

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0612937-4 A2**

(22) Data de Depósito: 12/04/2006
(43) Data da Publicação: 07/12/2010
(RPI 2083)



* B R P I 0 6 1 2 9 3 7 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*
C12M 1/40

(54) Título: **SISTEMA DE PROCESSAMENTO DE BIOMASSA EM BATELADAS, PROCESSOS DE TRATAMENTO DE BIOMASSA, PROCESSO DE TRATAMENTO PRÉVIO DE BIOMASSA, PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO DE BIOMASSA E MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO DE TRATAMENTO**

(30) Prioridade Unionista: 12/04/2005 US 60/670,437

(73) Titular(es): E.I. Du Pont De Nemours And Company

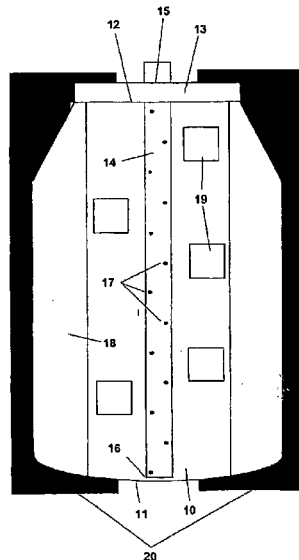
(72) Inventor(es): James B. Dunson, Melvin Tucker, Richard Elander, Robert C. Lyons

(74) Procurador(es): Priscila Penha de Barros Thereza

(86) Pedido Internacional: PCT US2006014147 de 12/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/110902 de 19/10/2006

(57) Resumo: SISTEMA DE PROCESSAMENTO DE BIOMASSA EM BATELADAS, PROCESSOS DE TRATAMENTO DE BIOMASSA, PROCESSO DE TRATAMENTO PRÉVIO DE BIOMASSA, PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO DE BIOMASSA E MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO DE TRATAMENTO. É apresentado um sistema que inclui um aparelho para tratamento de biomassa que permite o tratamento bem sucedido de biomassa em alto peso seco de sólidos de biomassa na mistura de biomassa. O projeto do sistema fornece extensa distribuição de reagente por meio da difusão do reagente sobre a biomassa à medida que o reagente é introduzido através de lança de injeção, enquanto a biomassa é girada utilizando pás (18). O sistema de aparelho fornece extensa assimilação do reagente na biomassa utilizando pás (18) para erguer e deixar cair a biomassa, bem como meios de atrito (19) que caem sobre a biomassa para melhorar o processo de tratamento.



**“SISTEMA DE PROCESSAMENTO DE BIOMASSA EM BATELADAS,
PROCESSOS DE TRATAMENTO DE BIOMASSA, PROCESSO DE
TRATAMENTO PRÉVIO DE BIOMASSA, PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO
DE BIOMASSA E MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO DE
TRATAMENTO”**

5

O presente pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório Norte-Americano nº 60/670437, depositado em doze de abril de 2005.

DECLARAÇÃO DE DIREITOS GOVERNAMENTAIS

A presente invenção foi realizada com apoio do governo dos
10 Estados Unidos com base no Contrato nº 04-03-CA-70224 concedido pelo Departamento de Energia. O governo detém certos direitos na presente invenção.

CAMPO DA INVENÇÃO

É fornecido um sistema que inclui um aparelho para o tratamento
15 de biomassa, incluindo tratamento prévio bem como sacarificação. Também são fornecidos processos de tratamento prévio e sacarificação de biomassa em alto peso seco de biomassa em uma mistura de biomassa, utilizando o sistema. Além disso, são fornecidos métodos de otimização de processos de tratamento de biomassa.

20

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Estoques de alimentação e resíduos celulósicos e
lignocelulósicos, tais como resíduos agrícolas, madeira, resíduos florestais, lodo de fabricação de papel e resíduos sólidos municipais e industriais fornecem estoque de alimentação de biomassa renovável potencialmente
25 grande para a produção de substâncias, plásticos, combustíveis e alimentos. Estoques de alimentação e resíduos celulósicos e lignocelulósicos, compostos de polímeros de carboidrato que compreendem celulose, hemicelulose, glucanos e lignina são geralmente tratados por uma série de meios químicos,

mecânicos e enzimáticos para liberar principalmente açúcares de hexose e pentose, que podem ser fermentados em seguida em produtos úteis. A complexidade e a eficiência destes tratamentos variam. Além disso, existem vários esforços contínuos para identificar novos processos comercialmente robustos e para otimizar processos conhecidos para gerar produtos fermentativos úteis a partir de estoques de alimentação celulósicos e lignocelulósicos.

Para que seja um processo economicamente competitivo, um processo comercial de produção de açúcares fermentáveis a partir de biomassa de recursos renováveis requer a hidrólise de carboidratos em biomassa lignocelulósica para fornecer altos rendimentos de açúcares em altas concentrações, utilizando baixas quantidades de substâncias, para produzir uma fonte de açúcares fermentáveis com baixa toxicidade para organismos fermentativos que convertem açúcares em substâncias com valor agregado e combustíveis.

Para conduzir estes processos, empregou-se uma série de aparelhos para diferentes tipos de biomassa, bem como para diferentes tratamentos, incluindo desenvolvimento de processo em pequena escala e algum equipamento de produção em larga escala. Alguns tipos de aparelhos que vêm sendo utilizados incluem reator agitado em bateladas (Gusakov e Sinitsyn (1985), *Enz. Microb. Technol.* 7: 346-352), reator agitado de fluxo contínuo (US 4.257.818), reator de atrito (Ryu e Lee (1983), *Biotechnol. Bioeng.* 25: 53-65), reator de extrusão (US 6.176.176), reator de leito de contração NREL (Lee et al (2001), *Appl. Biochem. Biotech.* 91-93: 331-340) e reator com agitação intensiva induzida por campo eletromagnético (Gusakov et al (1996), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 56: 141-153).

É particularmente necessário um reator que seja capaz de fornecer meios de tratamento prévio eficiente de biomassa e/ou sacarificação

em alto peso seco de biomassa em mistura.

Permanece a necessidade de um aparelho simples mas eficaz para uso em processos de tratamento de biomassa, que possam ser utilizados em formato de pequena escala para testar condições de processo, com mecanismos de amostragem que imitam operações em larga escala comercial. Além disso, existe necessidade não atendida de equipamentos e processos comercialmente robustos para conduzir esses processos, que incluem sacarificação em alto peso seco de biomassa em mistura de biomassa.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

10 Em uma realização, a presente invenção fornece sistema que inclui aparelho para processamento de biomassa em bateladas, que compreende:

a. um aparelho que compreende:

i. um recipiente de reação cilíndrico com abertura em pelo menos uma extremidade;

15 ii. uma ou mais pás fixadas ao lado interno do mencionado recipiente;

iii. meios de atrito que compreendem pelotas em livre flutuação no interior do recipiente de reação;

20 iv. um tampa para a extremidade aberta do mencionado recipiente, que compreende uma ou mais portas; e

v. uma lança de injeção que compreende meio de fornecimento de reagente de processamento, em que o mencionado meio é uma lança de injeção que se estende pelo comprimento do recipiente de reação e conecta-se a primeira porta na tampa de iv); e

b. meios de rotação das pás do recipiente.

Em outra realização, a presente invenção fornece um processo de tratamento de biomassa que compreende:

a. introdução de biomassa no recipiente de reação do aparelho de acordo com a reivindicação 1;

b. introdução de um reagente de processamento no recipiente de reação; e

5 c. assimilação do mencionado reagente de processamento na mencionada biomassa por meio de rotação das pás do recipiente de rotação, por meio do quê as pás erguem e deixam cair os meios de atrito.

Em outra realização, a presente invenção fornece processo de tratamento de biomassa que compreende:

10 a. tratamento prévio de biomassa no recipiente de reação do aparelho de acordo com a reivindicação 1, produzindo biomassa previamente tratada;

b. ajuste da temperatura e do pH da biomassa previamente tratada de a) no recipiente de reação; e

15 c. sacarificação da biomassa previamente tratada ajustada de b) no recipiente de reação.

Em ainda outra realização, a presente invenção fornece método de otimização de processo de tratamento que compreende:

20 a. introdução de biomassa no recipiente de reação do aparelho de acordo com a reivindicação 1;

b. variação das condições de tratamento no recipiente de reação;

c. amostragem da biomassa tratada por meio da mencionada uma ou mais portas sob as mencionadas condições de tratamento variáveis; e

25 d. teste das mencionadas amostras para determinar condições de tratamento ideais para o processamento de biomassa.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 exhibe representação esquemática de realização do

sistema de tratamento de biomassa.

