180 psig, 185 psig, 190 psig, 195 psig, 200 psig, 205 psig, 210 psig, 215 psig, 220 psig, 225 psig, 230 psig, 235 psig, 240 psig, 245 psig o 250 psig. En una realización, la presión es de aproximadamente 25 psig a aproximadamente 250 psig. En otra realización, la presión es de aproximadamente 75 psig a aproximadamente 200 psig. En otra realización, la presión es de aproximadamente 100 psig a aproximadamente 150 psig. El polímero de sacárido puede comprender polímeros de glucosa, polímeros de xilosa, polímeros de manosa, polímeros de galactosa, polímeros de ramnosa, polímeros de arabinosa o una combinación de los mismos. Un polímero de sacárido puede comprender residuos de glucosa, residuos de xilosa, residuos de manosa, residuos de galactosa, residuos de ramnosa o una combinación de los mismos. La composición que comprende polímeros de sacárido puede ser una composición acuosa.

En otra realización, los procedimientos divulgados en la presente memoria son procedimientos de producción de una composición que comprende polímeros de sacárido a partir de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa. En esta realización, los procedimientos divulgados pueden comprender pretratar la composición de biomasa de acuerdo con cualquiera de los procedimientos divulgados en la presente memoria. En algunas realizaciones, se pretrata la composición de biomasa produciendo una composición de biomasa pretratada, donde el pretratamiento comprende reducción mecánica del tamaño de sólidos en la composición de biomasa a menos de 1,5 mm, 1 mm o, 0,5 mm de tamaño (p. ej., diámetro o longitud, anchura, altura), o menos. En algunas realizaciones, la biomasa puede hidratarse con agua y pretratarse posteriormente de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria. La composición de biomasa pretratada puede comprender un rendimiento de polímeros de sacárido que es de al menos el 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % del máximo teórico. Los procedimientos de producción de una composición pueden comprender adicionalmente hidrolizar la composición de biomasa o composición de biomasa pretratada mediante calentamiento de la composición de biomasa o composición de biomasa pretratada en un medio acuoso no neutro que comprende una o más enzimas durante un tiempo suficiente para producir la composición que comprende polímeros de sacárido. El pH, temperatura y presión del medio no acuoso pueden ser cualesquiera de aquellos descritos en la presente memoria. Los niveles de la una o más enzimas pueden ser cualquiera de los niveles descritos en la presente memoria para cualquier enzima descrita en la presente memoria. La una o más enzimas pueden comprender enzimas que hidrolizan polisacáridos procurando polímeros de sacárido. En una realización, la una o más enzimas comprenden una o más endocelulasas, una o más exocelulasas, una o más endohemicelulasas, una o más exohemicelulasas o una combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, la una o más enzimas comprenden una o más enzimas celulasas y opcionalmente una o más enzimas hemicelulasas. En una realización, la una o más enzimas son un complejo de celulasa y hemicelulasa.

En una realización, el complejo de celulasa y hemicelulasa no se suplementa con enzimas hemicelulasas adicionales. En algunas realizaciones, la una o más enzimas comprenden un cóctel enzimático comercialmente disponible (p. ej., Accellerase™ 1000, CelluSeb-TL, CelluSeb-TS, Cellic™ Ctec, Cellic™ CTec2, Cellic™ CTec3, STARGEN™, Maxalig™, Spezyme.R™, Distillase.R™, G-Zyme.R™, Fermentzyme.R™, Fermgen™, GC 212 u 5 Optimash™, etc.). En algunas realizaciones, la una o más enzimas comprenden una o más endocelulasas, una o más exocelulasas, una o más endohemicelulasas, una o más exohemicelulasas o una combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % p/p o v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de 10 aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % p/p o v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % p/p o v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de menos de 15 % p/p o v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de menos de 10 % p/p o v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de menos de 5 % p/p o v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de menos de 1 % p/p o v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de menos de 0,5 % p/p o v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1,0 % p/p o v/p por peso de biomasa seca. En algunas realizaciones, la una o más enzimas están a un nivel total de menos de 0,1 % por peso de biomasa seca.

En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para producir la composición que comprende sacáridos C6 y C5 es de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 100 horas. Por ejemplo, el tiempo puede ser de aproximadamente 10-100 h, 10-75 h, 10-50 h, 10-20 h, 20-100 h, 20-75 h, 20-50 h, 50-100 h, 50-75 h, 75-100 h, 10 h, 11 h, 12 h, 13 h, 14 h, 15 h, 16 h, 17 h, 18 h, 19 h, 20 h, 21 h, 22 h, 23 h, 24 h, 25 h, 30 h, 35 h, 40 h, 45 h, 50 h, 55 h, 60 h, 65 h, 25 70 h, 75 h, 80 h, 85 h, 90 h, 95 h o 100 h. En una realización, el tiempo suficiente para producir la composición que comprende sacáridos C6 y C5 es de aproximadamente 21 horas a aproximadamente 50 horas.

En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para producir la composición que comprende polímeros de sacárido es de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 100 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para producir la composición que comprende polímeros de sacárido es de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 100 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para producir la composición que comprende polímeros de sacárido es de más de 100 horas. Por ejemplo, el tiempo puede ser de 10-100 h, 10-75 h, 10-50 h, 10-20 h, 20-100 h, 20-75 h, 20-50 h, 50-100 h, 50-75 h, 75-100 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h, 9 h, 10 h, 11 h, 12 h, 13 h, 14 h, 15 h, 16 h, 17 h, 18 h, 19 h, 20 h, 21 h, 22 h, 23 h, 24 h, 25 h, 30 h, 35 h, 40 h, 45 h, 35 50 h, 55 h, 60 h, 65 h, 70 h, 75 h, 80 h, 85 h, 90 h, 95 h o 100 h. En algunas realizaciones, el tiempo puede ser de aproximadamente 100-200 h, 100-175 h, 100-150 h o 100-125 h. En una realización, el tiempo suficiente para producir la composición que comprende polímeros de sacárido es de aproximadamente 21 horas a aproximadamente 50 horas.

En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para producir la composición que comprende polímeros de sacárido es de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 100 minutos. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para producir la composición que comprende polímeros de sacárido es de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 100 minutos. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para producir la composición que comprende polímeros de sacárido es de más de 100 minutos. Por ejemplo, el tiempo puede ser de aproximadamente 10-100 minutos, 10-75 minutos, 10-50 minutos, 10-20 minutos, 20-100 minutos, 20-75 minutos, 20-50 minutos, 50-100 minutos, 50-75 minutos, 75-100 minutos, 1, minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 11 minutos, 12 minutos, 13 minutos, 14 minutos, 15 minutos, 16 minutos, 17 minutos, 18 minutos, 19 minutos, 20 minutos, 21 minutos, 22 minutos, 23 minutos, 24 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 35 minutos, 40 minutos, 45 minutos, 50 minutos, 55 minutos, 60 minutos, 65 minutos, 70 minutos, 75 minutos, 80 minutos, 85 minutos, 90 minutos, 95 minutos o 100 minutos. En algunas realizaciones, el tiempo puede ser de aproximadamente 100-200 minutos, 100-175 minutos, 100-150 minutos o 100-125 minutos. En una realización, el tiempo suficiente para producir la composición que comprende polímeros de sacárido es de aproximadamente 21 minutos a aproximadamente 50 minutos.

En una realización, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende glucosa con un rendimiento que es mayor del 55 % del máximo teórico a las 21 horas de hidrólisis. En otra realización, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende glucosa con un rendimiento que es mayor del 60 % del máximo teórico a las 21 horas de hidrólisis. En otra realización, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende glucosa con un rendimiento que es mayor del 70 % del máximo teórico a las 21 horas de hidrólisis. En otra realización, la 60 composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende glucosa con un rendimiento que es mayor del 80 % del

máximo teórico a las 21 horas de hidrólisis. En otra realización, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende glucosa con un rendimiento que es mayor del 90 % del máximo teórico a las 21 horas de hidrólisis. En otra realización, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende glucosa con un rendimiento que es mayor del 70 % del máximo teórico a las 48 horas de hidrólisis. En otra realización, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende glucosa con un rendimiento que es mayor del 80 % del máximo teórico a las 48 horas de hidrólisis. En otra realización, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende glucosa con un rendimiento que es mayor del 90 % del máximo teórico a las 48 horas de hidrólisis. En otra realización, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende glucosa con un rendimiento que es mayor del 95 % del máximo teórico a las 48 horas de hidrólisis. En otra realización, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende xilosa con un rendimiento que es un mayor del 60 % del máximo teórico a las 21 horas de hidrólisis. En otra realización, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende xilosa con un rendimiento que es un mayor del 70 % del máximo teórico a las 21 horas de hidrólisis. En otra realización, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende xilosa con un rendimiento que es un mayor del 80 % del máximo teórico a las 21 horas de hidrólisis. En otra realización, la composición que comprende sacáridos C6 y C5 comprende xilosa con un rendimiento que es un mayor del 90 % del máximo teórico a las 21 horas de hidrólisis.

En una realización, la composición comprende polímeros de sacárido donde los polímeros de sacárido comprenden residuos de glucosa. En una realización, la composición comprende polímeros de sacárido donde los polímeros de sacárido comprenden residuos de xilosa. En una realización, la composición comprende polímeros de sacárido donde los polímeros de sacárido comprenden residuos de galactosa. En una realización, la composición comprende polímeros de sacárido donde los polímeros de sacárido comprenden residuos de arabinosa. En una realización, la composición comprende polímeros de sacárido donde los polímeros de sacárido comprenden residuos de manosa. En una realización, la composición comprende polímeros de sacárido donde los polímeros de sacárido comprenden residuos de ramnosa. En una realización, la composición comprende polímeros de sacárido donde los polímeros de sacárido comprenden una mezcla de polímeros de sacárido que comprenden residuos de glucosa, residuos de xilosa, residuos de manosa, residuos de galactosa, residuos de ramnosa y residuos de arabinosa. En una realización, el rendimiento de polímeros de sacárido es mayor del 55 % del máximo teórico a las 21 horas de hidrólisis. En otra realización, el rendimiento de polímeros de sacárido es mayor del 60 % del máximo teórico a las 21 horas de hidrólisis. En otra realización, el rendimiento de polímeros de sacárido es mayor del 70 % del máximo teórico a las 21 horas de hidrólisis. En otra realización, el rendimiento de polímeros de sacárido es mayor del 80 % del máximo teórico a las 21 horas de hidrólisis. En otra realización, el rendimiento de polímeros de sacárido es mayor del 90 % del máximo teórico a las 21 horas de hidrólisis. En otra realización, el rendimiento de polímeros de sacárido es mayor del 70 % del máximo teórico a las 48 horas de hidrólisis. En otra realización, el rendimiento de polímeros de sacárido es mayor del 80 % del máximo teórico a las 48 horas de hidrólisis. En otra realización, el rendimiento de polímeros de sacárido es mayor del 90 % del máximo teórico a las 48 horas de hidrólisis. En otra realización, el rendimiento de polímeros de sacárido es mayor del 95 % del máximo teórico a las 48 horas de hidrólisis. En otra realización, el rendimiento de polímeros de sacárido es mayor del 55 % del máximo teórico a los 21 minutos de hidrólisis. En otra realización, el rendimiento de polímeros de sacárido es mayor del 60 % del máximo teórico a los 21 minutos de hidrólisis. En otra realización, el rendimiento de polímeros de sacárido es mayor del 70 % del máximo teórico a los 21 minutos de hidrólisis. En otra realización, el rendimiento de polímeros de sacárido es mayor del 80 % del máximo teórico a los 21 minutos de hidrólisis. En otra realización, el rendimiento de polímeros de sacárido es mayor del 90 % del máximo teórico a los 21 minutos de hidrólisis. En otra realización, el rendimiento de polímeros de sacárido es mayor del 70 % del máximo teórico a los 48 minutos de hidrólisis. En otra realización, el rendimiento de polímeros de sacárido es mayor del 80 % del máximo teórico a los 48 minutos de hidrólisis. En otra realización, el rendimiento de polímeros de sacárido es mayor del 90 % del máximo teórico a los 48 minutos de hidrólisis. En otra realización, el rendimiento de polímeros de sacárido es mayor del 95 % del máximo teórico a los 48 minutos de hidrólisis.

Algunas realizaciones comprenden ajustar el contenido de agua y/o el pH de una biomasa pretratada antes de hidrolizar con una o más enzimas

El contenido de agua de una composición de biomasa pretratada puede ajustarse de aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 % de sólidos por peso de biomasa seca antes de hidrolizar con una o más enzimas. Por ejemplo, el contenido de agua puede ajustarse a aproximadamente 5-30 %, 5-25 %, 5-20 %, 5-15 %, 5-12 %, 5-10 %, 5-8 %, 8-30 %, 8-25 %, 8-20 %, 8-15 %, 8-12 %, 8-10 %, 10-30 %, 10-25 %, 10-20 %, 10-15 %, 10-12 %, 12-30 %, 12-25 %, 12-20 %, 12-15 %, 15-30 %, 15-25 %, 15-20 %, 20-30 %, 20-25 %, 25-30 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 % o 30 % de sólidos por peso de biomasa seca. En una realización, el contenido de agua de la composición de biomasa pretratada se ajusta de aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 % de sólidos por peso de biomasa seca. En otra realización, el contenido de agua de la composición de biomasa pretratada se ajusta

de aproximadamente 5 % a aproximadamente 20 % de sólidos por peso de biomasa seca.

- El pH de una composición de biomasa pretratada puede ajustarse de aproximadamente 3 a aproximadamente 8 antes de hidrolizar con una o más enzimas. Por ejemplo, el pH puede ajustarse a aproximadamente 3-7, 3-6, 3-5,5, 3-4,5, 3-4, 4-7, 4-6, 4-5,5, 4-4,5, 4,5-6, 4,5-5,5, 3, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,5, 7, 7,5 u 8. En una realización, el pH de la composición de biomasa pretratada se ajusta de aproximadamente 4 a aproximadamente 7. En otra realización, el pH de la composición de biomasa pretratada se ajusta de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,5.
- 10 La hidrólisis de una composición de biomasa pretratada con una o más enzimas puede realizarse a una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 70 °C. Por ejemplo, la temperatura de hidrólisis puede ser de aproximadamente 30-70 °C, 30-65 °C, 30-60 °C, 30-55 °C, 30-50 °C, 30-45 °C, 30-40 °C, 40-65 °C, 40-60 °C, 40-55 °C, 40-50 °C, 40-45 °C, 45-60 °C, 45-55 °C, 45-50 °C, 50-60 °C o 50-55 °C. En una realización, la temperatura de hidrólisis es de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 60 °C.
- 15 Algunas realizaciones comprenden ajustar el contenido de agua y/o el pH de los sólidos de una composición de biomasa pretratada antes de hidrolizar con una o más enzimas.
- El contenido de agua de los sólidos de una composición de biomasa pretratada puede ajustarse de aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 % de sólidos por peso de biomasa seca antes de hidrolizar con una o más enzimas. Por ejemplo, el contenido de agua puede ajustarse a aproximadamente 5-30 %, 5-25 %, 5-20 %, 5-15 %, 5-12 %, 5-10 %, 5-8 %, 8-30 %, 8-25 %, 8-20 %, 8-15 %, 8-12 %, 8-10 %, 10-30 %, 10-25 %, 10-20 %, 10-15 %, 10-12 %, 12-30 %, 12-25 %, 12-20 %, 12-15 %, 15-30 %, 15-25 %, 15-20 %, 20-30 %, 20-25 %, 25-30 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 % o 30 % de sólidos por peso de biomasa seca. En una realización, el contenido de agua de los sólidos de una composición de biomasa pretratada se ajusta de aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 % de sólidos por peso de biomasa seca. En otra realización, el contenido de agua de los sólidos de una composición de biomasa pretratada se ajusta de aproximadamente 5 % a aproximadamente 20 % de sólidos por peso de biomasa seca.
- 30 El pH de sólidos de una composición de biomasa pretratada puede ajustarse de aproximadamente 3 a aproximadamente 8 antes de hidrolizar con una o más enzimas. Por ejemplo, el pH puede ajustarse a aproximadamente 3-8, 3-7, 3-6, 3-5,5, 3-4,5, 3-4, 4-7, 4-6, 4-5,5, 4-4,5, 4,5-6, 4,5-5,5, 3, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,5, 7, 7,5 u 8. En una realización, el pH de la composición de biomasa pretratada se ajusta a aproximadamente 4 a aproximadamente 7. En otra realización, el pH de la composición de biomasa pretratada se ajusta de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,5.
- 35 La hidrólisis de sólidos de una composición de biomasa pretratada con una o más enzimas puede realizarse a una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 70 °C. Por ejemplo, la temperatura de hidrólisis puede ser de aproximadamente 30-70 °C, 30-65 °C, 30-60 °C, 30-55 °C, 30-50 °C, 30-45 °C, 30-40 °C, 40-65 °C, 40-60 °C, 40-55 °C, 40-50 °C, 40-45 °C, 45-60 °C, 45-55 °C, 45-50 °C, 50-60 °C o 50-55 °C. En una realización, temperatura de hidrólisis es de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 60 °C.
- 45 En una realización, la unidad hidrolizante de biomasa proporciona ventajas útiles para la conversión de biomasa en biocombustibles y productos químicos. Es una ventaja de esta unidad su capacidad de producir sacáridos monoméricos a partir de múltiples tipos de biomasa, incluyendo mezclas de diferentes materiales de biomasa, y es capaz de hidrolizar polisacáridos y sacáridos de mayor peso molecular a sacáridos de menor peso molecular. En una realización, la unidad hidrolizante utiliza un proceso de pretratamiento y una enzima hidrolítica que facilitan la producción de una corriente de sacárido que contiene una concentración de sacárido monomérico o varios sacáridos monoméricos derivados de polímeros celulósicos y/o hemicelulósicos. Los ejemplos de material de biomasa que puede pretratarse e hidrolizarse para fabricar monómeros de sacárido incluyen, pero sin limitación, materiales celulósicos, hemicelulósicos y lignocelulósicos; pectinas; almidones; madera; papel; productos agrícolas; desechos forestales; desechos de árboles; corteza de árboles; hojas; hierbas; junco de agua; materia vegetal leñosa; materia vegetal no leñosa; carbohidratos; almidón; inulina; fructanos; glucanos; maíz; caña de azúcar; sorgo; otras hierbas; bambú; algas y material derivado de estos materiales. Esta capacidad de usar un muy amplio intervalo de procedimientos de pretratamiento y enzimas hidrolíticas da distintas ventajas en las fermentaciones de biomasa. Diversas condiciones de pretratamiento e hidrólisis enzimática pueden potenciar la extracción de sacáridos de la biomasa, dando como resultado mayores rendimientos, mayor productividad, mayor selectividad de producto y/o mayor eficiencia de conversión.
- 60

En una realización, se usa el tratamiento enzimático para hidrolizar diversos sacáridos superiores (mayor peso molecular) presentes en la biomasa a sacáridos inferiores (menor peso molecular), tal como en la preparación para fermentación por biocatalizadores tales como levaduras, produciendo ácido etanol, hidrógeno u otros productos químicos tales como ácidos orgánicos incluyendo ácido succínico, ácido fórmico, ácido acético y ácido láctico. Estas enzimas y/o el hidrolizado pueden usarse en fermentaciones produciendo diversos productos, incluyendo combustibles y otros productos químicos.