A Figura 2A exhibe desenho detalhado de realização do sistema de tratamento de biomassa. A Figura 2B exhibe desenho da tampa do recipiente de reação.

5

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os Depositantes incorporam especificamente o conteúdo integral de todas as referências mencionadas no presente relatório descritivo. Além disso, quando uma quantidade, concentração ou outro valor ou parâmetro for fornecido na forma de faixa, faixa preferida ou lista de valores preferíveis superiores e valores preferíveis inferiores, deve-se compreender isso como descrevendo especificamente todas as faixas formadas a partir de qualquer par de qualquer limite de faixa superior ou valor preferido e qualquer limite de faixa inferior ou valor preferido, independentemente de se as faixas são descritas separadamente. Quando uma série de valores numéricos for indicada no presente, a menos que informado em contrário, a faixa destina-se a incluir os seus pontos finais e todos os números inteiros e frações dentro da faixa. Não se pretende que o escopo da presente invenção seja limitado aos valores específicos indicados ao definir faixa.

A presente invenção fornece um sistema que inclui aparelho utilizado em processos de tratamento de biomassa, bem como processos de tratamento de biomassa e métodos de otimização de processo de tratamento que são conduzidos no aparelho. O projeto do sistema fornece extensa distribuição de reagente por meio de difusão do reagente sobre a biomassa à medida que o reagente é introduzido ou o reator é conduzido. O sistema funciona para fornecer extensa assimilação do reagente introduzido na biomassa para melhorar o processo de tratamento. Estas características permitem tratamento em alto peso seco de biomassa em mistura de biomassa.

DEFINIÇÕES:

No presente relatório descritivo, é utilizada uma série de termos. São fornecidas as definições a seguir:

A expressão “açúcar fermentável” designa oligossacarídeos e monossacarídeos que podem ser utilizados como fonte de carbono por microorganismo em processo de fermentação.

O termo “lignocelulósico” designa composição que compreende lignina e celulose. Material lignocelulósico pode também compreender hemicelulose.

O termo “celulósico” designa uma composição que compreende celulose.

Por “peso seco” de biomassa, indica-se o peso da biomassa que possui toda ou essencialmente toda a água removida. Peso seco é tipicamente medido de acordo com o Padrão E1756-01 da Sociedade Norte-Americana de Testes e Materiais (ASTM) (*Standard Test Method for Determination of Total Solids in Biomass*) ou o Padrão T-412 om-02 da Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Inc. (TAPPI) (*Moisture in Pulp, Paper and Paperboard*).

O termo “sacarificação” designa a produção de açúcares fermentáveis a partir de polissacarídeos.

A expressão “biomassa previamente tratada” indica biomassa que tenha sido submetida a tratamento prévio antes da sacarificação.

“Biomassa” indica qualquer material celulósico ou lignocelulósico e inclui materiais que compreendem celulose, compreendendo ainda opcionalmente hemicelulose, lignina, amido, oligossacarídeos e/ou monossacarídeos. Biomassa pode também compreender componentes adicionais, tais como proteína e/ou lipídio. Segundo a presente invenção, biomassa pode ser derivada de uma única fonte, ou biomassa pode

compreender mistura derivada de mais de uma fonte; biomassa poderá compreender, por exemplo, mistura de espigas de milho e forragem de milho ou mistura de grama e folhas. Biomassa inclui, mas sem limitar-se a safras bioenergéticas, resíduos agrícolas, resíduo sólido municipal, resíduo sólido industrial, lodo de fabricação de papel, resíduos de jardins, resíduos de madeira e de florestas. Exemplos de biomassa incluem, mas sem limitar-se a grãos de milho, espigas de milho, resíduos de safras tais como cascas de milho, forragem de milho, gramas, trigo, palha de trigo, cevada, palha de cevada, feno, palha de arroz, brotos de grama, resíduos de papel, bagaço de cana de açúcar, sorgo, soja, componentes obtidos por meio do processamento de cereais, árvores, ramos, raízes, folhas, lascas de madeira, serragem, arbustos e moitas, legumes, frutas, flores e esterco animal. Em uma realização, biomassa que é útil para a presente invenção inclui biomassa que possui valor de carboidrato relativamente alto, é relativamente densa e/ou de coleta, transporte, armazenagem e/ou manipulação relativamente fácil. Em uma realização da presente invenção, biomassa que é útil inclui espigas de milho, forragem de milho e bagaço de cana de açúcar.

“Solução aquosa que compreende amônia” designa o uso de gás amônia (NH_3), compostos que compreendem íons de amônio (NH_4^+) tais como hidróxido de amônio ou sulfato de amônio, compostos que liberam amônia mediante degradação tais como uréia e suas combinações em meio aquoso.

O termo “tratamento” indica processo de ação de reagente sobre material, em que as propriedades físicas e/ou químicas do material são alteradas.

O termo “reagente” indica composição que é capaz de alterar as propriedades físicas e/ou químicas de material alvo sob condições utilizadas em processo de tratamento.

“Associação de enzimas” para sacarificação é uma combinação

de enzimas que são capazes de agir como mistura de biomassa para produzir açúcares fermentáveis. Tipicamente, associação de enzimas de sacarificação pode compreender uma ou mais glicosidases; as glicosidases podem ser selecionadas a partir do grupo que consiste de glicosidases hidrolisantes de
5 celulose, glicosidases hidrolisantes de hemicelulose e glicosidases hidrolisantes de amido. Outras enzimas na associação de enzimas de sacarificação podem incluir peptidases, lipases, ligninases e feruloil esterases.

SISTEMA DE TRATAMENTO DE BIOMASSA:

O sistema de processamento de biomassa do presente pode ser
10 melhor compreendido por meio de referência ao desenho esquemático da Figura 1, que exhibe uma realização do sistema. O aparelho do sistema compreende um recipiente de reação cilíndrico (10) que contém uma extremidade fechada (11) e uma extremidade aberta (12). Uma tampa removível (13) encaixa-se sobre a extremidade aberta e pode ser fixada
15 seguramente à extremidade aberta do recipiente. Na cobertura existe pelo menos uma porta. Uma lança de injeção (14) estende-se através da porta, que se encontra no centro da tampa (15) para o recipiente de reação. A lança de injeção é um tubo que se estende a partir da porta através do centro longitudinal do recipiente de reação cilíndrico. A extremidade da lança de
20 injeção que é mais distante da porta (16) é vedada. A lança de injeção contém orifícios ao longo do seu comprimento que são dispostos em forma de V (17). Estes orifícios permitem a fuga de conteúdo do interior da lança de injeção para o recipiente de reação em direção vertical a cerca de dez horas e duas horas. Além disso, fonte de vácuo pode ser aplicada através da porta à qual é
25 conectada a lança, de forma a criar vácuo no interior do recipiente. Fixadas à superfície interna do recipiente de reação, encontram-se pás (18) que se estendem para o espaço aberto no recipiente e não tocam a lança de injeção. No lado interno do recipiente de reação, encontram-se meios de atrito em livre

flutuação (19). O aparelho é colocado horizontalmente sobre rolos (20) que são utilizados para girar o recipiente de reação no sistema de processamento de biomassa.

Durante o processamento de biomassa, o aparelho é mantido em
5 posição horizontal e são aplicados meios de rotação das pás do recipiente de reação em volta do eixo longitudinal do recipiente para formar sistema de processamento de biomassa. As pás podem ser fixadas à superfície interna da parede do recipiente de reação, caso em que todo o recipiente é girado. Alternativamente, as pás podem ser fixadas a tipo de manga de superfície
10 sobre o lado interno do recipiente de reação, caso em que o próprio recipiente é estacionário enquanto a manga gira. A rotação do recipiente ou da manga pode ser realizada por meio de qualquer método que forneça rotação. Para girar o recipiente, por exemplo, ele pode ser colocado sobre rolos externos, cintas, rodas, mancais de pino ou outras plataformas indutoras de movimento
15 rolante. O aparelho pode ser abrigado em reator que proporcione rotação ao recipiente, ou o mecanismo de rotação pode ser integrado ao aparelho. Pode haver eixo de direcionamento que se estende através do recipiente que é fixado à parede do recipiente ou à manga para aplicar rotação. A velocidade de rotação pode variar, dependendo do processo de tratamento específico sendo
20 utilizado e do tamanho do aparelho. A velocidade de rotação é suficiente para promover cascata de meios de atrito, conforme descrito abaixo no presente, e pode ser facilmente determinada pelos técnicos no assunto.

A tampa para a extremidade aberta do recipiente de reação pode ser fixada ao recipiente por meios conhecidos na técnica, tais como com
25 parafusos, grampos, barras, cães ou outros fixadores. O recipiente de reação pode ser aberto nas duas extremidades, com tampa para cada extremidade. A(s) porta(s) na tampa (ou ambas as tampas, caso haja uma em cada extremidade) é (são) abertura(s) para acesso ao lado interno do recipiente de

reação. Porta pode ser local de fixação de equipamento interno, tal como a lança, e/ou de equipamento externo, tal como aparelho de injeção de gás ou vácuo. A fixação do equipamento externo pode ser temporária, somente quando necessário durante o processo de tratamento, ou permanente. A porta
5 pode, portanto, possuir conector, bem como tampa para fechar a porta quando fora de uso. Conectores convencionais são utilizados para unir a(s) porta(s) na(s) tampa(s), incluindo conector ramificado e junta giratória. Porta pode também ser abertura na tampa para fornecer acesso ao lado interno, tal como para tomada de amostras ou liberação de pressão, e pode também possuir
10 tampa.

Para processamento de biomassa, a temperatura do aparelho é trazida para a temperatura desejada e controlada. O controle da temperatura do aparelho pode ser obtido por meio de qualquer método pelo qual se aplique calor, tal como por meio de aplicação de revestimento de aquecimento, injeção
15 de gás quente através da lança de injeção ou através de outra porta, ignição de gás inflamável ou uso de aquecimento a gás de cano de resíduos de aquecedor. Alternativamente, o aparelho pode ser abrigado em forno, banho de óleo ou outro tipo de reator que forneça calor para o aparelho. A temperatura interna do aparelho pode ser determinada por meio de inserção de dispositivo
20 de medição de temperatura, tal como termopar, através da porta na tampa que é conectada à lança de injeção e para baixo pela lança de injeção. Inserindo-se o dispositivo de medição de temperatura a meio caminho para baixo da lança de injeção, pode ser determinada a temperatura no centro aproximado do recipiente de reação. Pode-se impor o resfriamento do recipiente por meio de
25 métodos tais como aplicação de gelo ou outro refrigerante em revestimento de resfriamento, passagem de gás frio através da lança de injeção, colocação do reator em banho refrigerante ou resfriamento (refrigeração) da caixa externa na qual assenta-se o recipiente de reação. Isso pode ser feito por mecanismo

externo ou por mecanismo do aparelho.

A lança de injeção fornece meios de introdução e distribuição de soluções ou gases ao longo do comprimento do recipiente de reação. Nitrogênio, CO₂, vapor, reagente(s) de processamento e solução de ajuste do pH, por exemplo, podem ser introduzidos através da lança de injeção. Os reagentes de processamento que são introduzidos através da lança de injeção podem ser previamente aquecidos antes da injeção, utilizando qualquer método conhecido dos técnicos no assunto. O aquecimento de reagentes pode ser conseguido, por exemplo, passando-se o reagente de processamento através de bobina de aquecimento que é conectada à lança de injeção através da porta central na tampa. A bobina de aquecimento é imersa em banho de água aquecida, que é mantido sob temperatura desejável para aquecimento do reagente de processamento.

Pode-se aplicar vácuo ao recipiente de reação do aparelho por meio de porta na tampa. Fonte de vácuo pode ser conectada a porta na tampa, tipicamente à porta que é conectada à lança de injeção. Conector ramificado ou junção giratória fornece conexão para o vácuo e acesso para o reagente à lança injetora. Pode-se utilizar vácuo para auxiliar na infiltração de reagente de processamento em biomassa do recipiente de reação. Aplicando-se vácuo ao recipiente que contém biomassa, pode-se evacuar ar da biomassa, o que permite melhor penetração do reagente de processamento quando adicionado. Além disso, ar no reator pode ser substituído com atmosfera inerte tal como N₂ ou argônio. Pode-se aplicar vácuo para ajudar a resfriar o conteúdo do recipiente de reação, ao utilizar-se processo que seja adequado para resfriamento evaporativo. Os gases criados durante processo de tratamento de biomassa podem ser recuperados por meio da aplicação de vácuo e utilizando condensador de ventilação. Fonte de vácuo e condensador de ventilação podem ser fixados a porta na tampa, de tal forma que os vapores passem

através da porta e para o interior do condensador. Reagentes de processamento recuperados condensados, tais como amônia, podem ser reutilizados em processos de tratamento de biomassa posteriores. A remoção de amônia, quando utilizada em processamento de tratamento prévio, reduz o pH da biomassa previamente tratada e, desta forma, economiza substâncias necessárias para neutralizar a biomassa previamente tratada até pH ideal para sacarificação enzimática e fermentação de biocatalisador. O uso mais baixo de substâncias também aumenta a fermentação subsequente ao reduzir a carga de sal em contato com o microorganismo, de forma a aumentar o rendimento e a produtividade.

O recipiente de reação do aparelho pode também ser pressurizado por meio de injeção através de porta na tampa. Fonte de CO₂, por exemplo, pode ser conectada à porta na tampa que é conectada à lança de injeção e o CO₂ é injetado, por exemplo, para liberar vácuo no interior do recipiente de reação, reduzir o pH e/ou promover de outra forma o processo de tratamento de biomassa. Conector ramificado pode servir para conexão da fonte de CO₂, fonte de vácuo e acesso para reagente à lança de injeção, tudo através da mesma porta.

Pás fixadas à superfície interna no recipiente de reação podem apresentar-se em qualquer forma, número e disposição que promova a assimilação de reagente de processamento na biomassa quando na presença de meios de atrito (descritos abaixo no presente). Os meios de atrito e a biomassa são erguidos pelas pás à medida que as pás giram em volta do fundo do recipiente e depois deslizam das pás à medida que giram em volta do topo do recipiente. As pás podem estender-se em orientação perpendicular à superfície interna ou podem estar em ângulo, com ângulo que permita o erguimento e deslizamento, ou movimento em cascata dos meios. As pás podem correr pelo comprimento do recipiente de reator de forma ininterrupta,

ou pás com o comprimento parcial do reator podem ser colocadas em linha ou compensadas entre si. As pás estendem-se para o lado interno do recipiente, formando superfície que é suficientemente larga para erguer os meios de atrito e suficientemente estreita para que os meios de atrito deslizem facilmente à medida que as pás movem-se em direção ao topo do recipiente. Os técnicos no assunto compreenderão que uma série de formas, posicionamento e números de pás será eficaz no movimento em cascata dos meios de atrito e biomassa à medida que as pás giram para promover assimilação do reagente de processamento para a biomassa e que diferentes disposições serão ideais em recipientes de reação com diferentes tamanhos.

O aparelho é fabricado com material geralmente não corrosivo que suportará pressões, temperaturas e reagentes de processamento que são comumente utilizados em processos de tratamento de biomassa. Exemplos de materiais não corrosivos incluem aço inoxidável, Hatelloy®, cerâmica, Inconel®, aço inoxidável duplex, zircônio e aço carbono. Diferentes processos de tratamento de biomassa são conduzidos sob temperaturas que variam de -10 °C a cerca de 220 °C, em que temperaturas típicas variam de 4 °C a 170 °C. Além disso, processos de temperatura de biomassa podem ser conduzidos sob temperaturas que variam da temperatura ambiente (cerca de 25 °C) a cerca de 170 °C. As pressões utilizadas em processos de tratamento de biomassa geralmente variam entre a atmosférica e cerca de 1200 kPa, com pressões típicas variando da atmosférica a cerca de 310 kPa e, mais tipicamente, de cerca da atmosférica a 138 kPa. Os materiais utilizados em realização específica do aparelho são aqueles que suportam as condições do processo de tratamento de biomassa específico a ser utilizado, como bem sabem os técnicos no assunto. Em uma realização, material particularmente apropriado para o recipiente de reação é aço inoxidável de espessura programada 10 que pode ser utilizado com pressões da atmosférica a cerca de 310 kPa e

temperaturas de até cerca de 145 °C. Alternativamente, o aparelho pode ser fabricado com outros materiais que suportem temperaturas e pressões mais altas, bem como reagentes de processamento altamente corrosivos tais como ácidos fortes. Estas condições mais duras de tratamento de biomassa incluem
5 temperaturas de até cerca de 220 °C, com pressões de até cerca de 1216 kPa, e reagentes ácidos fortes tais como ácido sulfúrico. Ao utilizar estas condições de processamento, materiais tais como Hastelloy® e zircônio seriam eficazes.