En un ejemplo, el proceso para convertir material de biomasa en etanol incluye pretratar el material de biomasa (p. ej., «carga de alimentación»), hidrolizar la biomasa pretratada para convertir polisacáridos en oligosacáridos, hidrolizar adicionalmente los oligosacáridos a monosacáridos y convertir los monosacáridos en biocombustibles y productos químicos. Las enzimas tales como celulasas, polisacaridasas, lipasas, proteasas, ligninasas y hemicelulasas ayudan a producir los monosacáridos que pueden usarse en la biosíntesis de productos finales de fermentación. El material de biomasa que puede utilizarse incluye materia vegetal leñosa, materia vegetal no leñosa, material celulósico, material lignocelulósico, material hemicelulósico, carbohidratos, pectina, almidón, inulina, fructanos, glucanos, maíz, algas, caña de azúcar, otras hierbas, pasto aguja, bagazo, paja de trigo, paja de cebada, paja de arroz, mazorcas de maíz, bambú, peladuras cítricas, sorgo, sorgo de alta biomasa, cáscaras de semilla y material derivado de estos. El producto final puede separarse y/o purificarse entonces, como se indica por las propiedades del producto final deseado. En algunos aspectos, pueden utilizarse también compuestos relacionados con sacáridos tales como alcoholes de azúcar o ácidos de azúcar.

Los productos químicos usados en los procedimientos de la presente invención están fácilmente disponibles y pueden adquirirse de un suministrador comercial tal como Sigma-Aldrich. Adicionalmente, pueden adquirirse cócteles enzimáticos comerciales (p. ej., Accellerase™ 1000, CelluSeb-TL, CelluSeb-TS, Cellic™ Ctec, Cellic™ CTec2, Cellic™ CTec3, STARGEN™, Maxalig™, Spezyme.R™, Distillase.R™, G-Zyme.R™, Fermentzyme.R™, Fermgen™, GC 212 u Optimash™) o cualquier otro cóctel enzimático comercial de vendedores tales como Specialty Enzymes & Biochemicals Co., Genencor o Novozymes. Como alternativa, pueden prepararse cócteles enzimáticos haciendo crecer uno o más organismos tales como por ejemplo un hongo (p. ej., un *Trichoderma*, *Saccharomyces*, *Pichia*, hongo de podredumbre blanca, etc.) o una bacteria (p. ej., una bacteria *Clostridium*, o una bacteria coliforme, una bacteria *Zymomonas*, *Sacharophagus degradans* etc.) en un medio adecuado y recolectando las enzimas producidas por los mismos. En algunas realizaciones, la recolección puede incluir una o más etapas de purificación de enzimas.

En una realización, el tratamiento de biomasa comprende hidrólisis enzimática. En una realización, se trata una biomasa con una enzima o una mezcla de enzimas, p. ej. endoglucanasas, exoglucanasas, celobiohidrolasas, celulasa, beta-glucosidasas, glicósido hidrolasas, glicosiltransferasas, liasas, estererasas y proteínas que contienen módulos de unión a carbohidrato. En una realización, la enzima o mezcla de enzimas es una o más enzimas individuales con distintas actividades. En otra realización, la enzima o mezcla de enzimas pueden ser dominios enzimáticos con una actividad catalítica particular. Por ejemplo, una enzima con múltiples actividades puede tener múltiples dominios enzimáticos incluyendo, por ejemplo, dominios catalíticos de glicósido hidrolasas, glicosiltransferasas, liasas y/o estererasas.

Como se usa en la presente memoria, es un producto multienzimático aquel que puede obtenerse o deriva de una fuente microbiana, vegetal u otra o combinación de las mismas, y contendrá enzimas capaces de degradar material lignocelulósico. Los ejemplos de enzimas que comprenden los productos multienzimáticos de la invención incluyen celulasas (tales como celobiohidrolasas, endoglucanasa,  $\beta$ -glucosidasas, hemicelulasas (tales como xilanasas, incluyendo endoxilanasas, exoxilanasas y  $\beta$ -xilosidasas), ligninasas, amilasas,  $\alpha$ -arabinofuranosidasas,  $\alpha$ -glucuronidasas,  $\alpha$ -glucuronidasas, arabinasas, glucuronidasas, proteasas, estererasas (incluyendo ácido ferúlico esterasa y acetilxilano esterasa), lipasas, glucomanasas y xiloglucanasas.

En algunas realizaciones, el producto multienzimático comprende una hemicelulosa. La hemicelulosa es un polímero complejo, y su composición varía a menudo ampliamente de organismo a organismo y de un tipo de tejido a otro. En general, es un componente principal de la hemicelulosa la xilosa beta-1,4-ligada, un sacárido de 5 carbonos. Sin embargo, esta xilosa está a menudo ramificada con enlaces beta-1,3 y puede estar sustituida con enlaces con arabinosa, galactosa, manosa, ácido glucurónico o por esterificación con ácido acético. La hemicelulosa puede contener también glucano, que es un término general para sacáridos de seis carbonos beta-ligados. Esas hemicelulosas incluyen xiloglucano, glucomano y galactomanano.

La composición, naturaleza de la sustitución y grado de ramificación de la hemicelulosa son muy diferentes en plantas dicotiledóneas (dicotiledóneas, p. ej. plantas cuyas semillas tienen dos cotiledones u hojas de semilla tales

como judía de Lima, cacahuetes, almendras, guisantes, judías de riñón) en comparación con las plantas monocotiledóneas (monocotiledóneas; p. ej., plantas que tienen un solo cotiledón u hoja de semilla tales como maíz, trigo, arroz, hierbas, cebada). En las dicotiledóneas, la hemicelulosa está compuesta principalmente por xiloglucanos que son cadenas de glucosa 1,4-beta-ligadas con cadenas laterales de xilosilo 1,6-beta-ligadas. En las monocotiledóneas, incluyendo la mayoría de cultivos de grano, los componentes principales de la hemicelulosa son heteroxilanos. Estos están compuestos principalmente por polímeros de esqueleto de xilosa 1,4-beta-ligados con enlaces 1,3-beta con arabinosa, galactosa y manosa, así como xilosa modificada por ácidos acéticos ligados por éster. Están también presentes beta-glucanos ramificados compuestos por cadenas de glucosilo 1,3- y 1,4-beta-ligadas. En las monocotiledóneas, están presentes celulosa, heteroxilanos y beta-glucanos en cantidades prácticamente iguales, comprendiendo cada una aproximadamente un 15-25 % de la materia seca de las paredes celulares.

Las enzimas hemicelulolíticas, p. ej. hemicelulasas, incluyen tanto enzimas exohidrolíticas como endohidrolíticas, tales como xilanasa,  $\beta$ -xilosidasa y estererasas, que escinden activamente material hemicelulósico mediante hidrólisis. Estas enzimas xilanasa y estererasa escinden las cadenas laterales de xilano y acetilo de xilano y los xiloligómeros restantes están no sustituidos, y por tanto pueden hidrolizarse solo con xilosidasa. Además, se han encontrado varias actividades secundarias menos conocidas en preparaciones enzimáticas que hidrolizan hemicelulosa. Aunque el producto multienzimático puede contener muchos tipos de enzimas, se prefieren las mezclas que comprenden enzimas que aumentan o potencian la liberación de sacárido a partir de la biomasa, incluyendo hemicelulasas. En una realización, la hemicelulasa es una xilanasa, una arabinofuranosidasa, una acetilxilano esterasa, una glucuronidasa, una endogalactanasa, una mananasa, una endoarabinasa, una exoarabinasa, una exogalactanasa, una ácido ferúlico esterasa, una galactomanasa, una xiloglucanasa, o mezclas de cualquiera de estas. En particular, las enzimas pueden incluir glucoamilasa,  $\beta$ -xilosidasa y/o  $\beta$ -glucosidasa. Las enzimas del producto multienzimático pueden proporcionarse por una variedad de fuentes. En una realización, las enzimas pueden producirse haciendo crecer microorganismos o plantas que producen las enzimas naturalmente o como consecuencia de modificarse genéticamente para expresar la enzima o enzimas. En otra realización, al menos una enzima del producto multienzimático está comercialmente disponible.

En una realización, se usan enzimas que degradan polisacáridos para la hidrólisis de biomasa, y pueden incluir enzimas que degradan celulosa, a saber celulasas. Los ejemplos de algunas celulasas incluyen endocelulasas y exocelulasas que hidrolizan enlaces beta-1,4-glucosídicos.

En una realización, se usan enzimas que degradan polisacáridos para la hidrólisis de biomasa, y pueden incluir enzimas que tienen la capacidad de degradar hemicelulosa, a saber hemicelulasas. La hemicelulosa puede ser un componente principal de la biomasa vegetal y puede contener una mezcla de pentosas y hexosas, por ejemplo D-xilopiranososa, L-arabinofuranosa, D-manopiranososa, D-glucopiranososa, D-galactopiranososa, ácido D-glucopiranosilurónico y otros sacáridos. En una realización, se usan enzimas que degradan polisacáridos para la hidrólisis de biomasa, y pueden incluir enzimas que tienen la capacidad de degradar pectina, a saber pectinasas. En las paredes celulares vegetales, la red de celulosa reticulada puede estar embebida en una matriz de pectinas que pueden estar reticuladas covalentemente con xiloglucanos y ciertas proteínas estructurales. La pectina puede comprender homogalacturonano (HG) o ramnogalacturonano (RH).

En una realización, la hidrólisis de biomasa incluye enzimas que pueden hidrolizar almidón. Las enzimas que hidrolizan almidón incluyen alfa-amilasa, glucoamilasa, beta-amilasa, exoalfa-1,4-glucanasa, y pululanasa.

En una realización, la hidrólisis de biomasa comprende hidrolasas que pueden incluir enzimas que hidrolizan quitina. En otra realización, las hidrolasas pueden incluir enzimas que hidrolizan liquen, a saber liquenasa.

En una realización, después del pretratamiento y/o la hidrólisis mediante cualquiera de los procedimientos anteriores, la carga de alimentación contiene celulosa, hemicelulosa, oligómeros solubles, polímeros de sacárido, sacáridos simples, lignina, productos volátiles y ceniza. Los parámetros de la hidrólisis pueden cambiarse para variar la concentración de los componentes de la carga de alimentación pretratada. Por ejemplo, en una realización, se elige una hidrólisis de modo que la concentración de sacáridos C5 solubles sea alta y la concentración de lignina sea baja después de la hidrólisis. Por ejemplo, en otra realización, se elige el pretratamiento y/o la hidrólisis de modo que la concentración de polímeros de sacárido sea alta y la concentración de lignina sea baja después de la hidrólisis. Los ejemplos de parámetros de hidrólisis incluyen temperatura, presión, tiempo, concentración, composición y pH.

En una realización, se cambian los parámetros de pretratamiento e hidrólisis para variar la concentración de los componentes de la carga de alimentación pretratada de tal modo que la concentración de los componentes en la carga de alimentación pretratada e hidrolizada sea óptima para fermentación con un microbio tal como levadura o

microbio bacteriano.

5 En una realización, los parámetros de pretratamiento se cambian para fomentar la liberación de los componentes de una carga de alimentación modificada genéticamente de tal modo que las enzimas se almacenen en una vacuola para aumentar o complementar las enzimas sintetizadas por biocatalizador, produciendo una liberación óptima de los componentes fermentables durante la hidrólisis y fermentación.

10 En una realización, los parámetros de pretratamiento e hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración de celulosa accesible en la carga de alimentación pretratada sea de 1 %, 5 %, 10 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 19 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento se cambian de tal modo que la concentración de celulosa accesible en la carga de alimentación pretratada sea de 5 a 30 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento se cambian de tal modo que la concentración de celulosa accesible en la carga de alimentación pretratada sea de 10 % a 20 %.

15 En una realización, los parámetros de pretratamiento se cambian de tal modo que la concentración de hemicelulosa en la carga de alimentación pretratada sea de 1 %, 5 %, 10 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 40 % o 50 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento se cambian de tal modo que la concentración de hemicelulosa en la carga de alimentación pretratada sea de 5 a 40 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento se cambian de tal modo que la concentración de hemicelulosa en la carga de alimentación pretratada sea de 10 a 30 %.

25 En una realización, los parámetros de pretratamiento e hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración de oligómeros solubles en la carga de alimentación pretratada sea de 1 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 %. Los ejemplos de oligómeros solubles incluyen, pero sin limitación, celobiosa y xilobiosa. En una realización, los parámetros de pretratamiento se cambian de tal modo que la concentración de oligómeros solubles en la carga de alimentación pretratada sea de 30 a 90 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración de oligómeros solubles en la carga de alimentación pretratada sea de 45 a 80 %.

30 En una realización, los parámetros de pretratamiento e hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración de sacáridos simples en la carga de alimentación pretratada sea de 1 %, 5 %, 10 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 19 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento e hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración de sacáridos simples en la carga de alimentación pretratada sea de 0 a 20 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento e hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración de sacáridos simples en la carga de alimentación pretratada sea de 0 a 5 %. Los ejemplos de sacáridos simples incluyen, pero sin limitación, monómeros y dímeros C5 y C6.

40 En una realización, los parámetros de pretratamiento e hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración de polímeros de sacárido en la carga de alimentación pretratada sea de 1 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento e hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración de polímeros de sacárido en la carga de alimentación pretratada sea de 0 a 20 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento e hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración de polímeros de sacárido en la carga de alimentación pretratada sea de 0 a 5 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento e hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración de polímeros de sacárido en la carga de alimentación pretratada sea de 30 a 90 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento e hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración de polímeros de sacárido en la carga de alimentación pretratada sea de 45 a 80 %. Los ejemplos de polímeros de sacárido pueden incluir, pero sin limitación, oligómeros o polímeros C5 y C6.

50 En una realización, los parámetros de pretratamiento se cambian de tal modo que la concentración de lignina en la carga de alimentación pretratada y/o hidrolizada sea de 1 %, 5 %, 10 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 19 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración de lignina en la carga de alimentación pretratada sea de 0 a 20 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración de lignina en la carga de alimentación pretratada sea de 0 a 5 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento e hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración de lignina en la carga de alimentación pretratada y/o hidrolizada sea menor de 1 a 2 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que las concentraciones de productos fenólicos se minimicen.

60 En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración o

cantidad de furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF), y/o uno o más ácidos orgánicos de lignina en la carga de alimentación pretratada y/o hidrolizada sea de menos de 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,025 %, 0,01 %, 0,005 %, 0,0025 %, 0,001 %, 0,0005 %, 0,00025 %, 0,0001 %, 0,00005 %, 0,000025 % o 0,00001 % p/v. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de furfural sea indetectable o sustancialmente indetectable. En una realización, el pretratamiento y/o hidrólisis de la biomasa como se describe en la presente memoria reduce los niveles de inhibidores de la fermentación, donde la cantidad de inhibidores de la fermentación es indetectable o sustancialmente indetectable. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de inhibidores de la fermentación en la carga de alimentación pretratada y/o hidrolizada sea de menos de 1 a 2 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de inhibidores de la fermentación sea de menos de 10 %, menos de 5 %, menos de 2,5 %, menos de 2 %, menos de 1,5 %, menos de 1 %, menos de 0,5 %, menos de 0,4 %, menos de 0,3 %, menos de 0,2 %, menos de 0,1 %, menos de 0,05 %, menos de 0,025 %, menos de 0,01 %, menos de 0,005 %, menos de 0,0025 %, menos de 0,001 %, menos de 0,0005 %, menos de 0,00025 %, menos de 0,0001 %, menos de 0,00005 %, menos de 0,000025 % o menos de 0,00001 % en la carga de alimentación pretratada y/o hidrolizada. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de inhibidores de la fermentación sea de aproximadamente 10 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,4 %, aproximadamente 0,3 %, aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,05 %, aproximadamente 0,025 %, aproximadamente 0,01 %, aproximadamente 0,005 %, aproximadamente 0,0025 %, aproximadamente 0,001 %, aproximadamente 0,0005 %, aproximadamente 0,00025 % o aproximadamente 0,00001 % en la carga de alimentación pretratada y/o hidrolizada. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de inhibidores de la fermentación sea de aproximadamente 0,0001 %-10 %, 0,0001 %-5 %, 0,0001 %-2,5 %, 0,0001 %-2 %, 0,0001 %-1,5 %, 0,0001 %-1 %, 0,0001 %-0,5 %, 0,0001 %-0,4 %, 0,0001 %-0,3 %, 0,0001 %-0,2 %, 0,0001 %-0,1 %, 0,0001 %-0,05 %, 0,0001 %-0,025 %, 0,0001 %-0,01 %, 0,0001 %-0,005 %, 0,0001 %-0,0025 %, 0,0001 %-0,001 %, 0,0001 %-0,0005 %, 0,0001 %-0,00025 %, 0,0001 %-0,0001 % o 0,0001 %-0,000025 % en la carga de alimentación pretratada y/o hidrolizada. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de inhibidores de la fermentación sea de 0 % o sustancialmente 0 % en la carga de alimentación pretratada y/o hidrolizada. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de inhibidores de la fermentación sea indetectable o sustancialmente indetectable. En una realización, los inhibidores de la fermentación comprenden furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) y/o uno o más ácidos orgánicos. En una realización, el uno o más ácidos orgánicos es ácido acético.

En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) o cantidad de inhibidores de la fermentación producidos durante el pretratamiento y/o hidrólisis sea de menos de 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,025 %, 0,01 %, 0,005 %, 0,0025 %, 0,001 %, 0,0005 %, 0,00025 % o 0,00001 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de inhibidores de la fermentación producidos durante el pretratamiento y/o hidrólisis sea de menos de 1 a 2 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de inhibidores de la fermentación producidos durante el pretratamiento y/o hidrólisis sea de menos de 10 %, menos de 5 %, menos de 2,5 %, menos de 2 %, menos de 1,5 %, menos de 1 %, menos de 0,5 %, menos de 0,4 %, menos de 0,3 %, menos de 0,2 %, menos de 0,1 %, menos de 0,05 %, menos de 0,025 %, menos de 0,01 %, menos de 0,005 %, menos de 0,0025 %, menos de 0,001 %, menos de 0,0005 %, menos de 0,00025 %, menos de 0,0001 %, menos de 0,00005 %, menos de 0,000025 % o menos de 0,00001 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de inhibidores de la fermentación producidos durante el pretratamiento y/o hidrólisis sea de aproximadamente 10 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,4 %, aproximadamente 0,3 %, aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,05 %, aproximadamente 0,025 %, aproximadamente 0,01 %, aproximadamente 0,005 %, aproximadamente 0,0025 %, aproximadamente 0,001 %, aproximadamente 0,0005 %, aproximadamente 0,00025 %, aproximadamente 0,0001 %, aproximadamente 0,00005 %, aproximadamente 0,000025 % o aproximadamente 0,00001 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de inhibidores de la fermentación producidos durante el pretratamiento y/o hidrólisis sea de aproximadamente 0,0001 %-10 %, 0,0001 %-5 %, 0,0001 %-2,5 %, 0,0001 %-2 %, 0,0001 %-1,5 %, 0,0001 %-1 %, 0,0001 %-0,5 %, 0,0001 %-0,4 %, 0,0001 %-0,3 %, 0,0001 %-0,2 %, 0,0001 %-0,1 %, 0,0001 %-0,05 %, 0,0001 %-0,025 %, 0,0001 %-0,01 %, 0,0001 %-0,005 %, 0,0001 %-0,0025 %, 0,0001 %-0,0001 % o 0,0001 %-0,000025 % en la carga de alimentación pretratada y/o hidrolizada. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de inhibidores de la fermentación sea de 0 % o sustancialmente 0 % en la carga de alimentación pretratada y/o hidrolizada. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de inhibidores de la fermentación sea indetectable o sustancialmente indetectable. En una realización, los inhibidores de la fermentación comprenden furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) y/o uno o más ácidos orgánicos. En una realización, el uno o más ácidos orgánicos es ácido acético.

- 0,001 %, 0,00001 %-0,0005 %, 0,00001 %-0,00025 %, 0,00001 %-0,0001 %, 0,00001 %-0,00005 % o 0,00001 %-0,000025 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de inhibidores de la fermentación producidos durante el pretratamiento y/o hidrólisis sea de 0 % o sustancialmente 0 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo
- 5 que la concentración (p/v) de inhibidores de la fermentación producidos durante el pretratamiento y/o hidrólisis sea indetectable o sustancialmente indetectable. En una realización, los inhibidores de la fermentación comprenden furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) y/o uno o más ácidos orgánicos. En una realización, el uno o más ácidos orgánicos es ácido acético.
- 10 En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración o cantidad de furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) y/o uno o más ácidos orgánicos en la carga de alimentación pretratada y/o hidrolizada sea de menos de 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,025 %, 0,01 %, 0,005 %, 0,0025 %, 0,001 %, 0,0005 %, 0,00025 %, 0,0001 %, 0,00005 %, 0,000025 % o 0,00001 % p/v. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal
- 15 modo que la concentración o cantidad de ácido acético en la carga de alimentación pretratada y/o hidrolizada sea de menos de 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,025 %, 0,01 %, 0,005 %, 0,0025 %, 0,001 %, 0,0005 %, 0,00025 %, 0,0001 %, 0,00005 %, 0,000025 % o 0,00001 % p/v. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de furfural sea indetectable o sustancialmente indetectable. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o
- 20 hidrólisis se cambian de tal modo que la cantidad de furfural sea indetectable o sustancialmente indetectable. En una realización, el pretratamiento y/o hidrólisis de la biomasa como se describe en la presente memoria reduce los niveles de furfural, hidroximetilfurfural (HMF) y/o uno o más ácidos orgánicos, donde la cantidad de furfural, hidroximetilfurfural (HMF) y/o uno o más ácidos orgánicos es indetectable o sustancialmente indetectable. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de
- 25 furfural, hidroximetilfurfural (HMF) y/o uno o más ácidos orgánicos en la carga de alimentación pretratada y/o hidrolizada sea de menos de 1 % a 2 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de furfural, hidroximetilfurfural (HMF) y/o uno o más ácidos orgánicos sea de menos de 10 %, menos de 5 %, menos de 2,5 %, menos de 2 %, menos de 1,5 %, menos de 1 %, menos de 0,5 %, menos de 0,4 %, menos de 0,3 %, menos de 0,2 %, menos de 0,1 %, menos de 0,05 %, menos de
- 30 0,025 %, menos de 0,01 %, menos de 0,005 %, menos de 0,0025 %, menos de 0,001 %, menos de 0,0005 %, menos de 0,00025 %, menos de 0,0001 %, menos de 0,00005 %, menos de 0,000025 % o menos de 0,00001 % en la carga de alimentación pretratada y/o hidrolizada. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de ácido acético sea de menos de 10 %, menos de 5 %, menos de 2,5 %, menos de 2 %, menos de 1,5 %, menos de 1 %, menos de 0,5 %, menos de 0,4 %, menos de
- 35 0,3 %, menos de 0,2 %, menos de 0,1 %, menos de 0,05 %, menos de 0,025 %, menos de 0,01 %, menos de 0,005 %, menos de 0,0025 %, menos de 0,001 %, menos de 0,0005 %, menos de 0,00025 %, menos de 0,0001 %, menos de 0,00005 %, menos de 0,000025 % o menos de 0,00001 % en la carga de alimentación pretratada y/o hidrolizada. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de furfural, hidroximetilfurfural (HMF) y/o uno o más ácidos orgánicos sea de aproximadamente
- 40 10 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,4 %, aproximadamente 0,3 %, aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,05 %, aproximadamente 0,025 %, aproximadamente 0,01 %, aproximadamente 0,005 %, aproximadamente 0,0025 %, aproximadamente 0,001 %, aproximadamente 0,0005 %, aproximadamente 0,00025 %, aproximadamente 0,0001 %, aproximadamente
- 45 0,00005 %, aproximadamente 0,000025 % o aproximadamente 0,00001 % en la carga de alimentación pretratada y/o hidrolizada. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de ácido acético sea de aproximadamente 10 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,4 %, aproximadamente 0,3 %, aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,1 %,
- 50 aproximadamente 0,05 %, aproximadamente 0,025 %, aproximadamente 0,01 %, aproximadamente 0,005 %, aproximadamente 0,0025 %, aproximadamente 0,001 %, aproximadamente 0,0005 %, aproximadamente 0,00025 %, aproximadamente 0,0001 %, aproximadamente 0,00005 %, aproximadamente 0,000025 % o aproximadamente 0,00001 % en la carga de alimentación pretratada y/o hidrolizada. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de furfural, hidroximetilfurfural (HMF)
- 55 y/o uno o más ácidos orgánicos sea de aproximadamente 0,00001 %-10 %, 0,00001 %-5 %, 0,00001 %-2,5 %, 0,00001 %-2 %, 0,00001 %-1,5 %, 0,00001 %-1 %, 0,00001 %-0,5 %, 0,00001 %-0,4 %, 0,00001 %-0,3 %, 0,00001 %-0,2 %, 0,00001 %-0,1 %, 0,00001 %-0,05 %, 0,00001 %-0,025 %, 0,00001 %-0,01 %, 0,00001 %-0,005 %, 0,00001 %-0,0025 %, 0,00001 %-0,001 %, 0,00001 %-0,0005 %, 0,00001 %-0,00025 %, 0,00001 %-0,0001 %, 0,00001 %-0,00005 % o 0,00001 %-0,000025 % en la carga de alimentación pretratada y/o hidrolizada. En
- 60 una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de



- de 0,2 %, menos de 0,1 %, menos de 0,05 %, menos de 0,025 %, menos de 0,01 %, menos de 0,005 %, menos de 0,0025 %, menos de 0,001 %, menos de 0,0005 %, menos de 0,00025 %, menos de 0,0001 %, menos de 0,00005 %, menos de 0,000025 % o menos de 0,00001 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de ácido acético producida durante el pretratamiento y/o hidrólisis sea de aproximadamente 10 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,4 %, aproximadamente 0,3 %, aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,05 %, aproximadamente 0,025 %, aproximadamente 0,01 %, aproximadamente 0,005 %, aproximadamente 0,0025 %, aproximadamente 0,001 %, aproximadamente 0,0005 %, aproximadamente 0,00025 %, aproximadamente 0,0001 %, aproximadamente 0,00005 %, aproximadamente 0,000025 % o aproximadamente 0,00001 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de ácido acético producida durante el pretratamiento y/o hidrólisis sea de aproximadamente 0,00001 %-10 %, 0,00001 %-5 %, 0,00001 %-2,5 %, 0,00001 %-2 %, 0,00001 %-1,5 %, 0,00001 %-1 %, 0,00001 %-0,5 %, 0,00001 %-0,4 %, 0,00001 %-0,3 %, 0,00001 %-0,2 %, 0,00001 %-0,1 %, 0,00001 %-0,05 %, 0,00001 %-0,025 %, 0,00001 %-0,01 %, 0,00001 %-0,005 %, 0,00001 %-0,0025 %, 0,00001 %-0,001 %, 0,00001 %-0,0005 %, 0,00001 %-0,00025 %, 0,00001 %-0,0001 %, 0,00001 %-0,00005 % o 0,00001 %-0,000025 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de ácido acético producida durante el pretratamiento y/o hidrólisis sea de 0 % o sustancialmente 0 %. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración (p/v) de ácido acético producida durante el pretratamiento y/o hidrólisis sea indetectable o sustancialmente indetectable.

- En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que se produzcan menos de uno o más inhibidores de la fermentación. Los inhibidores de la fermentación comprenden furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) y/o uno o más ácidos orgánicos. En una realización, el ácido orgánico comprende ácido acético. En una realización, la temperatura usada para la hidratación de la composición de biomasa durante el pretratamiento y/o hidrólisis produce menos de uno o más inhibidores de la fermentación que si la temperatura fuera mayor. En una realización, la hidratación de la composición de biomasa es en un medio acuoso. En una realización, la hidratación de la composición de biomasa es en un medio acuoso no neutro. En una realización, la temperatura usada para la hidratación de la composición de biomasa es de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 70 °C, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C o de aproximadamente 50 °C. En una realización, el tiempo de duración de la hidratación de la composición de biomasa durante el pretratamiento y/o hidrólisis produce menos de uno o más inhibidores de la fermentación que si el tiempo de duración fuera mayor. En una realización, el tiempo o duración de la hidratación de la composición de biomasa es de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 60 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos o de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 20 minutos. En una realización, la temperatura usada para calentar una composición de biomasa hidratada durante el pretratamiento y/o hidrólisis produce menos de uno o más inhibidores de la fermentación que si la temperatura fuera mayor. En una realización, la temperatura usada para calentar una composición de biomasa hidratada es de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 250 °C, de aproximadamente 150 °C a aproximadamente 200 °C o de aproximadamente 160 °C a aproximadamente 180 °C. En una realización, la presión usada para calentar una composición de biomasa hidratada durante el pretratamiento y/o hidrólisis produce menos de uno o más inhibidores de la fermentación que si la presión fuera mayor. En una realización, la presión usada para calentar una composición de biomasa hidratada es mayor que la presión atmosférica. En una realización, la presión usada para calentar una composición de biomasa hidratada es de aproximadamente 25 psig a aproximadamente 250 psig, de aproximadamente 75 psig a aproximadamente 200 psig o de aproximadamente 100 psig a aproximadamente 150 psig. En una realización, la temperatura de hidratación de la composición de biomasa es de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 70 °C, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C o de aproximadamente 50 °C. En una realización, el tiempo o duración total del pretratamiento de la composición de biomasa produce menos de uno o más inhibidores de la fermentación que si el tiempo o duración total fueran mayores. En una realización, el tiempo o duración total del pretratamiento de la composición de biomasa es de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 3 horas, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 90 minutos o de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 45 minutos. En una realización, el calentamiento de una composición de biomasa hidratada que comprende tamaños de partícula como se describen en la presente memoria durante el pretratamiento produce menos de uno o más inhibidores de la fermentación que si los tamaños de partícula fueran mayores. En una realización, el calentamiento de la composición de biomasa hidratada que comprende intervalos de tamaño de partícula como se describen en la presente memoria durante el pretratamiento produce menos de uno o más inhibidores de la fermentación que si los intervalos de tamaño de partícula fueran mayores.

- En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian de tal modo que la concentración de sacáridos simples sea de al menos 75 % a 85 %, y la concentración de lignina sea de 0 % a 5 % y la concentración

de furfural y lignina de bajo peso molecular en la carga de alimentación pretratada sea de menos de 1 % a 2 %.

En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian para obtener una alta concentración de hemicelulosa y una baja concentración de lignina. En una realización, los parámetros de pretratamiento y/o hidrólisis se cambian para obtener una alta concentración de hemicelulosa y una baja concentración de lignina de tal modo que la concentración de los componentes en la carga de alimentación pretratada sea óptima para fermentación con un microbio tal como un biocatalizador.

En una realización, pueden ocurrir más de una de estas etapas en cualquier momento dado. Por ejemplo, la hidrólisis de la carga de alimentación pretratada y la hidrólisis de los oligosacáridos pueden ocurrir simultáneamente, y una o más de estas pueden ocurrir simultáneamente a la conversión de monosacáridos en un combustible o producto químico.

En otra realización, una enzima puede convertir directamente el polisacárido en monosacáridos. En algunos aspectos, una enzima puede hidrolizar el polisacárido a oligosacáridos y la enzima u otra enzima puede hidrolizar los oligosacáridos a monosacáridos.

En otra realización, pueden añadirse enzimas a la fermentación o pueden producirse por microorganismos presentes en la fermentación. En una realización, el microorganismo presente en la fermentación produce algunas enzimas. En otra realización, las enzimas se producen separadamente y se añaden a la fermentación.

Para que ocurra la conversión global de biomasa pretratada en producto final a altas tasas, es generalmente necesario que cada una de las enzimas necesarias para cada etapa de conversión esté presente con actividad suficientemente alta. Si falta una de estas enzimas o está presente en cantidades insuficientes, la tasa de producción a un producto final se reducirá. La tasa de producción puede reducirse también si los microorganismos responsables de la conversión de monosacáridos en producto captan solo lentamente monosacáridos y/o tienen una capacidad limitada de translocación de los monosacáridos e intermedios producidos durante la conversión en producto final. Las adiciones de fracciones obtenidas de pretratamiento y/o pretratamiento e hidrólisis pueden aumentar las tasas de crecimiento inicial o global. En otra realización, los oligómeros se captan lentamente por un biocatalizador, necesitando una conversión casi completa de polisacáridos y oligómeros en sacáridos monoméricos.

En otra realización, las enzimas del procedimiento se producen por un biocatalizador, que incluye un intervalo de enzimas hidrolíticas adecuadas para los materiales de biomasa usados en los procedimientos de fermentación. En una realización, se hace crecer un biocatalizador en condiciones apropiadas para inducir y/o promover la producción de las enzimas necesarias para la sacarificación del polisacárido presente. La producción de estas enzimas puede ocurrir en un recipiente separado, tal como un recipiente de fermentación de semilla u otro recipiente de fermentación, o en el recipiente de fermentación de producción donde ocurre la producción de etanol. Cuando las enzimas se producen en un recipiente separado, pueden transferirse, por ejemplo, al recipiente de fermentación de producción junto con las células, o como un líquido en solución relativamente libre de células que contiene el medio intercelular con las enzimas. Cuando las enzimas se producen en un recipiente separado, pueden también secarse y/o purificarse antes de añadirlas al recipiente de hidrólisis o fermentación de producción. Las condiciones apropiadas para la producción de enzimas se gestionan frecuentemente haciendo crecer las células en un medio que incluye la biomasa que se espera que hidrolicen las células en etapas de fermentación posteriores. Pueden ayudar también componentes de medio adicionales, tales como suplementos salinos, factores de crecimiento y cofactores, incluyendo pero sin limitación fitato, aminoácidos y péptidos, a la producción de las enzimas utilizadas por el microorganismo en la producción de los productos deseados.

#### Fermentación

La presente divulgación proporciona también una mezcla fermentativa que comprende: una carga de alimentación celulósica pretratada con una sustancia alcalina o ácida y a una temperatura de aproximadamente 80 °C a aproximadamente 120 °C; posteriormente hidrolizada con una mezcla de enzimas, y un microorganismo capaz de fermentar un sacárido de cinco carbonos y/o un sacárido de seis carbonos. En una realización, el sacárido de cinco carbonos es xilosa, arabinosa o una combinación de las mismas. En una realización, el sacárido de seis carbonos es glucosa, galactosa, manosa o una combinación de las mismas. En una realización, el sacárido de seis carbonos es un polímero de sacárido que comprende polímeros de glucosa, polímeros de galactosa, polímeros de manosa, polímeros de ramnosa o una combinación de los mismos. En una realización, el sacárido de cinco carbonos es un polímero de sacárido que comprende polímeros de xilosa, polímeros de arabinosa o una combinación de los mismos. En una realización, la sustancia alcalina es NaOH. En algunas realizaciones, se añade NaOH a una concentración de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 2 % en peso de la carga de alimentación. En una

realización, el ácido es menor o igual a 2 % de HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. En una realización, el microorganismo es una cepa de *Rhodococcus*, una cepa de *Clostridium*, una cepa de *Trichoderma*, una cepa de *Saccharomyces*, una cepa de *Zymomonas* u otro microorganismo adecuado para la fermentación de biomasa. En una realización, el microorganismo es una cepa de *Lactobacillus*. En otra realización, el proceso de fermentación comprende la fermentación de biomasa usando un microorganismo que es *Clostridium phytofermentans*, *Clostridium algidixylanolyticum*, *Clostridium xylanolyticum*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium josui*, *Clostridium papyrosolvans*, *Clostridium cellobioparum*, *Clostridium hungatei*, *Clostridium cellulosi*, *Clostridium stercorarium*, *Clostridium termitidis*, *Clostridium thermocopriae*, *Clostridium celerecrescens*, *Clostridium polysaccharolyticum*, *Clostridium populeti*, *Clostridium lentocellum*, *Clostridium chartatabidum*, *Clostridium aldrichii*, *Clostridium herbivorans*, *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides cellulosolvans*, *Caldicellulosiruptor saccharolyticum*, *Rhodococcus opacus*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Eubacterium cellulosolvans*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Anaerocellum thermophilum*, *Halocella cellulolytica*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Sacharophagus degradans* o *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. En aún otra realización, el microorganismo se modifica genéticamente para potenciar la actividad de una o más enzimas hidrolíticas, tal como *Saccharomyces cerevisiae* modificada genéticamente.

En una realización, puede usarse un microorganismo de tipo silvestre o modificado genéticamente para producción química por fermentación. Los procedimientos para producir una cepa mejorada genéticamente pueden incluir modificación genética, mutagénesis y procesos adaptativos, tales como evolución dirigida. Por ejemplo, las levaduras pueden modificarse genéticamente para fermentar sacáridos C5. Son otras levaduras útiles especies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Deddera*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces* y *Zygosaccharomyces*. Las cepas de *Rhodococcus*, tales como variantes de *Rhodococcus opacus*, son una fuente de triacilgliceroles y otros lípidos de almacenamiento (véase, p. ej., Waltermann, y col., *Microbiology* 146: 1143-1149 (2000)). Otros organismos útiles para fermentación incluyen, pero sin limitación, levaduras, especialmente cepas de *Saccaromyces* y bacterias tales como *Clostridium phytofermentans*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium beijerinickii*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium thermobutyricum*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*, *Clostridium acetobutylicum*, *Moorella* ssp., *Carboxydocella* ssp., *Zymomonas mobilis*, *E. coli* recombinante, *Klebsiella oxytoca*, *Rhodococcus opacus* y *Clostridium beijerinckii*.