O diâmetro do recipiente de reação é suficientemente grande para que o recipiente possa englobar a lança de injeção e as pás, tendo ainda lugar
10 para meios de atrito que caem livremente em cascata à medida que as pás giram. O recipiente de reação pode possuir diâmetro interno de cerca de 10 cm, em que diâmetro interno típico é de pelo menos cerca de 15 cm, e pode ser escalonado ainda mais, incluindo até tamanho comercial.

Os meios de atrito são introduzidos no aparelho e encontram-se
15 em livre flutuação no recipiente de reação. Meios de atrito são adicionados de tal forma que menos de cerca de 10% do volume do recipiente de reação sejam ocupados pelos meios de atrito. Tipicamente, os meios de atrito ocupam cerca de 3% a cerca de 7% do volume do recipiente de reação. Os meios de atrito podem ser de diferentes formas e tamanhos e são utilizados em
20 diferentes quantidades, dependendo do tamanho do recipiente de reação. Os meios de atrito apropriados em tamanho, forma, quantidade e composição para uso em realização específica do aparelho podem ser determinados pelos técnicos no assunto. São particularmente úteis pelotas tais como cilindros feitos de material denso pesado com superfície dura, não porosa e resistente a
25 lascas que é resistente à erosão. Meios de atrito são disponíveis comercialmente, por exemplo, por meio da E. R. Advanced Ceramics (East Palestine, OH). À medida que as pás giram, os meios de atrito são erguidos pelas pás e caem em seguida sobre a biomassa. A velocidade em que as pás

giram é ajustada de tal forma que os meios passam por este movimento em cascata, em vez de deslizarem pela parede do recipiente como ocorre em velocidade muito baixa, ou permanecerem ao lado da parede do recipiente como ocorre em velocidade muito alta. Sem desejar restrições à teoria, acredita-se que os meios de atrito depositados sobre a biomassa forneçam pressão de esmagamento, que resulta em exudação de líquido que inclui mistura de reagente de processamento e componentes de biomassa solubilizados. Líquido a granel substitui em seguida o líquido exudado gasto. Erguimento do peso dos meios de atrito da biomassa, à medida que as pás giram, permite a expansão da biomassa, em que a mistura de reagente de processamento infiltra-se na biomassa. A repetição desse esmagamento da biomassa da mistura de reagentes de processamento e sua infiltração nela cria ação de bombeamento. O bombeamento de mistura de reagentes para dentro e para fora da biomassa é tipo especializado de processo de mistura mecânica que promove a assimilação de reagente na biomassa e, desta forma, melhora o processo de tratamento de biomassa. Esta troca de líquidos permite concentração mais alta de reagentes a serem trocados nos poros por líquido esgotado que já tenha reagido nos poros da biomassa.

A descrição a seguir de uma realização da presente invenção não se destina a ser limitadora, mas a fornecer estrutura de aparelho particularmente apropriada. Em uma realização, conforme exibido na Figura 2, o aparelho possui capacidade de cerca de nove litros em recipiente de reação (10) que possui 51 cm de comprimento com diâmetro interno de 15 cm. Ele é fabricado a partir de 304 canos e encaixes de aço inoxidável. A extremidade aberta do recipiente (11) possui diâmetro de 10 cm, com quatro locais de fixação de tampa igualmente espaçados (12), cada qual estendendo-se a 2,54 cm para fora da abertura. A tampa (13) é placa circular com 15,2 cm de diâmetro. Existem duas portas na tampa, primeira porta no centro (14) e

segunda porta entre o centro e uma extremidade (15), cada qual com 1,9 cm de diâmetro. A lança de injeção (16) estende-se através da porta central na tampa e é conectada a junta giratória (17). Existe conector ramificado (18) fixado à junta giratória. A lança de injeção é fabricada com tubulação de aço inoxidável com 0,64 cm de diâmetro. Os orifícios na lança (19) possuem diâmetro de 0,165 cm e estão localizados em intervalos de 2,54 cm em padrão de V. O ângulo entre as linhas de orifícios é de cerca de 120°. Existem duas linhas de orifícios, com os orifícios em uma única linha localizada a 5,1 cm de distância, e os orifícios nas duas linhas são compensados em 2,54 cm, de forma que, efetivamente, existe um orifício a cada 2,54 cm sobre lados alternados da lança. A segunda porta na tampa fornece acesso para a tomada de amostras e adição de reagentes sem remoção da tampa. Existem quatro pás (20), em que cada uma corre pelo comprimento da parede do recipiente de reação à qual são fixadas e estendem-se até 3,8 cm a partir da parede de recipiente interno, perpendicular àquela superfície. Vinte e dois cilindros de meios de atrito de 3,2 cm x 3,2 cm (21), feitos de zircônia ou alumina (adquiridos da E. R. Advanced Ceramics, East Palestine, OH) são adicionados ao recipiente de reação, ocupando cerca de 5,5% do volume do recipiente. O aparelho gira a cerca de 19 rpm durante processo de tratamento, colocando-se o aparelho sobre suporte de rolo (22; Bellco Cell Production Roller Apparatus, Bellco Technology, Vineland, NJ, Estados Unidos), para formar o sistema de processamento de biomassa. O suporte de rolo e aparelho são colocados no interior de câmara incubadora (23) para controle da temperatura.

Equipamento externo é fixado ao aparelho da Figura 2 para formar sistema, como nos exemplos a seguir. Para introdução de reagente de tratamento prévio, bomba de HPLC capaz de velocidade de fluxo de cerca de 800 ml/min sob pressão medida de 10342 kPa é conectada ao conector giratório de porta de lança de injeção ramificada na tampa. A bomba de HPLC

é conectada por meio de bobina de aquecimento construída com tubulação de aço inoxidável de 0,32 cm que é imersa em água em recipiente de reator Parr de oito litros. O controlador de aquecedor de reator Parr é configurado acima do ponto de ebulição de água em Golden, CO (cerca de 93 °C) com entrada de aquecedor de 3 kW para manter ebulição rápida. Fonte de vácuo é fixada ao conector giratório de porta de lança de injeção ramificado na tampa. A fonte de vácuo pode ser conectada a condensador de ventilação que é conectado a banho de água resfriada em operação a cerca de 1,5 °C. O condensador de ventilação inclui frasco de dois litros revestido com Teflon® que é imerso em

5
10
15
20

banho de água com gelo e é conectado a condutor a vácuo evacuado até cerca de 85 kPa. Fonte de CO₂ pode também ser conectada ao conector giratório de porta de lança de injeção.

Compreender-se-á que o sistema que inclui o aparelho pode ser escalonado, com base nas características e princípios descritos no presente.

15
20

Aparelho que possui recipiente de reação com cerca de três a quatro metros de diâmetro e cerca de quinze a dezoito metros de comprimento é particularmente apropriado para tratamento de biomassa em escala comercial. Aparelhos com recipientes de reação com tamanhos intermediários ao descrito na Figura 2 e este tamanho de escala comercial também são realizações do presente aparelho.

MÉTODOS DE USO DO APARELHO NO TRATAMENTO DE BIOMASSA:

O sistema do presente é projetado para o tratamento de biomassa, incluindo diferentes tipos de tratamento utilizando diferentes processos. Em uma realização, o sistema é utilizado em um processo de tratamento prévio de biomassa. Em outra realização, o sistema é empregado em um processo de sacarificação de biomassa. Estes dois tipos de tratamento de biomassa podem ser conduzidos sucessivamente sobre a mesma amostra de biomassa, ou individualmente sobre diferentes amostras de biomassa. Uma

25

amostra de biomassa pode ser previamente tratada em outro aparelho e sacarificada no aparelho do presente sistema, ou amostra de biomassa pode ser previamente tratada no presente aparelho e sacarificada em seguida em aparelho separado.

5 O presente sistema que inclui o aparelho é particularmente apropriado para o tratamento de biomassa e particularmente para sacarificação de biomassa, em alto peso seco de biomassa na mistura de biomassa e reagente. O peso seco inicial de biomassa pode ser de até cerca de 80% do peso da mistura de biomassa e reagente. Mais adequadamente, o peso seco de biomassa é de até cerca de 60% do peso da mistura de biomassa e reagente. Prefere-se concentração inicial de biomassa que é de cerca de 15% a cerca de 50% do peso da mistura de biomassa e reagente. A introdução de reagente através da lança de injeção e o funcionamento dos meios de atrito e pás proporciona assimilação do reagente na biomassa, de tal forma que o processamento em altas concentrações de biomassa seja eficaz. No contexto de sacarificação, em que enzimas tais como celulasas e hemicelulasas hidrolisam a biomassa para produzir açúcares fermentáveis, as enzimas são assimiladas na biomassa na mistura por meio de movimento em cascata da biomassa e meios de atrito pelas pás giratórias do recipiente. Os efeitos dos meios em cascata sobre a biomassa permitem o tratamento de biomassa em alto peso seco de biomassa na mistura de biomassa.

Em um processo de tratamento prévio, a biomassa é introduzida no presente aparelho através da extremidade aberta do recipiente de reação. Antes da introdução da biomassa no aparelho, pode-se aplicar energia à biomassa para reduzir o tamanho e/ou aumentar a extensão exposta, tal como por meio de moagem, fragmentação, quebra, retalhamento, corte, refino em disco, ultrassom e microondas. A quantidade de biomassa introduzida depende do tamanho do recipiente de reação e do processo de tratamento específico a

ser utilizado, e pode ser determinada pelos técnicos no assunto. O aparelho pode ser previamente aquecido até temperatura de processamento desejada.

Um reagente de processamento é injetado através de porta na tampa de recipiente fixada e através da lança de injeção para o interior do recipiente de reação. Em uma realização, o reagente é previamente aquecido e introduzido por meio de pulverização através de orifícios na superfície superior da lança de injeção enquanto as pás giram, de forma que o reagente entre em contato com a biomassa à medida que passa acima da pulverização. O reagente de processamento pode ser qualquer composição que seja utilizada em processo de tratamento prévio de biomassa e que seja compatível com o material com o qual é construído o aparelho. Os reagentes de tratamento prévio típicos incluem agentes oxidantes, desnaturantes, detergentes, solventes orgânicos e bases, cujas listas são fornecidas em US 2004/0231060, bem como ácidos. Alguns reagentes apropriados incluem ácido peracético (Teixeira et al (1999), *Appl. Biochem. and Biotech.* 77-79: 19-34), peróxido de hidrogênio (Gould (1983), *Biotech. and Bioeng.* 26: 46-52), hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio (Curreli et al (2002), *Process Biochem.* 37: 937-941), amônia aquosa (Kim e Lee (2005), *Bioresource Tech.* 96: 2007-2013) e amônia anidra líquida (Teymouri et al (2005), *Bioresource Tech.* 96: 2014-2018). Um reagente de processamento particularmente apropriado para tratamento prévio de biomassa no presente aparelho é amônia aquosa. É de maior preferência solução aquosa que compreende amônia utilizada em mistura de biomassa e amônia aquosa, em que a amônia está presente em concentração pelo menos suficiente para manter o pH alcalino da mistura de biomassa e amônia aquosa, mas em que a amônia está presente em menos de cerca de 12% em peso com relação ao peso seco de biomassa, conforme descrito no pedido copendente CL2825.

A quantidade de reagente de processamento adicionada e,

portanto, a concentração de biomassa podem variar, dependendo do processo de tratamento prévio utilizado. É particularmente apropriado no presente aparelho tratamento prévio em alta concentração de biomassa, em que o peso seco de biomassa encontra-se em concentração inicial de pelo menos cerca de 5 15% em peso com relação ao peso da mistura de biomassa e amônia aquosa. A alta concentração de biomassa reduz o volume total de material previamente tratado, tornando o processo mais econômico. Além disso, com alta concentração de biomassa, a necessidade de concentração de açúcares após a sacarificação da biomassa previamente tratada para permitir altos títulos na 10 fermentação é minimizada. O modo de compressão e infiltração de mistura mecânica no presente aparelho, descrito acima, é particularmente apropriado para processo de tratamento de biomassa em alto peso seco de biomassa na mistura de biomassa.

Antes do carregamento de biomassa no presente aparelho, a 15 atmosfera no recipiente do reator pode receber fluxo de nitrogênio ou qualquer outro gás selecionado. Vácuo, por exemplo, é puxado e N_2 é introduzido através de porta para substituir o ar. Isso pode ser repetido tantas vezes quantas forem necessárias para substituir substancialmente o ar.

O aparelho que contém a biomassa e o reagente de tratamento 20 prévio possui sua temperatura controlada, conforme descrito acima no presente. As pás do recipiente de reação são giradas, conforme descrito acima no presente. O período de tempo permitido para o processo de tratamento prévio depende do processo específico sendo utilizado e varia tipicamente de cerca de cinco minutos a cerca de oito horas. À medida que a reação é 25 conduzida, amostras podem ser retiradas de porta na cobertura do aparelho. Estas amostras podem ser analisadas para determinar o término da reação de tratamento prévio. Vários métodos analíticos podem ser utilizados, dependendo do processo de tratamento prévio sendo utilizado, tal como espectroscopia

perto de infravermelho (NIR), análise química completa ou por meio de condução de pequena sacarificação sobre amostra.

Ao utilizar um reagente que forma vapor sob as condições de tratamento prévio, o vapor reagente pode ser recolhido por meio de aplicação de vácuo fixado a condensador de ventilação, conforme descrito acima no presente. Tipicamente, após o término do processo de tratamento prévio, o vapor reagente é recolhido e condensado para que possa ser reutilizado. Um exemplo é a coleta de vapor de amônia ao utilizar-se amônia líquida como reagente. O vapor de amônia recolhido pode ser liquefeito e utilizado no reagente de processo para o tratamento prévio de biomassa adicional.

Biomassa previamente tratada pode ser removida do aparelho ou o segundo tipo de tratamento de biomassa, sacarificação, pode ser realizado sem a remoção da biomassa previamente tratada. Alternativamente, amostra de biomassa que tenha sido previamente tratada em aparelho separado pode ser introduzida no presente aparelho para tratamento por sacarificação. A quantidade de reagente de sacarificação adicionada e, portanto, a concentração de biomassa, pode variar dependendo do processo de sacarificação utilizado. O reagente de sacarificação é tipicamente injetado diretamente no recipiente de reação utilizando a lança de injeção do presente aparelho. A introdução de reagente de sacarificação por meio da lança de injeção e o funcionamento dos meios de atrito e pás promovem assimilação do reagente na biomassa, de tal forma que a sacarificação em altas concentrações de biomassa seja eficaz. Um reagente de sacarificação pode ser introduzido através de porta na tampa ou no recipiente com a tampa aberta, em forma seca.

O peso seco de biomassa durante a sacarificação pode ser de até cerca de 80% do peso da mistura de biomassa e reagente. Mais adequadamente, o peso seco de biomassa é de até cerca de 60% do peso da

mistura de biomassa e reagente. Prefere-se concentração de biomassa inicial que seja de cerca de 15% a cerca de 40% do peso da mistura de biomassa e reagente. A alta concentração de biomassa reduz o volume total de material sacarificado, o que torna o processo mais econômico. Ela demonstra a eficácia da associação de enzimas de sacarificação sob alto teor de biomassa em que os níveis de impurezas, substratos iniciais e produtos não são diluídos, em que vários processos de inibição e desativação poderão ter lugar. Sob baixa concentração de biomassa, conforme utilizado tipicamente em sacarificação, a os potenciais processos de inibição e desativação são significativamente reduzidos ou inexistentes, devido ao alto fator de diluição. Além disso, com alta concentração de biomassa, a necessidade de concentração de açúcares após a sacarificação para produzir altos títulos em fermentação é minimizada. O modo de infiltração e compressão da mistura mecânica no presente aparelho, descrito acima, é particularmente adequado para sacarificação em alto peso seco de biomassa na mistura de biomassa.

O reagente de processamento de sacarificação compreende enzimas que são capazes de hidrolisar a biomassa previamente tratada para liberar oligossacarídeos e/ou monossacarídeos. Enzimas de sacarificação e métodos de tratamento de biomassa com enzimas de sacarificação são analisados em Lynd, L. R. et al (*Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (2002) 66: 506-577).