Es una ventaja de las levaduras su capacidad de crecer en condiciones que incluyen concentración de etanol elevada, alta concentración de sacárido, baja concentración de sacárido y/o funcionar en condiciones anaeróbicas. Estas características, en diversas combinaciones, pueden usarse para conseguir una operación con ciclos de fermentación largos o cortos y pueden usarse en combinación con fermentaciones por lotes, fermentaciones alimentadas por lotes, fermentaciones de autosiembra/recolección parcial y reciclado de células de la fermentación final como inóculo.

En una realización, se efectúa la fermentación alimentada por lotes en la biomasa tratada para producir un producto final de fermentación, tal como alcohol, etanol, ácido orgánico, ácido succínico, TAG o hidrógeno. En una realización, el proceso de fermentación comprende hidrólisis y fermentación simultáneas (SSF) de la biomasa usando uno o más microorganismos tales como una cepa de *Rhodococcus*, una cepa de *Clostridium*, una cepa de *Trichoderma*, una cepa de *Saccharomyces*, una cepa de *Zymomonas* u otro microorganismo adecuado para la fermentación de biomasa. En otra realización, el proceso de fermentación comprende la hidrólisis y fermentación simultáneas de la biomasa usando un microorganismo que es *Clostridium algidixylanolyticum*, *Clostridium xylanolyticum*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium josui*, *Clostridium papyrosolvans*, *Clostridium cellobioparum*, *Clostridium hungatei*, *Clostridium cellulosi*, *Clostridium stercorarium*, *Clostridium termitidis*, *Clostridium thermocopriae*, *Clostridium celerecrescens*, *Clostridium polysaccharolyticum*, *Clostridium populeti*, *Clostridium lentocellum*, *Clostridium chartatabidum*, *Clostridium aldrichii*, *Clostridium herbivorans*, *Clostridium phytofermentans*, *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides cellulosolvans*, *Caldicellulosiruptor saccharolyticum*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Eubacterium cellulosolvans*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Anaerocellum thermophilum*, *Halocella cellulolytica*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Sacharophagus degradans* o *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*.

En una realización, el proceso de fermentación puede incluir hidrólisis y fermentación separadas (SHF) de una biomasa con una o más enzimas, tales como xilanasas, endo-1,4-betaxilanasas, xilosidasas, beta-D-xilosidasas, celulasas, hemicelulasas, carbohidrasas, glucanasas, endoglucanasas, endo-1,4-beta-glucanasas, exoglucanasas, glucosidasas, beta-D-glucosidasas, amilasas, celobiohidrolasas, exocelobiohidrolasas, fitasas, proteasas, peroxidasa, pectato liasas, galacturonasas o lacasas. En una realización, una o más enzimas usadas para tratar una

biomasa son termoestables. En otra realización, se trata una biomasa con una o más enzimas, tales como aquellas proporcionadas en la presente memoria, antes de la fermentación. En otra realización, se trata una biomasa con una o más enzimas, tales como aquellas proporcionadas en la presente memoria, durante la fermentación. En otra realización, se trata una biomasa con una o más enzimas, tales como aquellas proporcionadas en la presente memoria, antes de la fermentación y durante la fermentación. En otra realización, una enzima usada para la hidrólisis de una biomasa es la misma que aquellas añadidas durante la fermentación. En otra realización, una enzima usada para la hidrólisis de biomasa es diferente de aquellas añadidas durante la fermentación.

En algunas realizaciones, la fermentación puede efectuarse en un aparato tal como un biorreactor, un recipiente de fermentación, un reactor de tanque agitado o un reactor de lecho fluidificado. En una realización, la biomasa tratada puede suplementarse con productos químicos adecuados para facilitar un crecimiento robusto del uno o más organismos fermentativos. En una realización, un suplemento útil incluye, pero sin limitación, una fuente de nitrógeno y/o aminoácidos tal como extracto de levadura, cisteína o sales de amonio (p. ej., nitrato, sulfato, fosfato, etc.); una fuente de carbohidratos simples tal como líquido de maceración de maíz y jarabe de malta; una fuente de vitaminas tal como extracto de levadura; agentes de tamponación tales como sales (incluyendo, pero sin limitación, sales citrato, sales fosfato o sales carbonato); o nutrientes minerales tales como sales de magnesio, calcio o hierro. En algunas realizaciones, se añaden modificadores rédox a la mezcla de fermentación incluyendo, pero sin limitación, cisteína o mercaptoetanol.

En una realización, el título y/o productividad de la producción de producto final de fermentación por un microorganismo se mejoran cultivando el microorganismo en un medio que comprende uno o más compuestos que comprenden sacáridos de hexosa y/o pentosa. En una realización, un proceso comprende la conversión de un material de partida (tal como una biomasa) en un biocombustible, tal como uno o más alcoholes. En una realización, los procedimientos de la invención comprenden poner en contacto sustrato que comprende tanto sacáridos de hexosa (p. ej. glucosa, celobiosa) como pentosa (p. ej., xilosa, arabinosa) con un microorganismo que puede hidrolizar sacáridos C5 y C6 produciendo etanol. En otra realización, los procedimientos de la invención comprenden poner en contacto sustrato que comprende tanto sacáridos de hexosa (p. ej., glucosa, celobiosa) como pentosa (p. ej., xilosa, arabinosa) con *R. opacus* produciendo TAG.

En algunas realizaciones de la presente invención, la fermentación por lotes con un microorganismo de una mezcla de sacáridos de hexosa y pentosa usando los procedimientos de la presente invención proporciona tasas de captación de aproximadamente 0,1-8 g/l/h o más de hexosa y aproximadamente 0,1-8 g/l/h o más de pentosa (xilosa, arabinosa, etc.). En algunas realizaciones de la presente invención, la fermentación por lotes con un microorganismo de una mezcla de sacáridos de hexosa y pentosa usando los procedimientos de la presente invención proporciona tasas de captación de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 g/l/h o más de hexosa y aproximadamente 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 g/l/h o más de pentosa.

En una realización, un procedimiento para la producción de etanol u otro alcohol produce aproximadamente 10 g/l a 120 g/l en 40 horas o menos. En otra realización, un procedimiento para la producción de etanol produce aproximadamente 10 g/l, 11 g/l, 12 g/l, 13 g/l, 14 g/l, 15 g/l, 16 g/l, 17 g/l, 18 g/l, 19 g/l, 20 g/l, 21 g/l, 22 g/l, 23 g/l, 24 g/l, 25 g/l, 26 g/l, 27 g/l, 28 g/l, 29 g/l, 30 g/l, 31 g/l, 32 g/l, 33 g/l, 34 g/l, 35 g/l, 36 g/l, 37 g/l, 38 g/l, 39 g/l, 40 g/l, 41 g/l, 42 g/l, 43 g/l, 44 g/l, 45 g/l, 46 g/l, 47 g/l, 48 g/l, 49 g/l, 50 g/l, 51 g/l, 52 g/l, 53 g/l, 54 g/l, 55 g/l, 56 g/l, 57 g/l, 58 g/l, 59 g/l, 60 g/l, 61 g/l, 62 g/l, 63 g/l, 64 g/l, 65 g/l, 66 g/l, 67 g/l, 68 g/l, 69 g/l, 70 g/l, 71 g/l, 72 g/l, 73 g/l, 74 g/l, 75 g/l, 76 g/l, 77 g/l, 78 g/l, 79 g/l, 80 g/l, 81 g/l, 82 g/l, 83 g/l, 84 g/l, 85 g/l, 86 g/l, 87 g/l, 88 g/l, 89 g/l, 90 g/l, 91 g/l, 92 g/l, 93 g/l, 94 g/l, 95 g/l, 96 g/l, 97 g/l, 98 g/l, 99 g/l, 100 g/l, 110 g/l, 120 g/l o más de alcohol en 40 horas por la fermentación de biomasa. En otra realización, se produce alcohol mediante un procedimiento que comprende la fermentación simultánea de sacáridos de hexosa y pentosa. En otra realización, se produce alcohol mediante un microorganismo que comprende la fermentación simultánea de sacáridos de hexosa y pentosa.

En otra realización, el nivel de componente del medio se mantiene al nivel deseado añadiendo componente de medio adicionales a medida que el componente se consume o capta por el organismo. Los ejemplos de componentes de medio incluían, pero sin limitación, sustrato de carbono, sustrato de nitrógeno, vitaminas, minerales, factores de crecimiento, cofactores y biocatalizadores. El componente de medio puede añadirse continuamente o a intervalos regulares o irregulares. En una realización, se añade componente de medio adicional antes del agotamiento completo del componente de medio en el medio. En una realización, puede usarse el agotamiento completo efectivamente, por ejemplo para iniciar diferentes rutas metabólicas, para simplificar las operaciones posteriores o para otras razones también. En una realización, se permite variar el nivel de componente de medio en aproximadamente un 10 % alrededor de un punto medio. En una realización, se permite variar en aproximadamente un 30 % alrededor de un punto medio y, en una realización, se permite variar en un 60 % o más alrededor de un punto medio. En una realización, se mantiene el nivel de componente de medio permitiendo que el componente de

medio se agote a un nivel apropiado, seguido del aumento del nivel de componente de medio a otro nivel apropiado. En una realización, se añade un componente de medio, tal como vitamina, en dos puntos temporales diferentes durante el proceso de fermentación. Por ejemplo, se añade la mitad de la cantidad total de vitamina al inicio de la fermentación y se añade la otra mitad en el punto medio de la fermentación.

5

En otra realización, se mantiene el nivel de nitrógeno a un nivel deseado añadiendo material que contiene nitrógeno adicional a medida que el nitrógeno se consume o capta por el organismo. El material que contiene nitrógeno puede añadirse continuamente o a intervalos regulares o irregulares. Los niveles de nitrógeno útiles incluyen niveles de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 g/l. En una realización, pueden emplearse también convenientemente niveles de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 g/l. En otra realización, se usan niveles tales como aproximadamente 0,5, 0,1 g/l o incluso menores, y niveles mayores tales como aproximadamente 20, 30 g/l o incluso mayores. En otra realización, es un nivel de nitrógeno útil aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 g/l. Puede suministrarse nitrógeno en forma de material que contiene nitrógeno simple, tal como compuestos de amonio (p. ej., sulfato de amonio, hidróxido de amonio, amoniaco, nitrato de amonio o cualquier otro compuesto o mezcla que contenga un resto amonio), compuestos de nitrato o nitrito (p. ej., de potasio, sodio, amonio, calcio u otro compuesto o mezcla que contenga un resto nitrato o nitrito), o como un material que contiene nitrógeno más complejo, tal como aminoácidos, proteínas, proteína hidrolizada, levadura hidrolizada, extracto de levadura, levadura de cerveza secada, hidrolizados de levadura, granos de destilación, proteína de soja, proteína de soja hidrolizada, productos de fermentación y polvo de maceración de maíz procesado o materia vegetal o animal rica en proteína no procesada, incluyendo aquellas derivadas de judías, semillas, soja, legumbres, nueces, leche, cerdo, ganado bovino, mamíferos, peces así como otras partes de plantas y otros tipos de animales. Los materiales que contienen nitrógeno útiles en diversas realizaciones incluyen también materiales que contienen un material que contiene nitrógeno incluyendo, pero sin limitación, mezclas de un material que contiene nitrógeno simple o más complejo mezclado con una fuente de carbono, otro material que contiene nitrógeno u otros nutrientes o no nutrientes, y materia vegetal tratada con AFEX.

En otra realización, se mantiene el nivel de carbono a un nivel deseado añadiendo compuestos de sacárido o material que contiene compuestos de sacárido («material que contiene sacárido») a medida que el sacárido se consume o capta por el organismo. El material que contiene sacárido puede añadirse continuamente o a intervalos regulares o irregulares. En una realización, se añade material que contiene sacárido adicional antes del agotamiento completo de los compuestos de sacárido disponibles en el medio. En una realización, puede usarse efectivamente el agotamiento completo, por ejemplo para iniciar rutas metabólicas diferentes, para simplificar las operaciones posteriores o por otras razones también. En una realización, se permite variar el nivel de carbono (medido por los gramos de sacárido presentes en el material que contiene sacárido por litro de caldo) en aproximadamente un 10 % alrededor de un punto medio, en una realización, se permite variar en aproximadamente un 30 % alrededor de un punto medio y en una realización, se permite variar en un 60 % o más alrededor de un punto medio. En una realización, se mantiene el nivel de carbono permitiendo agotarse el carbono a un nivel apropiado, seguido de aumento del nivel de carbono a otro nivel apropiado. En algunas realizaciones, puede mantenerse el nivel de carbono a un nivel de aproximadamente 5 a aproximadamente 120 g/l. Sin embargo, pueden emplearse convenientemente también niveles de aproximadamente 30 a aproximadamente 100 g/l así como niveles de aproximadamente 60 a aproximadamente 80 g/l. En una realización, se mantiene el nivel de carbono a más de 25 g/l durante una porción del cultivo. En otra realización, se mantiene el nivel de carbono a aproximadamente 5 g/l, 6 g/l, 7 g/l, 8 g/l, 9 g/l, 10 g/l, 11 g/l, 12 g/l, 13 g/l, 14 g/l, 15 g/l, 16 g/l, 17 g/l, 18 g/l, 19 g/l, 20 g/l, 21 g/l, 22 g/l, 23 g/l, 24 g/l, 25 g/l, 26 g/l, 27 g/l, 28 g/l, 29 g/l, 30 g/l, 31 g/l, 32 g/l, 33 g/l, 34 g/l, 35 g/l, 36 g/l, 37 g/l, 38 g/l, 39 g/l, 40 g/l, 41 g/l, 42 g/l, 43 g/l, 44 g/l, 45 g/l, 46 g/l, 47 g/l, 48 g/l, 49 g/l, 50 g/l, 51 g/l, 52 g/l, 53 g/l, 54 g/l, 55 g/l, 56 g/l, 57 g/l, 58 g/l, 59 g/l, 60 g/l, 61 g/l, 62 g/l, 63 g/l, 64 g/l, 65 g/l, 66 g/l, 67 g/l, 68 g/l, 69 g/l, 70 g/l, 71 g/l, 72 g/l, 73 g/l, 74 g/l, 75 g/l, 76 g/l, 77 g/l, 78 g/l, 79 g/l, 80 g/l, 81 g/l, 82 g/l, 83 g/l, 84 g/l, 85 g/l, 86 g/l, 87 g/l, 88 g/l, 89 g/l, 90 g/l, 91 g/l, 92 g/l, 93 g/l, 94 g/l, 95 g/l, 96 g/l, 97 g/l, 98 g/l, 99 g/l, 100 g/l, 101 g/l, 102 g/l, 103 g/l, 104 g/l, 105 g/l, 106 g/l, 107 g/l, 108 g/l, 109 g/l, 110 g/l, 111 g/l, 112 g/l, 113 g/l, 114 g/l, 115 g/l, 116 g/l, 117 g/l, 118 g/l, 119 g/l, 120 g/l, 121 g/l, 122 g/l, 123 g/l, 124 g/l, 125 g/l, 126 g/l, 127 g/l, 128 g/l, 129 g/l, 130 g/l, 131 g/l, 132 g/l, 133 g/l, 134 g/l, 135 g/l, 136 g/l, 137 g/l, 138 g/l, 139 g/l, 140 g/l, 141 g/l, 142 g/l, 143 g/l, 144 g/l, 145 g/l, 146 g/l, 147 g/l, 148 g/l, 149 g/l o 150 g/l.

El sustrato de carbono, como el sustrato de nitrógeno, es necesario para la producción celular y producción enzimática pero, al contrario que el sustrato de nitrógeno, sirve como materia prima para la producción de productos finales. Frecuentemente, más sustrato de carbono puede conducir a una mayor producción de productos finales. En otra realización, puede ser ventajoso funcionar con el nivel de carbono y el nivel de nitrógeno relacionados entre sí durante al menos una porción del tiempo de fermentación. En una realización, se mantiene la relación de carbono a nitrógeno dentro de un intervalo de aproximadamente 30:1 a aproximadamente 10:1. En otra realización, se

mantiene una relación de carbono-nitrógeno de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 10:1 o más preferentemente de aproximadamente 15:1 a aproximadamente 10:1. En otra realización, la relación de carbono-nitrógeno es de aproximadamente 30:1, 29:1, 28:1, 27:1, 26:1, 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17: 1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 o 1:1.

5

Mantener la relación de carbono y la relación de nitrógeno dentro de intervalos particulares puede dar como resultado beneficios para la operación tales como la tasa de metabolismo del sustrato de carbono, que depende de la cantidad de sustrato de carbono y la cantidad y actividad de las enzimas presentes, estando equilibrado con la tasa de producción de producto final. Equilibrar la relación de carbono a nitrógeno, por ejemplo, puede facilitar la

10

producción mantenida de estas enzimas de tal modo que se reemplacen aquellas que hayan perdido la actividad.

En otra realización, la cantidad y/o momento de adición de carbono, nitrógeno u otro componente de medio pueden estar relacionados con medidas tomadas durante la fermentación. Por ejemplo, pueden medirse la cantidad de monosacáridos presentes, la cantidad de polisacárido insoluble presente, la actividad polisacarasa, la cantidad de

15

producto presente, la cantidad de material celular (por ejemplo, volumen celular empaquetado, peso celular seco, etc.) y/o la cantidad de nitrógeno (por ejemplo, nitrato, nitrito, amoníaco, urea, proteínas, aminoácidos, etc.) presentes. Pueden considerarse la concentración de especies particulares, la cantidad total de especies presentes en el fermentador, el número de horas en que se ha ejecutado la fermentación y el volumen del fermentador. En diversas realizaciones, estas medidas pueden compararse entre sí y/o pueden compararse con medidas anteriores

20

del mismo parámetro tomadas anteriormente de la misma fermentación u otra fermentación. Pueden lograrse ajustes de la cantidad de un componente de medio tales como cambiar el caudal de una corriente que contiene ese componente o cambiar la frecuencia de las adiciones de ese componente. Por ejemplo, la cantidad de sacárido puede aumentarse cuando la producción celular aumenta más rápidamente que la producción de producto final. En otra realización, la cantidad de nitrógeno puede aumentarse cuando disminuye el nivel de actividad enzimática.

25

En otra realización, puede emplearse una operación de alimentación por lotes, donde se añaden componentes de medio y/o células recientes durante la fermentación sin retirar una porción del caldo para recolección antes del final de la fermentación. En una realización, un proceso alimentado por lotes está basado en alimentar un medio nutriente limitante del crecimiento a un cultivo de microorganismos. En una realización, el medio de alimentación está

30

altamente concentrado para evitar la dilución del biorreactor. En otra realización, la adición controlada del nutriente afecta directamente a la tasa de crecimiento del cultivo y evita desbordar el metabolismo tal como por la formación de metabolitos secundarios. En una realización, el nutriente limitante del crecimiento es una fuente de nitrógeno o una fuente de sacárido.

35

En diversas realizaciones, componentes de medio particulares pueden tener efectos beneficiosos sobre el desempeño de la fermentación, tales como aumentar el título de productos deseados o aumentar la tasa con que se producen los productos deseados. Pueden suministrarse compuestos específicos en forma de un ingrediente puro específico, tal como un aminoácido particular, o pueden suministrarse como un componente de un ingrediente más complejo, tal como usando un producto microbiano, vegetal o animal como ingrediente de medio para proporcionar

40

un aminoácido, promotor, cofactor u otro compuesto beneficioso particular. En algunos casos, el compuesto particular suministrado en el ingrediente de medio puede combinarse con otros compuestos por el organismo, dando como resultado un compuesto beneficioso para la fermentación. Un ejemplo de esta situación sería cuando un ingrediente de medio proporciona un aminoácido específico que usa el organismo para elaborar una enzima beneficiosa para la fermentación. Otros ejemplos pueden incluir componentes de medio que se usan para generar

45

crecimiento o promotores de producto, etc. En tales casos, puede ser posible obtener un resultado beneficioso para la fermentación suplementando la enzima, promotor, factor de crecimiento, etc. o añadiendo el precursor. En algunas situaciones, el mecanismo específico mediante el que el componente de medio beneficia la fermentación no es conocido, solo que se consigue un resultado beneficioso.

50

En una realización, se efectúa una fermentación para producir un combustible cultivando una cepa de *R. opacus* en un medio que tiene un suplemento de componente de lignina y una concentración de una o más fuentes de carbono. La producción resultante de producto final tal como TAG puede ser de hasta 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, y en algunos casos hasta 10 veces y mayor en productividad volumétrica que en un proceso que usa solo la adición de una fuente de sacárido relativamente pura, y puede conseguir una

55

eficiencia de conversión de carbono cercana al máximo teórico. El máximo teórico puede variar con el sustrato y el producto. Por ejemplo, la eficiencia máxima generalmente aceptada para la conversión de glucosa en etanol es de 0,51 g de etanol/g de glucosa. En una realización, un biocatalizador puede producir aproximadamente 40-100 % del rendimiento máximo teórico de etanol. En otra realización, un biocatalizador puede producir hasta aproximadamente 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % e incluso 100 % del rendimiento máximo teórico de etanol. En una

60

realización, un biocatalizador puede producir hasta aproximadamente un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % del rendimiento máximo teórico de etanol.

9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,99 % o 100 % del rendimiento máximo teórico de un combustible. Puede ser posible obtener un resultado beneficioso para la fermentación suplementando el medio con un componente de pretratamiento o hidrólisis. En algunas situaciones, el mecanismo específico mediante el que el componente de medio beneficia la fermentación no es conocido, solo que se consigue un resultado beneficioso.

10 Diversas realizaciones ofrecen beneficios relacionados con mejorar el título y/o productividad de la producción de producto final de fermentación por un biocatalizador cultivando el organismo en un medio que comprende uno o más compuestos que comprenden restos ácido graso particulares y/o cultivando el organismo en condiciones de pH controlado.

15 En una realización, se controla el pH del medio a menos de aproximadamente pH 7,2 durante al menos una parte de la fermentación. En una realización, se controla el pH dentro del intervalo de aproximadamente pH 3,0 a aproximadamente 7,1 o de aproximadamente pH 4,5 a aproximadamente 7,1, o de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente 6,3, o de aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente 6,3, o de aproximadamente pH 6,0 a

20 aproximadamente 6,5, o de aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente 6,9 o de aproximadamente pH 6,2 a aproximadamente 6,7. El pH puede controlarse mediante la adición de un modificador del pH. En una realización, un modificador del pH es un ácido, una base, un tampón o un material que reacciona con otros materiales presentes sirviendo para elevar o rebajar el pH. En una realización, pueden usarse más de un modificador del pH, tal como más de un ácido, más de una base, uno o más ácidos con una o más bases, uno o más ácidos con uno o más

25 tampones, una o más bases con uno o más tampones o uno o más ácidos con una o más bases con uno o más tampones. Cuando se utiliza más de un modificador del pH, pueden añadirse al mismo tiempo o en momentos diferentes. En una realización, pueden combinarse uno o más ácidos y una o más bases, dando como resultado un tampón. En una realización, los componentes de medio, tales como una fuente de carbono o una fuente de nitrógeno, pueden servir también como modificador del pH; los componentes de medio adecuados incluyen aquellos

30 con alto o bajo pH o aquellos con capacidad tamponadora. Los componentes de medio ejemplares incluyen polisacáridos vegetales hidrolizados con ácido o base que tienen ácido o base residual, material vegetal tratado con AFEX con amoníaco, ácido láctico, sólidos o líquido de maceración de maíz residuales.

En una realización, puede utilizarse un pH constante a lo largo de la fermentación. En una realización, el momento y/o cantidad de reducción de pH pueden estar relacionados con las condiciones de crecimiento de las células, tales como en relación con el recuento celular, el producto final producido, el producto final presente o la tasa de producción de producto final. En una realización, la reducción del pH puede realizarse en relación con propiedades físicas o químicas de la fermentación, tal como viscosidad, composición del medio, producción de gas, composición del gas de escape, etc.

#### 40 Recuperación de productos finales fermentativos

En otro aspecto, se proporcionan procedimientos para la recuperación de los productos finales fermentativos tales como un alcohol (p. ej., etanol, propanol, metanol, butanol, etc.), otro biocombustible o producto químico. En una

45 realización, se recolectará el caldo en algún punto durante la fermentación, y se recuperará el producto o productos finales fermentativos. El caldo con producto final para recuperar incluirá tanto producto final como impurezas. Las impurezas incluyen materiales tales como agua, cuerpos celulares, desechos celulares, sustrato de carbono en exceso, sustrato de nitrógeno en exceso, otros nutrientes restantes, otros metabolitos y otros componentes de medio o componentes de medio digeridos. Durante el transcurso del procesamiento del caldo, el caldo puede calentarse y/o

50 hacerse reaccionar con diversos reactivos, dando como resultado impurezas adicionales en el caldo.

En una realización, las etapas de procesamiento para recuperar producto final incluyen frecuentemente varias etapas de separación incluyendo, por ejemplo, destilación de un material de alcohol de alta concentración a partir de un material que contiene alcohol menos puro. En una realización, el material de etanol de alta concentración puede

55 concentrarse adicionalmente para conseguir alcohol de muy alta concentración, tal como 98 % o 99 % o 99,5 % (p) o incluso mayor. Otras etapas de separación, tales como filtración, centrifugación extracción, adsorción, etc. pueden ser también parte de algunos procesos de recuperación para alcohol como producto o biocombustible, u otros biocombustibles o productos químicos.

60 En una realización, puede aumentarse de escala un proceso para producir biocombustibles comercialmente útiles.

En otra realización, se usa biocatalizador para producir un alcohol, p. ej. etanol, butanol, propanol, metanol o un combustible tal como hidrocarburos, hidrógeno, TAG y compuestos de hidroxilo. En otra realización, se usa biocatalizador para producir un compuesto de carbonilo tal como un aldehído o cetona (p. ej., acetona, formaldehído, 1-propanal, etc.), un ácido orgánico, un derivado de un ácido orgánico tal como un éster (p. ej., éster de cera, glicérido, etc.), 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido succínico, ácido pirúvico o una enzima tal como una celulasa, polisacarasa, lipasas, proteasa, ligninasa y hemicelulasa.

La biosíntesis de TAG está ampliamente distribuida en la naturaleza y la aparición de TAG como compuesto de reserva está extendida entre plantas, animales, levaduras y hongos. En contraposición, los TAG no se han considerado como compuestos de almacenamiento comunes en bacterias. La biosíntesis y acumulación de TAG se han descrito solo en unas pocas bacterias pertenecientes al grupo de actinomicetos, tales como los géneros *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Dietzia* y *Gordonia*, y, en menor extensión, también en unas pocas de otras bacterias, tales como *Acinetobacter baylyi* y *Alcanivorax borkumensis*. Desde mediados de los 90, se ha reseñado frecuentemente la producción de TAG en cepas degradantes de hidrocarburos de esos géneros. Los TAG se almacenan en cuerpos lipídicos esféricos como inclusiones intracelulares, dependiendo las cantidades de la especie respectiva, las condiciones de cultivo y la fase de crecimiento. Comúnmente, el factor más importante para producción de TAG es la cantidad de nitrógeno que se suministra al medio de cultivo. El carbono en exceso, que está disponible para el cultivo después de la terminación del nitrógeno, sigue siendo asimilado por las células y, como consecuencia de que las bacterias oleaginosas poseen las enzimas requeridas, se convierte directamente en lípido. Las composiciones y estructuras de las moléculas de TAG bacterianas varían considerablemente dependiendo de la bacteria y de las condiciones de cultivo, especialmente las fuentes de carbono. Véase Brigham *Cl*, y col. (2011) *J Microbial Biochem Technol* S3:002.

En una realización, pueden producirse productos bioquímicos útiles a partir de biomasa vegetal no alimentaria, con una técnica de extracción con vapor o agua caliente que se lleva a cabo poniendo en contacto una carga de material de biomasa pretratado vegetal no alimentario tal como rastrojo de maíz o sorgo con agua y/o ácido (con o sin compuestos o materiales que potencien el proceso adicionales) en un recipiente presurizado a una temperatura elevada de hasta aproximadamente 160-220 °C y a un pH por debajo de aproximadamente 7,0, procurando una mezcla acuosa (solución de extracto) de sacáridos útiles que incluyen sacáridos de cadena larga (sacáridos), ácido acético y lignina, dejando en gran medida intacta la porción estructural (celulosa y lignina) del material lignocelulósico. En combinación estos productos químicos inhibidores potenciales, especialmente productos de degradación de sacáridos, son bajos, y se recuperan también nutrientes derivados de plantas que son componentes basados en lignocelulosa de origen natural que son beneficiosos para un organismo fermentador de C5 y C6. Con este objetivo, se concentra el extracto acuoso (por centrifugación, filtración, extracción con disolvente, floculación, evaporación) produciendo una corriente concentrada de sacárido, aparte de los otros sacáridos derivados de hemicelulosa (ricos en C5) y celulósicos (ricos en C6) que se encauzan a una corriente fermentable.

En otra realización, después de la hidrólisis enzimática/ácida, se recuperan los compuestos químicos que se liberan con la corriente de sacárido, dando como resultado una solución de sacárido de cadena corta que contiene xilosa, manosa, arabinosa, ramnosa, galactosa y glucosa (sacáridos de 5 y 6 carbonos). La corriente de sacáridos, ahora significativamente rica en sustancias C5 y C6, puede convertirse por fermentación microbiana o catálisis química en productos tales como triacilglicerol o TAG y refinarse adicionalmente produciendo corrientes ricas en JP8 o combustibles de aviación. Si no se ha efectuado la corrección del porcentaje de sacáridos C5, puede efectuarse antes de la fermentación para satisfacer la combinación deseada de sacáridos C5 y C5 para el organismo de fermentación y el producto final correspondiente.

#### Planta de biocombustible y proceso de producción de biocombustible:

Generalmente, hay varios enfoques básicos para producir combustibles y productos finales químicos a partir de biomasa a gran escala utilizando células microbianas. En un procedimiento, en primer lugar se pretrata e hidroliza un material de biomasa que incluye carbohidratos de alto peso molecular a carbohidratos de menor peso molecular, y entonces se fermentan los carbohidratos de menor peso molecular utilizando células microbianas, produciendo combustible u otros productos. En el segundo procedimiento, se trata el material de biomasa mismo usando procedimientos mecánicos, químicos y/o enzimáticos. En todos los procedimientos, dependiendo del tipo de biomasa y su manifestación física, uno de los procesos puede comprender una molienda del material carbonáceo, mediante molienda húmeda o seca, para reducir el material de tamaño y aumentar la relación de superficie a volumen (modificación física).

En una realización, puede lograrse la hidrólisis usando ácidos, p. ej., ácidos de Bronsted (p. ej., ácido sulfúrico o clorhídrico), bases, p. ej. hidróxido de sodio, procesos hidrotérmicos, procesos de explosión de fibra con amoniaco

(«AFEX»), procesos con cal, enzimas o una combinación de estos. El hidrógeno y otros productos finales de la fermentación pueden capturarse y purificarse si se desea, o desecharse, p. ej. por combustión. Por ejemplo, el gas hidrógeno puede inflamarse o usarse como fuente de energía en el proceso, p. ej. para accionar una caldera de vapor, p. ej. por combustión. La hidrólisis y/o tratamiento con vapor de la biomasa puede aumentar, p. ej., la porosidad y/o área superficial de la biomasa, dejando a menudo los materiales celulósicos más expuestos a las células de biocatalizador, lo que puede aumentar la tasa y rendimiento de fermentación. La retirada de lignina puede proporcionar, p. ej., un combustible inflamable para accionar una caldera y también, p. ej., aumentar la porosidad y/o área superficial de la biomasa, aumentando a menudo la tasa y rendimiento de fermentación. Generalmente, en cualquiera de estas realizaciones, la concentración inicial de los carbohidratos en el medio es mayor de 20 mm, p. ej. mayor de 30 mm, 50 mm, 75 mm, 100 mm, 150 mm, 200 mm o incluso mayor de 500 mm.

#### Planta de procesamiento de biomasa y proceso para producir productos a partir de biomasa

En un aspecto, se proporciona una planta de combustible o química que incluye una unidad de pretratamiento para preparar biomasa para exposición y separación de biopolímeros mejoradas, una unidad de hidrólisis configurada para hidrolizar un material de biomasa que incluye un carbohidrato de alto peso molecular y uno o más sistemas de recuperación de producto para aislar un producto o productos y subproductos y coproductos asociados. En otro aspecto, se proporcionan procedimientos de purificación de carbohidrato de menor peso molecular a partir de subproductos sólidos y/o impurezas tóxicas.

En otro aspecto, se proporcionan procedimientos de elaboración de un producto o productos que incluyen combinar células biocatalizadoras de un microorganismo y una alimentación de biomasa en un medio, donde la alimentación de biomasa contiene carbohidratos de menor peso molecular y sólidos no separados y/u otros líquidos de pretratamiento e hidrólisis, y fermentar el material de biomasa en condiciones y durante un tiempo suficiente para producir un biocombustible, producto químico o productos finales fermentativos, p. ej. etanol, propanol, hidrógeno, ácido succínico, lignina, terpenoides y similares como se describe anteriormente.

En otro aspecto, se proporcionan también en la presente memoria productos elaborados mediante cualquiera de los procesos descritos en la presente memoria.

La Figura 9 es un ejemplo de un procedimiento de producción de productos químicos a partir de biomasa mediante un primer tratamiento mecánico que consiste en una o más etapas, dependiendo de la condición de la carga de alimentación de biomasa. En una primera etapa, se retiran los desechos por cribado, clasificación u otro medio para retirar material que no contiene carbohidratos. En otra etapa, se trocea la carga de alimentación, se fragmenta, se tritura o se reduce de tamaño de otro modo. Este proceso puede incluir procesamiento en seco o procesamiento en húmedo. Si ocurre el procesamiento en húmedo, puede hincharse la carga de alimentación con vapor o agua caliente y aplicarse presión para ablandar o hinchar las fibras en el material. El material puede triturarse entonces a partículas de muy pequeño tamaño. Si la carga de alimentación es leñosa, se espera que la mayoría del procesamiento será troceamiento. Si está presente una carga de alimentación más maleable, trituración, agitación con vórtice o incluso solo agua caliente y presión pueden ser todo lo necesario. Se espera que la biomasa se reduzca de tamaño hasta un polvo fino o lodo (si está húmeda) para procesamiento adicional, si es necesario, antes de pretratamiento adicional para producir celulosa y hemicelulosa más accesible antes de la hidrólisis enzimática de estos polímeros.

Se trata entonces la biomasa con un ácido a temperatura y presión elevadas en una unidad de hidrólisis. Puede calentarse la biomasa en primer lugar mediante la adición de agua caliente o vapor. Puede acidificarse la biomasa burbujeando dióxido de azufre gaseoso a través de la biomasa que está suspendida en agua, o añadiendo un ácido fuerte, p. ej. ácido sulfúrico, clorhídrico o nítrico con o sin precalentamiento/preevaporación/adición de agua. Durante la acidificación, se mantiene el pH a un nivel bajo, p. ej. por debajo de aproximadamente 5. La temperatura y presión pueden ser elevadas después de la adición de ácido. Además del ácido ya en la unidad de acidificación, opcionalmente, puede añadirse una sal metálica; tal como sulfato ferroso, sulfato férrico, cloruro férrico, sulfato de aluminio, cloruro de aluminio, sulfato de magnesio o mezclas de estos para ayudar a la hidrólisis ácida de la biomasa. Se alimenta la biomasa impregnada con ácido a la sección de hidrólisis de la unidad de pretratamiento. Se inyecta vapor en la porción de hidrólisis de la unidad de pretratamiento para poner en contacto directo y calentar la biomasa a la temperatura deseada. La temperatura de la biomasa después de la adición de vapor está, p. ej., entre aproximadamente 130 °C y 220 °C. Se descarga entonces el hidrolizado ácido en la porción del tanque de expansión de la unidad de pretratamiento, y se mantiene en el tanque durante un periodo de tiempo para hidrolizar adicionalmente la biomasa, p. ej. a oligosacáridos y sacáridos monoméricos. Pueden usarse otros procedimientos también para descomponer adicionalmente biomasa. Como alternativa, la biomasa puede someterse a descarga a través de un cierre a presión durante cualquier proceso de pretratamiento a alta presión. Se descarga entonces el

hidrolizado del reactor de pretratamiento, con o sin la adición de agua, p. ej. a concentraciones de sólidos de entre aproximadamente 10 % y 60 %.

Después del pretratamiento, puede deshidratarse la biomasa y/o lavarse con una cantidad de agua, p. ej. por aplastamiento o centrifugación, o por filtración usando, p. ej., un extractor a contracorriente, prensa de lavado, filtro prensa, extractor de transportador de tornillo o extractor de cinta a vacío para retirar el fluido acidificado. Pueden recogerse los fluidos de lavado para concentrar los sacáridos C5 en la corriente de lavado. Puede reutilizarse el fluido acidificado, con o sin tratamiento adicional, p. ej. adición de álcali (p. ej. cal) y/o amoníaco (p. ej., fosfato de amonio), p. ej. en la porción de acidificación de la unidad de pretratamiento, o añadirse a la fermentación, o recogerse para otro uso/tratamiento. Pueden derivarse productos del tratamiento del fluido acidificado, p. ej. yeso o fosfato de amonio. Pueden añadirse enzimas o una mezcla de enzimas durante el pretratamiento para hidrolizar, p. ej., endoglucanasas, exoglucanasas, celobiohidrolasas (CBH), beta-glucosidasas, glicósido hidrolasas, glicosiltransferasas, alfa-amilasas, quitinasas, pectinasas, liasas y esterasas activas contra componentes de celulosa, hemicelulosa, pectina y almidón, en la hidrólisis de componentes de alto peso molecular.