Tipicamente, é utilizada associação de enzimas de sacarificação, que compreende uma ou mais enzimas selecionadas principal mas não exclusivamente a partir do grupo "glicosidases" que hidrolisam as ligações éter de di, oligo e polissacarídeos e são encontradas na classificação de enzimas EC 3.2.1.x (*Enzyme Nomenclature 1992*, Academic Press, San Diego, CA com Suplemento 1 (1993), Suplemento 2 (1994), Suplemento 3 (1995), Suplemento 4 (1997) e Suplemento 5 (em *Eur. J. Biochem.* (1994) 223: 1-5, *Eur. J. Biochem.* (1995) 232: 1-6, *Eur. J. Biochem.* (1996) 237: 1-5, *Eur. J. Biochem.*

(1997) 250: 1-6 e *Eur. J. Biochem.* (1999) 264: 610-650, respectivamente)) do grupo geral "hidrolases" (EC 3). As glicosidases úteis no presente processo podem ser categorizadas pelo componente de biomassa que hidrolisam. As glicosidases úteis para o presente processo incluem glicosidases hidrolisantes de celulose (por exemplo, celulases, endoglucanases, exoglucanases, celobiohidrolases, β -glucosidases), glicosidases hidrolisantes de hemicelulose (por exemplo, xilanas, endoxilanas, exoxilanas, β -xilosidases, arabinoxilanas, manases, galactases, pectinases, glucuronidas), e glicosidases hidrolisantes de amido (por exemplo, amilases, α -amilases, β -amilases, glucoamilases, α -glucosidases, isoamilases). Além disso, pode ser útil adicionar outros aditivos à associação de enzimas de sacarificação, tais como peptidases (EC 3.4.x.y), lipases (EC 3.1.1.x e 3.1.4.x), ligninas (EC 1.11.1.x) e feruloil esterases (EC 3.1.1.73) para ajudar a liberar polissacarídeos de outros componentes da biomassa. Sabe-se bem na técnica que os microorganismos que produzem enzimas hidrolisantes de polissacarídeos freqüentemente exibem atividade, tal como degradação de celulose, que é catalisada por várias enzimas ou um grupo de enzimas que possuem diferentes especificidades de substratos. Desta forma, "celulase" de microorganismo pode compreender grupo de enzimas, todas as quais podem contribuir com a atividade de degradação de celulose. Preparações de enzimas comerciais ou não comerciais, tais como celulase, podem compreender numerosas enzimas, dependendo do esquema de purificação utilizado para a obtenção da enzima. Desta forma, a associação de enzimas de sacarificação do presente processo pode compreender atividade de enzimas, tais como "celulase", mas reconhece-se que esta atividade pode ser catalisada por mais de uma enzima. Enzimas de sacarificação podem ser obtidas comercialmente, tais como celulase Spezyme® CP (Genencor International, Rochester, NY) e xilanase Multifect® (Genencor).

Os técnicos no assunto saberão como determinar a quantidade eficaz de enzimas para uso na associação e ajustar as condições de atividade enzimática ideal. Os técnicos no assunto também saberão como otimizar as classes de atividades enzimáticas necessárias na associação para obter 5 sacarificação ideal de dada biomassa previamente tratada sob as condições selecionadas.

Ao tratar previamente e sacarificar em seguida biomassa no presente aparelho, antes do tratamento de sacarificação, o pH e a temperatura da biomassa previamente tratada no presente aparelho são ajustados para que 10 sejam favoráveis para determinar a atividade das enzimas de sacarificação a serem utilizadas. Durante o tratamento prévio com ácido ou base, o pH da biomassa previamente tratada pode ser elevado ou reduzido, respectivamente, por meio da introdução de sólido ou solução de ajuste de pH ao recipiente de reação. Para boa distribuição de solução de ajuste de pH na biomassa 15 previamente tratada, ela é injetada através da lança enquanto as pás no recipiente de reação estiverem girando. A solução pode ser previamente aquecida, tipicamente até temperatura compatível com a associação de enzimas de sacarificação, tal como até cerca de 50 °C. Alternativamente, pode-se introduzir solução de ajuste de pH através de porta na tampa. As pás do 20 recipiente podem ser giradas para promover a assimilação da solução de ajuste de pH na biomassa fornecida pelos meios de atrito e pás e a biomassa testada periodicamente por meio de remoção de amostra através da porta de amostras para teste de pH até atingir-se o pH desejado. O pH alvo pode ser de cerca de 2 a 11, dependendo das enzimas sendo utilizadas para sacarificação, 25 pois enzimas diferentes podem exibir diferentes pHs ideais, como sabem os técnicos no assunto. Mais tipicamente, o pH desejado é de cerca de 4 a 10, em que pH de cerca de 5,5 é o mais típico.

A temperatura de sacarificação encontra-se geralmente na faixa

de cerca de 15 °C a cerca de 100 °C, também dependendo das enzimas sendo utilizadas para sacarificação, pois enzimas diferentes podem exibir diferentes temperaturas ideais, como sabem os técnicos no assunto. Tipicamente, a temperatura é de cerca de 20 °C a cerca de 100 °C. A sacarificação é realizada enquanto as pás do recipiente de reação giram. O modo de compressão e infiltração de assimilação do reagente na biomassa no presente aparelho, descrito acima no presente, melhora o acesso do reagente de sacarificação à biomassa, de forma a fornecer processo de sacarificação altamente eficiente. Este processo é conduzido por período de cerca de vários minutos a cerca de 120 horas e, preferencialmente, cerca de várias horas a cerca de 72 horas. O tempo de reação dependerá da concentração de enzimas e atividade específica, bem como do substrato utilizado e das condições ambientais, tais como temperatura e pH. Os técnicos no assunto podem determinar facilmente as condições ideais de temperatura, pH e tempo a serem utilizadas com substrato de biomassa específico e associação de enzimas de sacarificação.

O presente aparelho é particularmente útil para otimizar processos de tratamento de biomassa. Existem muitas condições de tratamento que podem variar em processo de tratamento de biomassa, seja ele tratamento prévio ou processo de sacarificação. Condições variáveis incluem, mas sem limitar-se a pH, temperatura, tipos de reagentes de processamento e concentrações de reagentes de processamento, percentual em peso seco de biomassa na mistura de biomassa e reagente, estratégias de alimentação para adição de reagentes, pressões, tipo de atmosfera inerte, forma e tipo de biomassa utilizada e tempo de processamento. O presente aparelho pode ser construído em pequena escala, conforme descrito em realização acima no presente (exibida na Figura 2), que é particularmente apropriada para otimizar condições de tratamento. As condições podem variar independente ou paralelamente utilizando projeto estatístico de experimentação e amostras

tomadas da porta de amostras enquanto o processo é conduzido. Em processo de sacarificação ou processo combinado de tratamento prévio e sacarificação, açúcares nas amostras podem ser analisados diretamente. Em processo de tratamento prévio isoladamente, amostras são sacarificadas e, em seguida, o produto de sacarificação é analisado para determinar o teor de açúcar e outros componentes de interesse, tais como ácido acético, furfurais e sais. Podem também ser utilizados outros métodos de análise, tais como para hemicelulose. A otimização pode ser baseada em uma série de critérios, que incluem rendimento de monômero de açúcar, rendimento total de açúcar liberado, baixo uso de enzimas, baixo ácido acético, baixos furfurais, baixas impurezas formadas ou otimização global com base em diversas destas variáveis. São determinados, por exemplo, os percentuais de glicose e xilose teoricamente presentes na biomassa inicial que são liberados no processo de tratamento sendo determinado. Rendimentos de monômeros de açúcar de cerca de 50% ou mais indicam bons resultados, com rendimentos ainda mais altos sendo preferidos. Rendimentos totais de açúcar, incluindo oligômeros liberados, de pelo menos 70% indicam bons rendimentos. Métodos de análise dos açúcares são bem conhecidos dos técnicos no assunto, tais como HPLC. Além disso, outros componentes de amostras de biomassa tratada podem ser analisados, também por meio de HPLC, tal como ácido acético, furfurais ou ácido láctico, na determinação da qualidade do produto.

Açúcares fermentáveis liberados de biomassa podem ser utilizados por microorganismos apropriados, que são biocatalisadores, para produzir substâncias alvo, tal como descrito nos Pedidos de Patente Norte-Americanos copendentes CL3435 e CL 3436.