Es un aspecto de esta invención la reducción del tamaño y la uniformidad de las partículas de biomasa, se use una única carga de alimentación o cargas de alimentación mixtas. Sin limitarse por la teoría, se cree que se consigue un inesperado aumento de la conversión de la carga de alimentación en sacáridos fermentables si el tamaño de cualquier carga de alimentación alimentada al reactor de hidrólisis enzimática es pequeño y uniforme, siempre que esté presente suficiente enzima para la hidrólisis de la carga de alimentación. Si la carga de alimentación celulósica que se alimenta a un reactor de explosión de agua caliente, ácido o vapor no es uniforme y no puede tratarse uniformemente, entonces se activa y/o hidroliza un menor porcentaje de los sitios disponibles de la carga de alimentación de lo esperado. Adicionalmente, es difícil mezclar partículas de gran tamaño y procesar un lote de material heterogéneo de tal modo que calor y humedad se distribuyan regularmente; dando resultado por tanto una reacción de autohidrólisis irregular. La transferencia regular de calor, productos químicos y humedad da como resultado un tiempo de procesamiento reducido, menos liberación de inhibidores y una liberación mejorada de hemicelulosa y celulosa, especialmente celulosa microcristalina. Si la temperatura en partes de la carga de alimentación en procesamiento es demasiado alta, entonces cierto porcentaje de los sacáridos de hemicelulosa se degrada a compuestos inhibidores. Adicionalmente, un calor regular previene la carbonización del material, que puede conducir a pérdidas significativas de sacáridos. Esto previene también la subcocción, que puede conducir a celulosa no hidrolizada durante la hidrólisis enzimática.

Las cargas de alimentación pretratadas en cualquiera de las condiciones descritas anteriormente, que se reducen a un tamaño uniforme de menos de 1,5 mm, o 1 mm de tamaño (p. ej., longitud, anchura, altura o diámetro) se hidrolizan entonces con enzimas, reduciendo los polímeros de carbohidrato a disacáridos o sacáridos monoméricos. En una realización, se reduce el tamaño de partícula, donde aproximadamente todas las partículas son de 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 mm de diámetro (o longitud, anchura o altura). En una realización donde se usan enzimas aisladas, la adición estándar o «carga normal» es de 5 % (5 kg)/por 100 kg de sólidos de la carga de alimentación, donde los sólidos están a 1-25 % p/v. Las enzimas pueden ser cualquier combinación de celulasas, hemicelulasas, amilasas, lipasas, quitinasas, pectinasas, puluninasas etc., o peroxidasa dependiendo de la combinación y la clase de polímeros en la mezcla de sólidos. En otra realización de esta invención, donde el tamaño de partícula de la carga de alimentación se reduce uniformemente a un tamaño de menos de 1,5 mm o 1 mm de tamaño (p. ej., longitud, anchura, altura o diámetro), la adición de enzima puede reducirse al 20 % (1,0 kg por 100 kg de sólidos), 25 % (1,25 kg por 100 kg de sólidos), 30 % (1,5 kg por 100 kg de sólidos), 35 % (1,75 kg por 100 kg de sólidos), 40 % (2,0 kg por 100 kg de sólidos), 45 % (2,25 kg por 100 kg de sólidos), 50 % (2,50 kg por 100 kg de sólidos), 55 % (2,75 kg por 100 kg de sólidos), 60 % (3,0 kg por 100 kg de sólidos), 65 % (3,25 kg por 100 kg de sólidos), 70 % (3,5 kg por 100 kg de sólidos), 75 % (3,75 kg por 100 kg de sólidos), 80 % (4,0 kg por 100 kg de sólidos), 85 % (4,25 kg por 100 kg de sólidos) o 90 % (4,5 kg por 100 kg de sólidos) de una carga normal. Preferentemente, la adición de enzima total es de 1 % (1 kg) por 100 kg de sólidos para partículas de menos de 1 mm y que son consistentes en diámetro o longitud. En otra realización de esta invención, donde el tamaño de partícula de la carga de alimentación se reduce uniformemente a un tamaño de menos de 1,5 mm, o 1 mm de tamaño (p. ej. longitud, anchura, altura o diámetro), la adición de enzima puede reducirse al 15 % (0,75 kg por 100 kg de sólidos), 10 % (0,5 kg por 100 kg de sólidos), 5 % (0,25 kg por 100 kg de sólidos), 2 % (0,1 kg por 100 kg de sólidos), 1 % (0,05 kg por 100 kg de sólidos) de una carga normal, 0,5 % (0,025 kg por 100 kg de sólidos) de una carga normal, 0,25 % (0,0125 kg por 100 kg de sólidos) o 0,1 % (0,005 kg por 100 kg de sólidos) de una carga normal.

La viabilidad comercial de un proceso de hidrólisis depende del carácter la carga de alimentación proporcionada a la unidad de hidrólisis. Si se proporciona tal carga de alimentación activada a una unidad de hidrólisis enzimática, entonces al menos el 60 %, preferentemente más del 75 % y más preferentemente más del 90 % de la celulosa y

hemicelulosas pueden convertirse en sacáridos monoméricos. Esta corriente de proceso rica en sacáridos puede someterse posteriormente a fermentación produciendo una corriente de alcohol. La corriente de alcohol del paso de fermentación (p. ej., la corriente de alcohol bruto) puede tener un contenido de alcohol de aproximadamente 3-22 % v/v, preferentemente de aproximadamente 5-15 % y más preferentemente de aproximadamente 8-12 %.

5

En otra realización, puede usarse una combinación de enzimas aisladas y un microorganismo que produce polimerasas de carbohidrato para hidrolizar los polímeros o polímeros de sacárido en una reacción SSF mediante la que el metabolismo enzimático del microorganismo se suplementa mediante la adición de enzimas. En una realización, las enzimas adicionales son principalmente hemicelulasas y el microorganismo es capaz de producir sacáridos monoméricos u oligómeros C6 a partir de polímeros mediante sus celulasas endógenas propias. Sería un ejemplo levaduras, *C. thermocellum* o *C. beijerinckii*, y el producto producido a partir de sacáridos es un alcohol tal como etanol o butanol. En otra realización, el microorganismo es un microorganismo hidrolizante de C5/C6 tal como *C. phytofermentans*, y el microorganismo es capaz de producir sacáridos monoméricos u oligómeros C5/C6 a partir de polímeros u oligómeros mediante sus propias hemicelulasas y celulasas endógenas, que pueden acceder más fácil y rápidamente a los polímeros y oligómeros de las partículas de biomasa menores tratadas regularmente. En una realización adicional, el microorganismo es un microorganismo hidrolizante de C5/C6 tal como *C. phytofermentans* y la adición de otras enzimas acelera el proceso de fermentación. En cualquiera de los procesos anteriormente descritos, pueden añadirse las enzimas adicionales antes al microorganismo en un proceso SHF o simultáneamente con el microorganismo (SSF), o en un proceso de tipo «alimentado por lotes» donde se añade la enzima exógena parcialmente antes o durante el proceso de fermentación con un microorganismo. El tamaño de partícula reducido puede ayudar a tales microorganismos en la accesibilidad a los polímeros de carbohidrato debido a la disponibilidad de un área superficial aumentada y debido a que la celulosa cristalina está menos estrechamente entramada y está disponible para hidrólisis enzimática. Por estas razones, la cantidad de enzima exógena puede reducirse también.

25

Son ejemplos de tales organismos, además de aquellos descritos anteriormente, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Thermoanaerobium brockii*, *T. reesei*, *Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.*, *Zygmatis sp.*, *Trichosporon cutaneum*, *R. albus*, *B. succinogenes*, *B. fibrisolvens*, *R. flavefaciens*, *E. cellulosolvans*, *C. cellobioparum*, *Chlorella sp.* y similares. También se han desarrollado microorganismos celulolíticos o xilanolíticos recombinantes que expresan celulasas o hemicelulasas heterólogas tales como *S. cerevisiae*, *Z. mobilis*, *E. coli*, *K. marxianus*, *A. aculeatus*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, *Pichia stipitis*, *h. polymorpha*, *Klebsiella oxytoca*, *R. opacus* y similares. Además, hay ejemplos de microorganismos amilolíticos que pueden beneficiarse de la adición de enzimas exógenas para hacer más accesible el almidón. En una realización, son ejemplos de levaduras y bacterias amilolíticas *Saccharomyces castelli*, *S. diastaticus*, *Edomycopsis fibuligera* y *C. thermohydrosulfuricum*.

35

En otra realización, se entendería por los especialistas en la materia que las enzimas de microorganismo fueran más eficientes en tales procesos que aquellas descritas anteriormente, puesto que el pequeño tamaño de partícula beneficia a la enzima del microorganismo. Se aplicarían las mismas ventajas de tamaño de partícula pequeño uniforme y acceso a las fracciones de hemicelulosa y celulosa a cualquier enzima, tanto inmersa en un celulosoma como moléculas de tipo acoplamiento extracelular. La fracción de inhibidor reducida y la celulosa microcristalina disponible adicional pueden reducir los periodos de desfase de crecimiento inicial.

40

Un fermentador, unido o en un sitio separado, puede alimentarse con biomasa hidrolizada, cualquier fracción líquida del pretratamiento de biomasa, un cultivo de semilla activo de un biocatalizador, tal como una levadura, si se desea un microbio cofermentador, p. ej. otra levadura o *E. coli* y, si se requiere, nutrientes para promover el crecimiento del biocatalizador u otros microbios. Como alternativa, la biomasa pretratada o fracción líquida puede dividirse en múltiples fermentadores, que contiene cada uno una cepa diferente de un biocatalizador y/u otros microbios, y funciona cada uno en condiciones físicas específicas. Se permite proceder la fermentación durante un periodo de tiempo, p. ej., de entre aproximadamente 1 y 150 horas, manteniendo una temperatura de, p. ej., entre aproximadamente 25 °C y 50 °C. El gas producido durante la fermentación se barre del fermentador y se descarga, recoge o inflama con o sin procesamiento adicional, p. ej. el gas hidrógeno puede recogerse y usarse como fuente de energía o purificarse como coproducto.

45

En otro aspecto, se proporcionan en la presente memoria procedimientos de elaboración de un combustible o combustibles que incluyen combinar uno o más de biocatalizador y material lignocelulósico (y/u otro material de biomasa) en un medio, añadir una fracción de lignina del pretratamiento y fermentar el material lignocelulósico en condiciones y durante un tiempo suficiente para producir un combustible o combustibles, p. ej., etanol, propanol y/o hidrógeno u otro compuesto químico.

50

En otro aspecto, se proporcionan productos elaborados mediante cualquiera de los procesos descritos en la

60

presente memoria.

#### Sistemas:

- 5 Cualquiera de los procedimientos y/o composiciones descritos en la presente memoria pueden estar comprendidos en un sistema. En un ejemplo no limitante, el sistema comprende: una unidad o recipiente de pretratamiento, una unidad de hidratación, una primera y/o segunda unidad de reducción del tamaño, una unidad de hidrolización y, opcionalmente, una unidad de fermentación. Una o más de las unidades pueden ser unidades separadas o componentes diferentes en un solo sistema. Pueden considerarse diversas combinaciones de unidades para
- 10 inclusión en una carcasa compartida. En algunas realizaciones, el sistema comprende un recipiente de pretratamiento donde el recipiente de pretratamiento comprende una unidad de hidratación, una unidad de reducción del tamaño y una unidad de calentamiento. La unidad de hidratación puede usarse para la hidratación de la composición de biomasa en un medio acuoso de pH no neutro, produciendo una composición de biomasa hidratada como se describe en la presente memoria. La unidad de reducción del tamaño puede usarse para reducción
- 15 mecánica del tamaño de la composición de biomasa hidratada, produciendo partículas sólidas que son homogéneas como se describe en la presente memoria. La unidad de calentamiento puede usarse para calentar la composición de biomasa hidratada durante un tiempo suficiente para producir la composición de biomasa pretratada como se describe en la presente memoria. En una realización, el sistema comprende una unidad de hidrólisis para hidrolizar la composición de biomasa pretratada con una o más enzimas durante un tiempo suficiente para producir la
- 20 composición de sacáridos o polímeros de sacárido C6 y C5 como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, el sistema puede comprender una primera y una segunda unidades de hidratación. En algunas realizaciones, la primera y segunda unidades de hidratación pueden ser la misma unidad, pero usada en diferentes etapas en el procedimiento de pretratamiento. En algunas realizaciones, el sistema comprende una primera y segunda unidades de reducción del tamaño. En algunas realizaciones, la primera y segunda unidades de reducción
- 25 del tamaño son unidades distintas. En algunas realizaciones, la primera y segunda unidades de reducción del tamaño son la misma unidad.

#### **EJEMPLOS**

- 30 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar ciertas realizaciones y aspectos y no han de considerarse como limitantes del alcance de los mismos.

#### Ejemplo 1. Pretratamiento de rastrojo de maíz y paja de trigo

- 35 Esta es una comparación directa de los rendimientos de sacarificación entre composiciones de biomasa pretratadas que comprenden partículas de biomasa lignocelulósica más grandes y heterogéneas (sólidos A) y partículas de biomasa homogéneas pequeñas (sólidos B).

40 Sólidos A es una paja de trigo que se trituró usando técnicas de molienda estándares, produciendo tamaños de partícula de 0,5 a 2,5 cm de longitud con aproximadamente 1 mm de grosor. Estos sólidos se empaparon durante 16 horas a aproximadamente 35 % de sólidos totales en agua que contenía 1 % v/p de ácido sulfúrico basado en el peso seco de los sólidos. Se cargó entonces el material empapado con ácido (pH de aproximadamente 2,9) en un reactor por lotes de explosión de vapor presurizado donde se mantuvo a una temperatura de aproximadamente 200 °C y una presión de 231 psig durante 7,5 minutos antes de la liberación de presión explosiva.

45 Sólidos B es una paja de trigo que se pretrató de acuerdo con los procedimientos divulgados en la presente memoria. Brevemente, se hidrató la paja de trigo con agua que contenía 1,8 % v/p de ácido sulfúrico basado en el peso de biomasa seca durante 15-20 minutos a aproximadamente 50 °C. Se cortó entonces el material hidratado con cuchillas giratorias y se deshidrató a un contenido de sólidos de aproximadamente 30 % por peso de biomasa

50 seca. Se inyectaron los sólidos deshidratados entonces simultáneamente con vapor y se cortaron por un segundo conjunto de cuchillas giratorias, produciendo partículas sólidas de menos de 1,5 mm de tamaño. Se mantuvieron las partículas homogéneas pequeñas a una temperatura de aproximadamente 160 °C a 180 °C y una presión de aproximadamente 135 psig durante aproximadamente 10 minutos antes de la liberación de presión explosiva.

55 Se determinó el contenido de agua tanto de sólidos A como de sólidos B y se ajustó a un contenido de sólidos de aproximadamente 8 % (p/v) de sólidos (contenido de humedad de aproximadamente 85 % (p/v)) usando un tratamiento de empapado de 24 horas. Se ajustaron otras muestras a un contenido de sólidos de 8 % o 10 % de sólidos.

60 La Tabla 1 muestra el porcentaje de celulosa, hemicelulosa, lignina y otros componentes de rastrojo de maíz y paja

de trigo

Tabla 1

% de composición	Rastrojo de maíz	Paja de trigo
Celulosa-C6	49,4	38,0
Hemicelulosa Xilano- C5	22,9	23,3
Lignina	20,6	21
Otros	7,1	13,4

5 Ejemplo 2. Sacarificación

Las enzimas hemicelulasa y celulasa usadas se proporcionaron por Novozymes (Novozymes A/S, Krogshoejvej 36, 2880 Bagsvaerd Dinamarca), Cuando se hace referencia a la dosificación de una enzima (p. ej., 1x o 5 % basada en sólidos secos (v/p)), significa que las enzimas se combinaron conjuntamente para dar un 5 % total basado en sólidos secos. Todas las muestras se analizaron usando HPLC y una columna Bio-Rad HPX-87H Aminex.

Se usaron los procedimientos del Standard National Renewable Energy Laboratory (NREL) para determinar los rendimientos teóricos de sacáridos C6 y C5 por HPLC, incluyendo lignina y productos extractivos. Véase A Sluiter, y col., Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass (NREL, revisado en junio de 2010). Brevemente, se efectúa una hidrólisis con ácido sulfúrico al 72 % en los sólidos de biomasa secados de entrada. Los resultados de la hidrólisis con ácido al 72 % indican el contenido de carbohidrato total de los sólidos de biomasa secados. Este se considera la cantidad máxima teórica de azúcares. Se compara entonces la cantidad de azúcares liberados, medida por HPLC, con el máximo teórico de azúcares que pueden liberarse de una masa dada de sólidos de partida.

Las Tablas 2 y 3 comparan directamente los sólidos tomados de material tratado A y B. Se ajustaron ambos conjuntos de sólidos a 8 % de sólidos (p/v) y se hidrolizaron usando 1x la dosificación enzimática estándar (5 % de carga basada en los sólidos secos totales)(v/p). Las Tablas muestran la conversión porcentual de xilano y celulosa basándose en los rendimientos teóricos totales de sacáridos en la biomasa.

Antes de la hidrólisis enzimática, los sólidos B contenían un rendimiento teórico de 87,42 % de xilosa. En comparación, los sólidos A no contenían xilosa. Después de solo 21 h, las tasas de conversión para celulosa y xilano son sorprendentemente superiores para los sólidos B (p. ej., después de la reducción del tamaño de partícula y en material homogéneo). La corriente de sacárido xilosa es también de apariencia más transparente, indicando la reducción de inhibidores.

Tabla 2

% de f de «A» - 8 % de sólidos en 1x enzimas				
Tiempo (horas)	0	21	48	96
Glucosa	0,00	79,94	89,62	92,88
Xilosa	0,00	86,87	97,63	103,79

Tabla 3

% de conversión de «B» - 8 % de sólidos en 1x enzimas				
Tiempo (horas)	0	21	48	96
Glucosa	0,00	91,78	98,39	98,47
Xilosa	87,42	93,06	100,71	102,39

Las Tablas 4 y 5 comparan directamente los sólidos tomados de material tratado A y B, donde se ajustaron ambos conjuntos de sólidos a 8 % de sólidos (p/v) y se hidrolizaron usando 0,5x dosificación enzimática estándar (carga de 2,5 % basada en los sólidos secos totales)(v/p). Las Tablas muestran la conversión porcentual de xilano y celulosa basada en los rendimientos teóricos totales de sacáridos en la biomasa. De nuevo, lleva solo 21 h demostrar que las tasas de conversión para celulosa y xilano son altamente superiores después de la reducción del tamaño de partícula y en material homogéneo. La corriente del sacárido glucosa muestra una conversión casi completa después de 48-96 h.

Tabla 4

% de conversión de «A» - 8 % de sólidos en 0,5x enzimas				
Tiempo (horas)	0	21	48	96

Glucosa	0,00	57,72	67,62	73,43
Xilosa	0,00	79,14	91,49	97,49

Tabla 5

% de conversión de «B» - 8 % de sólidos en 0,5x enzimas				
Tiempo (horas)	0	21	48	96
Glucosa	0,00	81,29	98,25	98,01
Xilosa	87,42	91,50	99,72	99,61

Las Tablas 6 y 7 comparan directamente los sólidos tomados de material tratado A y B, donde se ajustaron ambos conjuntos de sólidos a 8 % de sólidos (p/v) y se hidrolizaron usando 0,25x dosificación enzimática estándar (carga de 1,25 % basada en los sólidos secos totales)(v/p). Las Tablas muestran la conversión porcentual de xilano y celulosa basada en los rendimientos teóricos totales de sacáridos en la biomasa. En todos los puntos temporales, incluso reduciendo la adición de enzima a solo un cuarto de los niveles recomendados, las tasas de conversión para celulosa y xilano son altamente superiores después de la reducción del tamaño de partícula y en material homogéneo.

Tabla 6

% de conversión de «A» - 8 % de sólidos en 0,25x enzimas				
Tiempo (horas)	0	21	48	96
Glucosa	0,00	35,68	45,86	55,29
Xilosa	0,00	67,24	86,58	96,76

Tabla 7

% de conversión de «B» - 8 % de sólidos en 0,25x enzimas				
Tiempo (horas)	0	21	48	96
Glucosa	0,00	57,32	78,18	90,06
Xilosa	87,42	88,90	98,23	98,69

Las Tablas 8 y 9 comparan directamente los sólidos tomados de material tratado A y B, donde se ajustaron ambos conjuntos de sólidos a 10 % de sólidos (p/v) y se hidrolizaron usando 1x dosificación enzimática estándar (carga de 5 % basada en los sólidos secos totales)(v/p). Las Tablas muestran la conversión porcentual de xilano y celulosa basada en los rendimientos teóricos totales de sacáridos en la biomasa. En todos los puntos temporales, las tasas de conversión para celulosa y xilano son altamente superiores después de la reducción del tamaño de partícula y en material homogéneo, mostrando claramente que, incluso bajo una alta carga de sólidos, la biomasa B se mezcla más regularmente y proporciona mejor acceso de enzima a polímeros de celulosa y hemicelulosa.

Tabla 8

% de conversión de «A» - 10 % de sólidos en 1x enzimas				
Tiempo (horas)	0	21	48	96
Glucosa	0,00	74,15	84,24	86,89
Xilosa	0,00	86,89	97,75	102,30

Las Tablas 10 y 11 comparan directamente los sólidos tomados de material tratado A y B, donde se ajustaron ambos conjuntos de sólidos a 10 % de sólidos (p/v) y se hidrolizaron usando 0,5x dosificación enzimática estándar (carga de 0,25 % basada en los sólidos secos totales)(p/v). Las Tablas muestran la conversión porcentual de xilano y celulosa basada en los rendimientos teóricos totales de sacáridos en la biomasa. Con la mitad del complemento normal de enzima, las tasas de conversión para celulosa y xilano son altamente superiores después de la reducción del tamaño de partícula y en material homogéneo, mostrando claramente que, incluso bajo una alta carga de sólidos, la biomasa B se mezcla más regularmente y proporciona mejor acceso de enzima a polímeros de celulosa y hemicelulosa.

Tabla 10

% de conversión de «A» - 10 % de sólidos en 0,5x enzimas				
Tiempo (horas)	0	21	48	96
Glucosa	0,00	57,75	73,38	74,83
Xilosa	0,00	77,37	97,75	94,04

Tabla 11

% de conversión de «B» - 10 % de sólidos en 0,5x enzimas				
Tiempo (horas)	0	21	48	96
Glucosa	0,00	76,00	92,72	93,41
Xilosa	87,42	94,66	100,41	101,19

- 5 Las Tablas 12 y 13 comparan directamente los sólidos tomados de material tratado A y B, donde se ajustaron ambos conjuntos de sólidos a 10 % de sólidos (p/v) y se hidrolizaron usando 0,25x dosificación enzimática estándar (carga de 1,25 % basada en los sólidos secos totales)(v/p). Las Tablas muestran la conversión porcentual de xilano y celulosa basada en los rendimientos teóricos totales de sacáridos en la biomasa. En todos los puntos temporales, las tasas de conversión para celulosa y xilano son altamente superiores después de la reducción del tamaño de partícula y en material homogéneo, mostrando claramente que, incluso bajo una alta carga de sólidos, la biomasa B se mezcla más regularmente y proporciona mejor acceso de enzima a polímeros de celulosa y hemicelulosa.

Tabla 12

% de conversión de «A» - 10 % de sólidos en 0,25x enzimas				
Tiempo (horas)	0	21	48	96
Glucosa	0,00	40,02	49,98	55,24
Xilosa	0,00	68,98	82,52	88,08

15

Tabla 13

% de conversión de «B» - 10 % de sólidos en 0,25x enzimas				
Tiempo (horas)	0	21	48	96
Glucosa	0,00	62,22	83,96	95,23
Xilosa	87,42	91,92	100,41	102,67

Para resumir estos datos, las Figuras 1-4 muestran una comparación directa del porcentaje de conversión de polímero en sacárido con cada dosificación enzimática (1x, 0,5x y 0,25x) así como la comparación directa entre el porcentaje de sólidos usado durante la hidrólisis enzimática (8 % y 10 %).

20

Además de los sólidos al 8 % y 10 %, se ensayaron también sólidos al 20 % con dosis de enzima reducidas. Se procesó paja de trigo como se describe anteriormente para «B» y se constituyeron los sólidos al 20 % p/v antes de la adición enzimática. Las Figuras 5, 6 y 7 comparan directamente la sacarificación de conjuntos de paja de trigo que se ajustaron a 20 % de sólidos (p/v) y se hidrolizaron usando 1,0x, 0,50x y 0,25x la dosificación enzimática estándar (v/p). La Figura 5 muestra que las conversiones porcentuales de xilano y celulosa basadas en los rendimientos teóricos totales de sacáridos en la biomasa son rápidas y muy altas, sugiriendo que hay poca, o ninguna, actividad inhibitoria. La Figura 6 muestra solo una ligera reducción de la conversión de glucosa para media dosis de enzimas y la tasa de conversión de C5 permanece muy alta. La Figura 7 muestra una ligera reducción de la conversión de xilosa a partir de xilano y una tasa de conversión más lenta de glucosa a partir de celulosa. En todos los puntos temporales, las tasas de conversión para celulosa y xilano eran aún considerables después de la reducción del tamaño de partícula y en material homogéneo, mostrando claramente que, incluso bajo una alta carga de sólidos, la biomasa B se mezcla más regularmente y proporciona mejor acceso de enzima a polímeros de celulosa y hemicelulosa.

35 Ejemplo 3: pretratamiento e hidrólisis de mazorcas de maíz

En este ejemplo, se pretrataron e hidrolizaron mazorcas de maíz como se describe para los sólidos B en los Ejemplos 1 y 2. Se hidrolizaron las mazorcas de maíz a un 10 % de sólidos por peso de biomasa seca usando una carga enzimática del 5 % v/p (1x). Se midieron los rendimientos de glucosa y xilosa a las 0, 24 y 68 horas de hidrólisis. Los resultados se tabulan en la Tabla 14 y se grafican en la Figura 8. A tiempo 0, el rendimiento porcentual de hemicelulosa era del 88,08 % del máximo teórico, mientras que el rendimiento de glucosa era del 13,60 % del máximo teórico. A las 24 horas, el rendimiento de glucosa había aumentado a más del 80 % del máximo teórico y se conseguía un rendimiento del 95 % después de solo 68 horas de hidrólisis enzimática.

40

Tabla 14

Tiempo	0	24	68
Glucosa (g/l)	6,2	31,2	36,1
Xilosa (g/l)	24,9	29,3	29,8
Arabinosa (g/l)	1,7	2,7	3
% de glucosa	13,59649	82,10526	95
% de hemicelulosa	88,07947	105,9603	108,6093

Ejemplo 4: pretratamiento de biomasa para liberar polímeros de sacárido solubles

- 5 Se pretrata e hidroliza biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa liberando polímeros de sacárido solubles. Se hidrata la biomasa con agua a 50 °C durante 1-30 min. Se corta el material hidratado por cuchillas giratorias y se deshidrata a un contenido de sólidos de aproximadamente 25-30 % por peso de biomasa seca. Se inyectan los sólidos deshidratados simultáneamente con vapor y se cortan por un segundo conjunto de
- 10 cuchillas giratorias, produciendo partículas sólidas de menos de 1,5 mm de tamaño. Se mantienen las partículas homogéneas pequeñas a una temperatura de aproximadamente 160 °C a 180 °C y una presión de aproximadamente 135 psig durante aproximadamente 10-30 minutos antes de la liberación de presión explosiva. Se separa entonces una primera corriente o población de polímeros de sacárido de las partículas homogéneas y se mide el rendimiento de polímeros de sacárido en la corriente.
- 15 Se hidrolizan entonces adicionalmente las partículas homogéneas por hidrólisis ácida, liberando una segunda corriente o población de polímeros de sacárido (por ejemplo, polímeros de celulosa) a partir de lignina. Para hidrólisis ácida, se ajusta el contenido de agua de los sólidos a un contenido de sólidos del 20-25 % (p/v) en agua que contiene 1 % v/p de ácido sulfúrico basado en el peso seco de los sólidos, y se calienta a una temperatura de
- 20 aproximadamente 140 °C a 220 °C y una presión de aproximadamente 135-260 psig durante aproximadamente 10-30 minutos, produciendo una segunda corriente o población de polímeros de sacárido. Los rendimientos de polímeros de sacárido a partir de esta corriente se miden entonces a diversos intervalos de tiempo.

Ejemplo 5: pretratamiento de biomasa para liberar polímeros de sacárido solubles.

- 25 Se pretrata e hidroliza biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa liberando polímeros de sacárido solubles. Se hidrata la biomasa con agua a 50 °C durante 1-30 min. Se corta el material hidratado por cuchillas giratorias y se deshidrata a un contenido de sólidos de aproximadamente 25-30 % por peso de biomasa seca. Se inyectan los sólidos deshidratados simultáneamente con vapor y se cortan por un segundo conjunto de
- 30 cuchillas giratorias, produciendo partículas sólidas de menos de 1,5 mm de tamaño. Se mantienen las partículas homogéneas pequeñas a una temperatura de aproximadamente 160 °C a 180 °C y una presión de aproximadamente 135 psig durante aproximadamente 10-30 minutos antes de la liberación de presión explosiva.
- 35 Se determina el contenido de agua de los sólidos y se ajusta a un contenido de sólidos de aproximadamente 8 %-10 % (p/v) de sólidos (contenido de humedad de aproximadamente 85 % (p/v)). Se hidrolizan entonces con ácido los sólidos para liberar los polímeros de celulosa. La hidrólisis ácida con 1-5 % de ácido sulfúrico, sulfuroso u otros ácidos débiles libera los polímeros de sacárido de la lignina e hidroliza la hemicelulosa a monómeros (xilosa, arabinosa, etc.). Esto se completa a una temperatura que oscila de 140-220 °C y bajo presión (135-260 psig). Los monómeros de hemicelulosa y polímeros de sacárido pueden utilizarse en una fermentación, donde las celulasas
- 40 endógenas de un microorganismo y/o celulasas exógenas hidrolizan adicionalmente los polímeros de celulosa a monómeros y se metabolizan en productos por el microorganismo.

Aunque se han mostrado y descrito en la presente memoria realizaciones preferidas de la presente invención, será obvio para los especialistas en la materia que tales realizaciones se proporcionan solo a modo de ejemplo. Se les

45 ocurrirán ahora numerosas variaciones, cambios y sustituciones a los especialistas en la materia sin apartarse de la invención. Debería entenderse que pueden emplearse diversas alternativas a las realizaciones de la invención descrita en la presente memoria en la práctica de la invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que se cubran por las mismas los procedimientos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes.

50

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de producción de una composición que comprende sacáridos C5 y C6 a partir de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa, comprendiendo el 5 procedimiento:
- (a) pretratar la composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa produciendo una composición de biomasa tratada que comprende partículas sólidas, donde al menos un 50 % de las partículas sólidas son de menos de 1,5 mm en una o más dimensiones de tamaño, y monosacáridos y/o disacáridos C5 con un 10 rendimiento que es al menos un 50 % del máximo teórico, donde el pretratamiento comprende:
- (i) hidratación de la composición de biomasa en un medio acuoso de pH no neutro que comprende uno o más ácidos produciendo una composición de biomasa hidratada,
- (ii) reducción mecánica del tamaño de la composición de biomasa hidratada produciendo partículas sólidas, y
- 15 (iii) calentamiento de la composición de biomasa hidratada durante un tiempo suficiente para producir la composición de biomasa pretratada que comprende monosacáridos y/o disacáridos C5 con un rendimiento que es al menos un 50 % del máximo teórico; e
- (b) hidrolizar la composición de biomasa pretratada con una o más enzimas durante un tiempo suficiente para 20 producir la composición que comprende los sacáridos C5 y C6.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la una o más dimensiones de tamaño son longitud, anchura, altura o diámetro.
- 25 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, donde al menos el 50 % de las partículas sólidas en la composición de biomasa pretratada son de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1 mm en la una o más dimensiones de tamaño.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la composición que comprende 30 sacáridos C6 y C5 comprende adicionalmente uno o más inhibidores de la fermentación.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, donde el uno o más inhibidores de la fermentación comprenden furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) o uno o más ácidos orgánicos.
- 35 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el rendimiento de monosacáridos y/o disacáridos C5 es de al menos el 80 % del máximo teórico.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el medio acuoso de pH no neutro está a una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 70 °C. 40
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el calentamiento de la composición de biomasa hidratada es a una temperatura de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 250 °C.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el calentamiento de la 45 composición de biomasa hidratada es a una presión de aproximadamente 25 psig (172368,9 newton por metro cuadrado) a aproximadamente 250 psig (1723689,3 newton por metro cuadrado).
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde pretratar la composición de biomasa comprende adicionalmente deshidratar la composición de biomasa hidratada de aproximadamente 10 % a 50 aproximadamente 40 % de sólidos por peso de biomasa seca antes del calentamiento.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde la composición de biomasa comprende alfalfa, algas, bagazo, bambú, rastrojo de maíz, mazorcas de maíz, granos de maíz, pasta de maíz, líquido de maceración del maíz, sólidos de maceración del maíz, granos de destilería, productos solubles de destilería secados, granos de destilería secados, productos solubles de destilería condensados, granos de destilería húmedos, granos de destilería secados con productos solubles, eucalipto, desechos alimentarios, peladuras de fruta, residuos de jardinería, hierba, cáscaras de grano, plantas de cultivo modificadas, desechos municipales, cáscaras de avena, papel, pulpa de papel, hierba de tallo azul, álamo, cáscaras de arroz, cáscaras de semilla, forraje, sorgo, paja, caña de azúcar, pasto aguja, trigo, paja de trigo, salvado de trigo, salvado de trigo desalmidonado, sauces, 60 madera, células vegetales, cultivos de tejido vegetal, cultivos de tejido o una combinación de los mismos.

12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el medio acuoso no neutro comprende el uno o más ácidos a aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 % v/p por peso de biomasa seca.
- 5 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el uno o más ácidos comprenden ácido sulfúrico, ácido peroxiacético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido sulfuroso, ácido cloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido oxálico, ácido benzoico o una combinación de los mismos.
- 10 14. Un procedimiento de producción de uno o más alcoholes a partir de una composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa, comprendiendo el procedimiento:
- (a) pretratar la composición de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa, produciendo una composición de biomasa pretratada que comprende partículas sólidas, donde al menos el 50 % de las partículas
- 15 sólidas son de menos de 1,5 mm en una o más dimensiones de tamaño y una primera población de polímeros de sacárido, donde el pretratamiento comprende:
- (i) hidratar la composición de biomasa en un medio acuoso, produciendo una composición de biomasa hidratada,
- (ii) reducir la composición de biomasa hidratada por reducción mecánica del tamaño, produciendo partículas
- 20 sólidas, y
- (iii) calentar la composición de biomasa hidratada durante un tiempo suficiente para producir la composición de biomasa pretratada que comprende partículas sólidas, donde al menos el 50 % de las partículas sólidas son de menos de 1,5 mm en la una o más dimensiones de tamaño y la primera población de polímeros de sacárido; e
- 25 (b) hidrolizar y fermentar la composición de biomasa pretratada con uno o más microorganismos durante un tiempo suficiente para producir el uno o más alcoholes.
15. El procedimiento de la reivindicación 14, donde el uno o más alcoholes comprenden etanol.