EXEMPLOS

MÉTODOS GERAIS E MATERIAIS:

São utilizadas as abreviações a seguir:

“HPLC” é Cromatografia de Líquidos de Alta Eficiência, “C” é centígrado, “kPa” é quiloPascal, “m” é metro, “mm” é milímetro, “kW” é quilowatt, “ μm ” é micrômetro, “ μl ” é microlitro, “ml” é mililitro, “l” é litro, “min” é minuto, “mM” é milimolar, “cm” é centímetro, “g” é grama, “kg” é quilograma, “wt” é peso, “h” é hora, “temp.” ou “T” é temperatura, “teór.” é teórico, “pretreat” é tratamento prévio, “DWB” é peso seco de biomassa. Ácido sulfúrico, hidróxido de amônio, ácido acético, acetamida, extrato de levedura, ácido 2-morfolinoetanossulfônico (MES), fosfato de potássio, glicose, xilose, triptona, cloreto de sódio e ácido cítrico foram obtidos por meio da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

REATOR DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E TRATAMENTO PRÉVIO (PEHR):

Um aparelho de tratamento de biomassa com dimensões e características exibidas na Figura 2 e descritas no presente acima é denominado Reator PEHR e foi utilizado nos Exemplos a seguir. Resumidamente, reator PEHR de nove litros (construído na NREL, Golden, CO) possui recipiente de reação de aço inoxidável de cerca de 15 cm x 51 cm com lança de injeção para introdução de reagentes de processamento. A lança de injeção é conectada utilizando uma junta giratória para porta em tampa sobre uma extremidade do recipiente, que possui porta adicional para acesso a recipientes. Quatro pás correm no comprimento da parede de recipiente e são fixados perpendicularmente à parede. As pás e 22 cilindros de meios de atrito cerâmicos de 3,2 cm x 3,2 cm (E. R. Advanced Ceramics, East Palestine, OH), em livre flutuação no recipiente, aplicam mistura mecânica de biomassa e reagente à medida que o recipiente gira, promovendo assimilação de reagente na biomassa. O reator PEHR é colocado sobre Aparelho de Rolo de Produção Celular Bellco (Bellco Technology, Vineland, NJ), que fornece mecanismo de rotação e o reator com aparelho de rolo é abrigado em câmara com temperatura controlada que fornece calor. A câmara com temperatura

controlada consiste de quadro de alumínio para sustentar almofadas isolantes de cortiça em volta do Aparelho de Produção Celular Bellco, ao qual é ligado aquecedor que é controlado por termopares inseridos através do centro da lança de injeção no reator PEHR. Pode-se aplicar vácuo e pressão ao
5 recipiente de reação fixando-se fontes externas à porta conectada a lança na tampa.

SISTEMA DE DIGESTÃO DE BATELADAS DO REATOR DE PISTOLA DE VAPOR:

O reator de pistola de vapor de quatro litros (Autoclave Engineers, Erie, PA) é um reator revestido com vapor que consiste de comprimento de
10 cano de Hastelloy® programa 80 de 102 mm fechado por duas válvulas de bolas. Aquecedores elétricos adicionais são colocados sobre todas as superfícies expostas sem revestimento do reator e controlados até a temperatura de ponto de ajuste de tratamento prévio. Injeção direta de vapor também é utilizada para trazer rapidamente a biomassa até a temperatura de
15 tratamento prévio. A pressão de vapor é ajustada e controlada para manter a temperatura de tratamento prévio desejada. O fundo do reator é estreitado para 51 mm. Todo o material tratado previamente sai através de molde substituível no fundo do reator e é recolhido em saco de nylon (Hotfill®) de 0,21 m³ sustentado em um tanque de ignição pesado com paredes, com revestimento e
20 resfriado.

MÉTODOS ANALÍTICOS:

MEDIÇÃO DO TEOR DE AÇÚCAR, ACETAMIDA, ÁCIDO LÁCTICO E ÁCIDO ACÉTICO:

Açúcares solúveis (glicose, celobiose, xilose, galactose, arabinose e manose), acetamida, ácido láctico e ácido acético em líquido de sacarificação
25 foram medidos por meio de HPLC (Agilent Modelo 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) utilizando colunas Bio-Rad HPX-87P e Bio-Rad HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) com colunas de guarda apropriadas. O pH da amostra foi medido e ajustado em 5-6 com ácido sulfúrico se necessário. A amostra

passou em seguida através de filtro de seringa de 0,2 μm diretamente para ampola de HPLC. As condições de condução de HPLC foram as seguintes:

HPX-87P (para carboidratos):

- Volume de injeção: 10 a 50 μl , dependendo da
5 concentração e dos limites do detector.
- Fase móvel: HPLC grau água, 0,2 μm filtrado e com gases retirados.
- Velocidade de fluxo: 0,6 ml/minuto.
- Temperatura da coluna: 80-85 $^{\circ}\text{C}$, temperatura da coluna
10 de guarda < 60 $^{\circ}\text{C}$.
- Temperatura do detector: o mais perto possível da temperatura da coluna principal.
- Detector: índice de refração.
- Tempo de condução: 35 minutos de coleta de dados mais
15 quinze minutos após a condução (com possível ajuste para compostos eluentes posteriores).

Biorad Aminex HPX-87H (para carboidratos, acetamida, ácido láctico e ácido acético):

- Volume de injeção: 5 a 10 μl , dependendo da concentração e dos
20 limites do detector.
- Fase móvel: 0,01 N ácido sulfúrico, 0,2 μm filtrado e seus gases retirados.
- Velocidade de fluxo: 0,6 ml/minuto.
- Temperatura da coluna: 55 $^{\circ}\text{C}$.
- Temperatura do detector: o mais perto possível da temperatura da
25 coluna.
- Detector: índice de refração.
- Tempo de condução: 25 a 75 minutos de coleta de dados.

Após a condução, as concentrações da amostra foram determinadas a partir de curvas padrão para cada um dos compostos.

EXEMPLO 1

SACARIFICAÇÃO DE BAGAÇO EM ALTA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA NO REATOR

5 PEHR; COMPARAÇÃO COM SACARIFICAÇÃO SOB BAIXA CONCENTRAÇÃO

O reator PEHR (descrito em Métodos Gerais), sem meios de atrito, foi carregado com bagaço moído a 1,27 mm (370 g, com base em peso seco). Este bagaço de cana de açúcar foi o Material de Referência NIST RM8491, do clone de cana de açúcar H65-7052, obtido originalmente por meio da Associação de Plantadores de Açúcar do Havaí, subestação de Kunia, Oahu, HI. Ele foi moído em moinho Wiley para passar através de peneira de 2 mm, com os finos (+74 mesh) removidos. O recipiente do reator foi resfriado a 4 °C por meio de rotação em contato com gelo sobre a superfície externa. Aplicou-se vácuo ao recipiente de reator e solução de hidróxido de amônio diluído, que foi previamente resfriada em sala fria a 4 °C e passou através de tubulação imersa em banho de água com gelo, foi injetada para gerar concentração de amônia de 4 g/100 g de peso seco de biomassa e peso seco de concentração de biomassa de 45 g/100 g de mistura de biomassa e amônia aquosa total. O recipiente de reator carregado com amônia e bagaço foi resfriado a 4 °C por meio de aplicação de gelo à superfície do recipiente de reator giratório e girado a 4 °C por trinta minutos. Nesse momento, o conteúdo foi transferido para o reator de pistola de vapor que é descrito nos Métodos Gerais. Após o carregamento do reator de pistola de vapor com a mistura de bagaço e amônia, a temperatura aumentou para 145 °C e a mistura foi mantida nessa temperatura por vinte minutos. Ao final do tempo de tratamento prévio, o bagaço foi descarregado do reator de pistola de vapor através de molde circular de 2,54 cm em tanque de ignição. Amostra de bagaço previamente tratado foi sacarificada em seguida em frasco de agitação e outra amostra

(cerca de 163 g de peso seco) foi sacarificada no reator PEHR. A sacarificação do frasco de agitação foi conduzida a 5% em peso seco de biomassa com relação ao peso total da mistura de associação de enzimas de sacarificação de biomassa previamente tratada, enquanto a sacarificação do reator PEHR foi
 5 conduzida a 30% de peso seco de biomassa com relação ao peso total da mistura de associação de enzimas de sacarificação de biomassa previamente tratada. O pH foi controlado em 5,5 durante a sacarificação por meio da adição de 50 mM de tampão de citrato e a temperatura foi mantida em 50 °C.