FIGURA 1

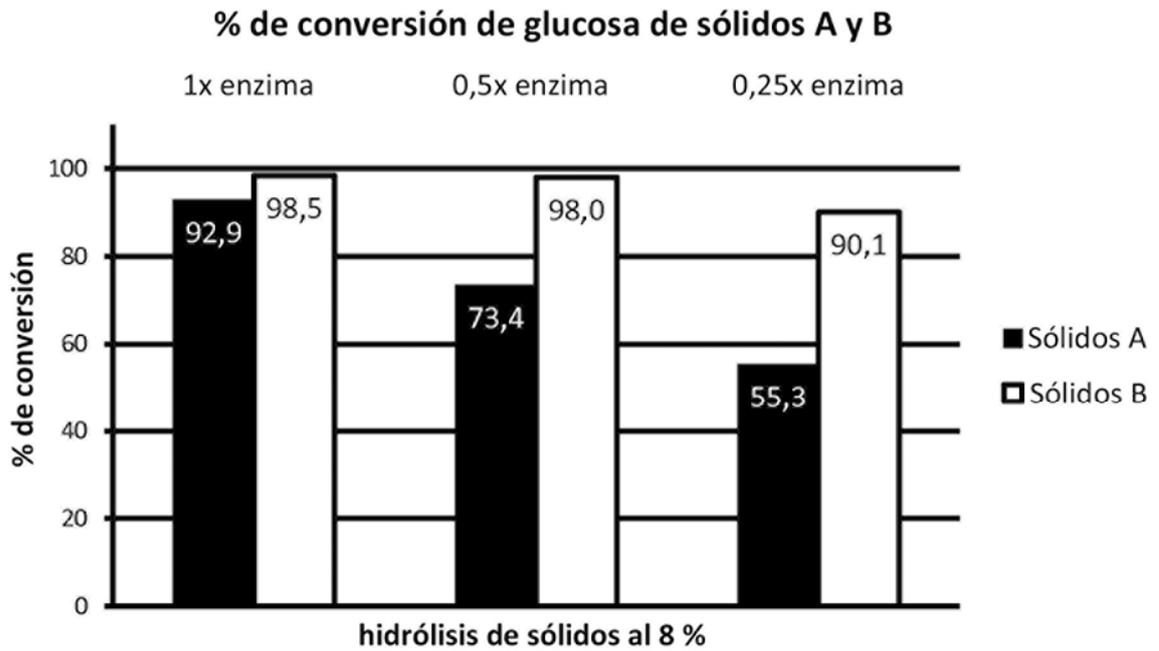


FIGURA 2

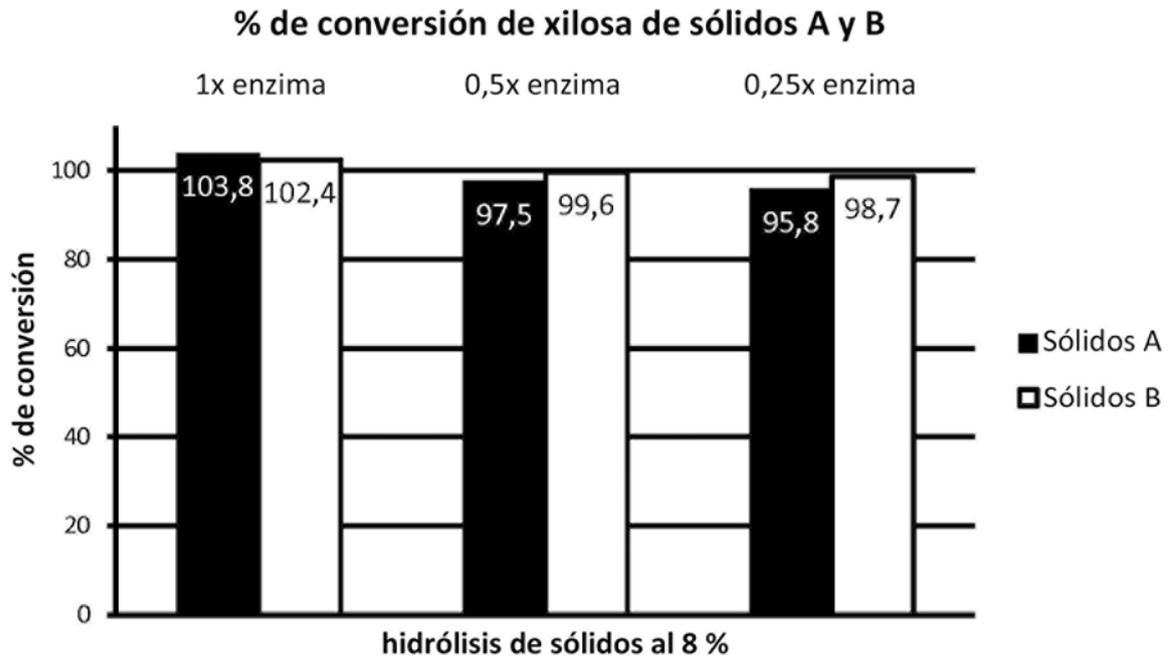


FIGURA 3

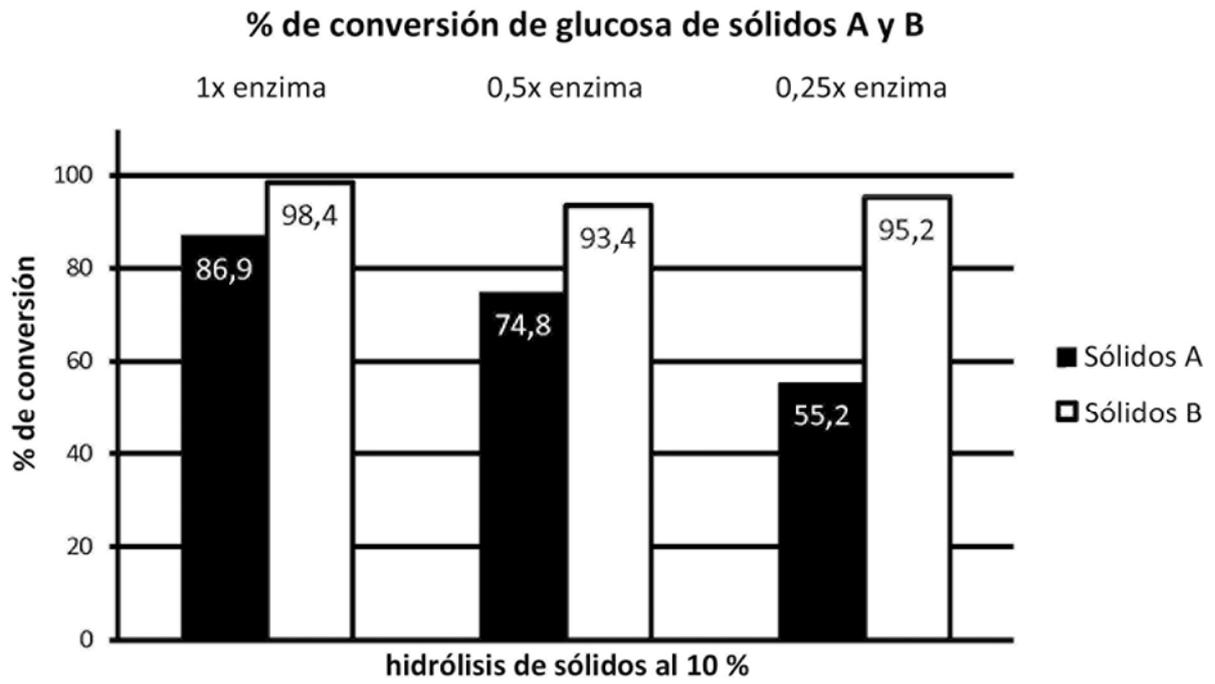


FIGURA 4

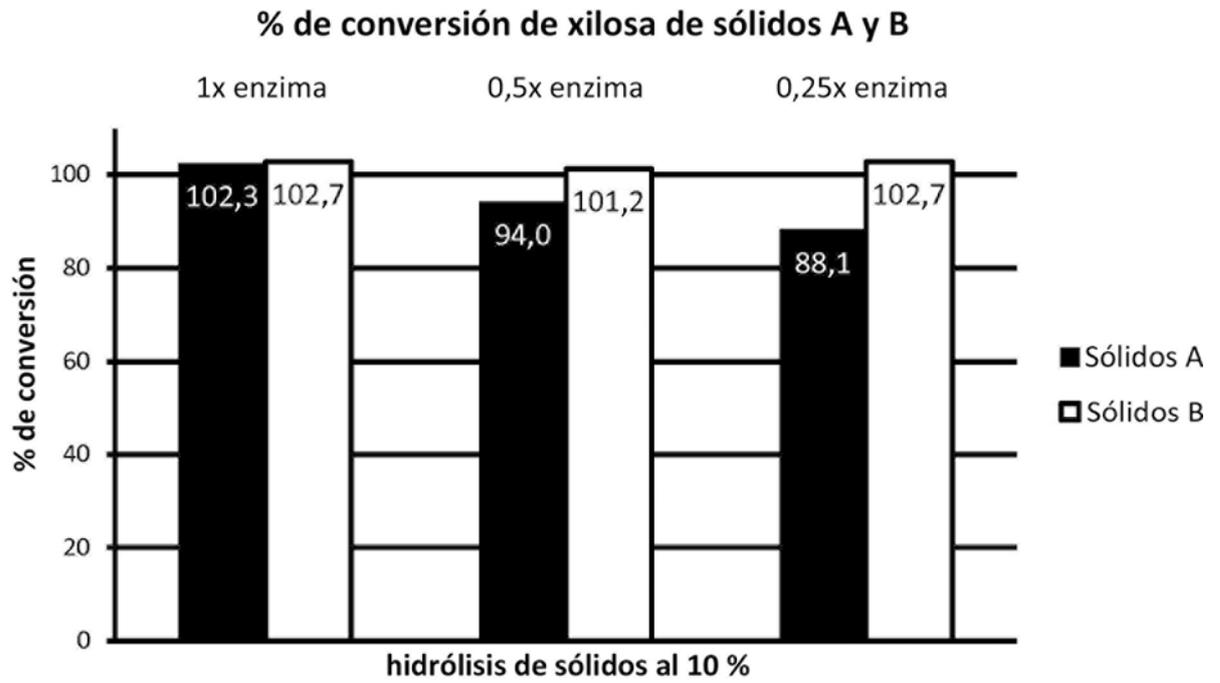


FIGURA 5

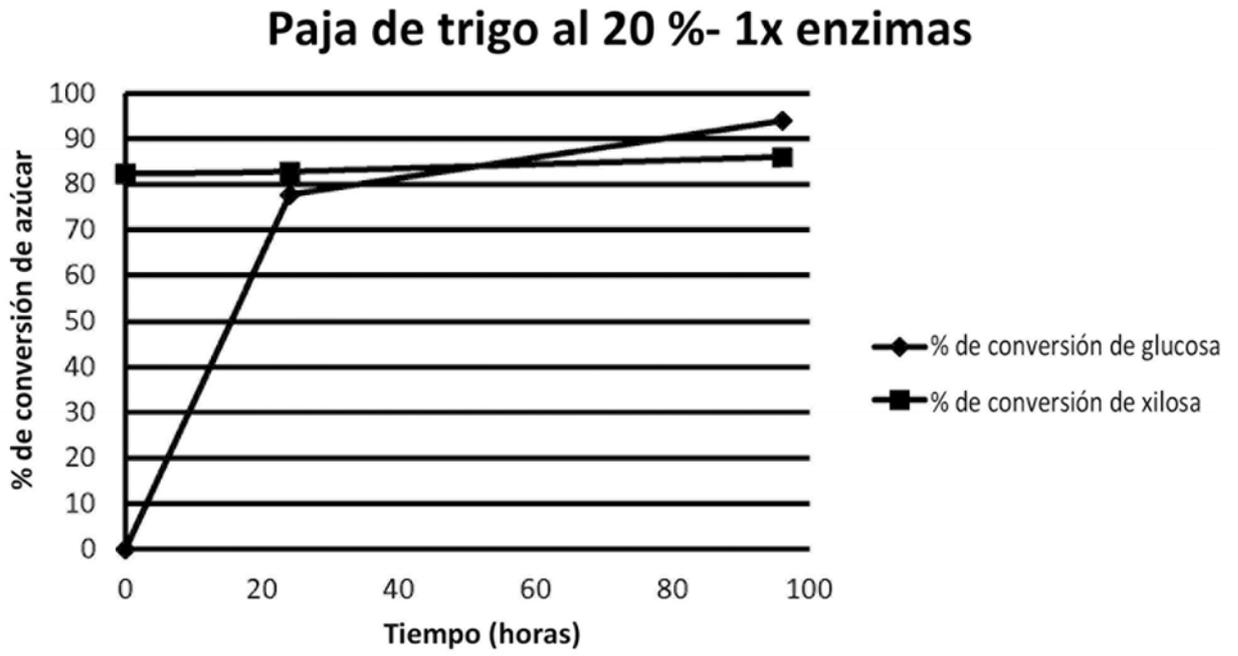


FIGURA 6

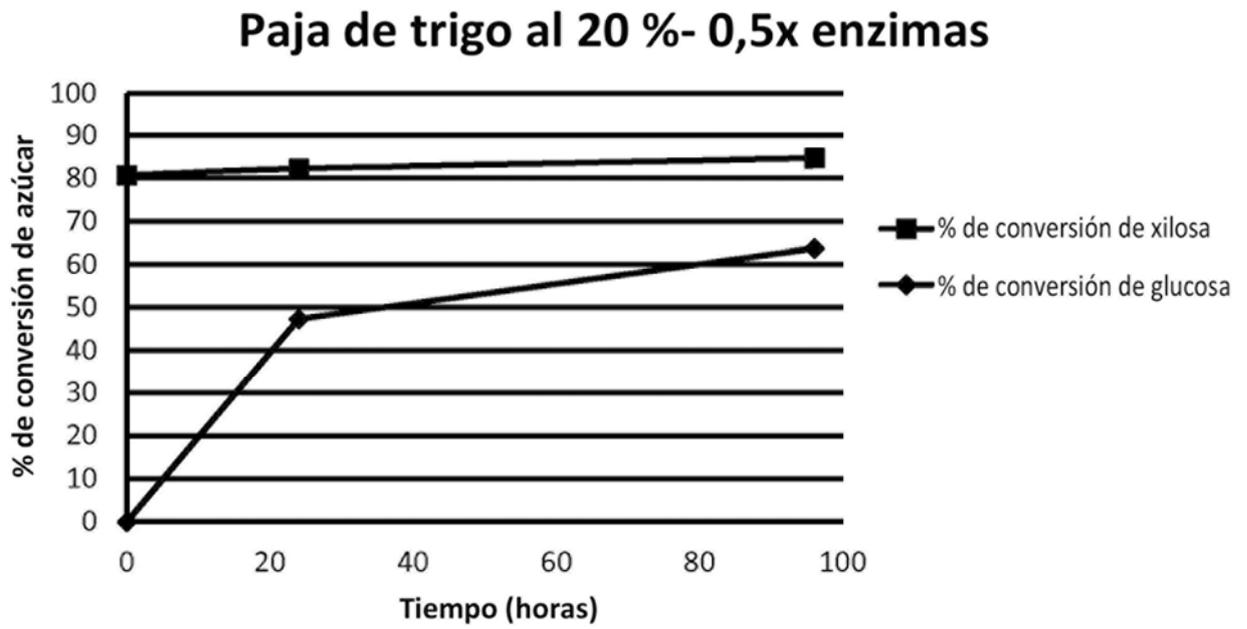


FIGURA 7

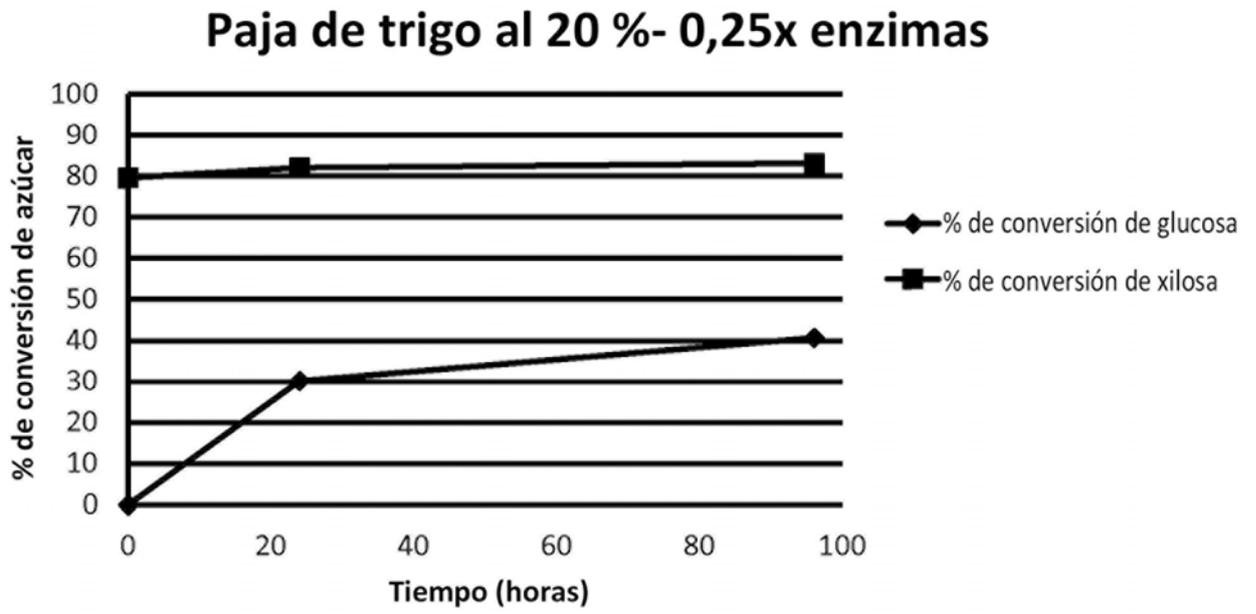


FIGURA 8

**Mazorcas de maíz al 10 % de sólidos- 5 % de enzima**

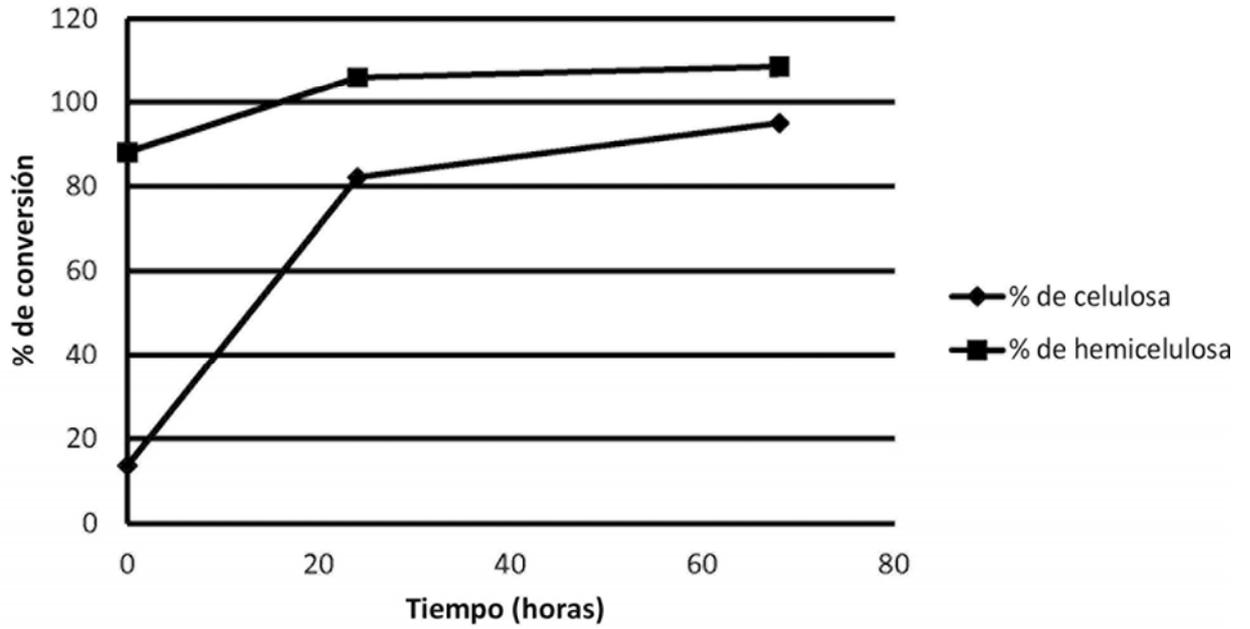


FIGURA 9