Para a sacarificação do reator PEHR, cerca de 476 g (cerca de
 10 136 g de peso seco) de biomassa previamente tratada e 22 cilindros de atrito cerâmicos foram adicionados ao recipiente do reator. O pH foi ajustado em 5,0-5,5 com ácido cítrico sólido. O recipiente do reator foi mantido no interior de câmara incubadora controlada a 50 °C e girada axialmente a 19 rpm. Bagaço não tratado previamente também foi sacarificado a 5% em peso seco de
 15 biomassa com relação ao peso total da mistura de associação de enzimas de sacarificação de biomassa previamente tratada em frasco de agitação. Todas as sacarificações foram realizadas com 28,4 mg/g de celulase Spezyme CP® de celulose e 28,4 mg/g de xilanase Multifect® de celulose a 50 °C e pH 5,5 por 96 horas. Os rendimentos fornecidos na Tabela 1 abaixo são a liberação na
 20 forma de percentual de rendimento teórico.

TABELA 1

RENDIMENTOS APÓS O TRATAMENTO PRÉVIO E SACARIFICAÇÃO DE BAGAÇO

	Sem tratamento prévio - 5% sacarificação	Tratado previamente - 5% DWB sacarificação	Tratado previamente - 30% DWB sacarificação
Monômero de Glicose	0,5%	16,6%	23,3%
Glicose total	ND	ND	36,4%
Monômero de Xilose	1,3%	15,6%	17,2%
Xilose total	ND	ND	37,4%

ND: não determinado.

Os resultados demonstram que o tratamento prévio de bagaço com amônia muito baixa permite liberação substancial de açúcar em comparação com o controle não tratado previamente e que sacarificação em alta concentração de sólidos no reator PEHR é muito eficaz na liberação de açúcares.

EXEMPLO 2

SACARIFICAÇÃO DE SERRAGEM DE ÁLAMO AMARELO COM ALTA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA NO REATOR PEHR; COMPARAÇÃO COM SACARIFICAÇÃO SOB BAIXA

CONCENTRAÇÃO

O reator PEHR, sem meios de atrito, foi carregado com serragem de álamo amarelo (596 g, base de peso seco; adquirido da Sawmiller, Inc., Haydenville, OH). Aplicou-se vácuo ao recipiente do reator e injetou-se solução diluída de hidróxido de amônio para gerar concentração de amônia de 6 g/100 g de peso seco de biomassa e peso seco de concentração de biomassa de 44 g/100 g de mistura total de biomassa e amônia aquosa. O recipiente do reator carregado com amônia e serragem de álamo amarelo foi trazido para 4 °C conforme descrito no Exemplo 1 e girado a 4 °C por trinta minutos. Nesse momento, o conteúdo foi transferido para o reator de pistola de vapor. Após o carregamento do reator de pistola de vapor com a mistura de álamo e amônia, a temperatura aumentou para 145 °C e a mistura foi mantida sob temperatura por vinte minutos. Ao final do tempo de tratamento prévio, a serragem de álamo amarelo foi descarregada do reator de pistola de vapor através de molde circular de 2,54 cm em tanque de ignição. Amostra de serragem de álamo amarelo previamente tratada foi sacarificada em seguida conforme descrito no Exemplo 1 em frasco de agitação e outra amostra foi sacarificada no reator PEHR. A sacarificação do frasco de agitação foi conduzida a 5% em peso seco de

biomassa com relação ao peso total da mistura de associação de enzimas de sacarificação e biomassa previamente tratada, enquanto a sacarificação em reator PEHR (utilizando cerca de 279 g em peso seco de serragem previamente tratada) foi conduzida a 30% em peso seco de biomassa com relação ao peso total da mistura de associação de enzimas de sacarificação e biomassa previamente tratada. Serragem de álamo amarelo não tratada previamente também foi sacarificada a 5% em peso seco de biomassa com relação ao peso total da mistura de associação de enzimas de sacarificação e biomassa previamente tratada em frasco com agitação. Todas as 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000

TABELA 2

15 **RENDIMENTOS APÓS O TRATAMENTO PRÉVIO E SACARIFICAÇÃO DE SERRAGEM DE**

ÁLAMO AMARELO

Componente	Sem tratamento prévio - 5% DWB sacarificação	Tratado previamente - 5% DWB sacarificação	Tratado previamente - 30% DWB sacarificação
Monômero de Glicose	2,7%	11,1%	20,6%
Glicose total	ND	ND	30,0%
Monômero de Xilose	0%	17,9%	18,9%
Xilose total	ND	ND	40,2%

ND: não determinado.

Os resultados demonstram que o tratamento prévio de serragem de álamo amarelo com amônia muito baixa permite liberação substancial de 20 açúcar em comparação com o controle não tratado previamente e que a sacarificação em peso seco alto de biomassa no reator PEHR é mais eficaz na liberação de açúcares que o frasco de agitação.

EXEMPLO 3**TRATAMENTO PRÉVIO E SACARIFICAÇÃO DE ESPIGAS DE MILHO EM CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA SECA MAIS ALTA EM REATOR PEHR**

Espigas de milho inteiras foram processadas com moedor de mordente (motor de 2,2 kW) com espaçamento de mordente de cerca de 0,95 cm, seguido por fragmentador (motor de 1,5 kW, Franklin Miller Inc., Livingston, NJ), seguido por peneiramento com peneira Sweco equipada com peneira padrão norte-americana de 1,9 cm. Cerca de 805 g de espigas fraturadas foram carregados no reator PEHR. O teor de umidade nas espigas foi de cerca de 7%. A atmosfera no recipiente do reator recebeu fluxo por cinco vezes com nitrogênio antes do carregamento. O reator, sem meios de atrito, foi aquecido previamente a 75 °C antes do início do experimento, sem rotação. Quando a temperatura no interior do recipiente do reator estabilizou-se a 75 °C, o mecanismo de rolamento no incubador foi ligado e a rotação ajustada em 19 rpm. A quantidade apropriada de solução diluída de hidróxido de amônio para gerar concentração de amônia de 6 g de amônia/100 g de peso seco de biomassa e concentração de sólidos de 50 g de peso seco de biomassa/100 g de peso total de mistura de biomassa e amônia foi bombeada em seguida para o reator. Etanol a 1 g/100 g de peso seco de biomassa também foi adicionado à solução. A solução de amônia foi bombeada através de circuito aquecido em banho de água aquecido a cerca de 75 °C, fabricado utilizando reator Parr de dois galões. A solução de hidróxido de amônio diluído aquecida foi injetada por meio de lança de injeção no recipiente do reator e pulverizada sobre as espigas fraturadas em rotação e tombamento no reator. O reator foi mantido a 75 °C por duas horas mediante rotação a 19 rpm. Ao final daquele período, aplicou-se vácuo (cerca de 85 kPa) ao recipiente do reator por trinta minutos para remover amônia e reduzir a temperatura do conteúdo do reator para cerca de 50 °C. Dióxido de carbono foi injetado em seguida no reator para liberar o vácuo e o

reator foi pressurizado até pressão medida de CO₂ de 103 kPa e mantido sob pressão por trinta minutos a 50 °C.

Em seguida, o reator foi despressurizado, aberto e foram adicionados meios de atrito. O pH do conteúdo foi ajustado em cerca de 5,5 por meio de injeção de 1 M tampão ácido cítrico sob pH 4,8 utilizando a lança de injeção, para aumentar a resistência de tampão ácido cítrico para cerca de 75 mM, mais adição de monidrato de ácido cítrico. O tampão de ácido cítrico foi injetado no reator após aquecimento a 50 °C e, em seguida, permitiu-se o equilíbrio do conteúdo por meio de incubação do reator a 50 °C e 19 rpm por uma hora. A injeção do tampão de ácido cítrico ao girar o reator utilizando a lança de injeção permitiu pulverização e distribuição mais regular do tampão sobre as partículas de milho tratado previamente. O reator foi removido do incubador, aberto e o pH de amostra foi determinado. Caso o pH fosse de mais de 5,5, agregava-se monidrato de ácido cítrico sólido adicional e o reator foi incubado com mistura a 50 °C por uma hora adicional. Este processo foi repetido até que o pH fosse de cerca de 5,5. Ao atingir-se o pH desejado, 12,9 mg/g de celulose Spezyme CP (Genencor) e 5 mg de proteína ativa por grama de associação de enzimas de celulose que consiste de β-glucosidase, xilanase, β-xilosidase e arabinofuranosidase foram carregados no reator. O reator permaneceu no incubador a 50 °C e 19 rpm por 72 horas. Após esse tratamento prévio e sacarificação, o rendimento de glicose de monômero foi de 62,0% e o rendimento de xilose de monômero foi de 31,0%. O rendimento de glicose total foi de 75,2% e xilose total foi de 80,3%.

EXEMPLO 4

25 TRATAMENTO PRÉVIO DE ESPIGAS EM CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA MAIS ALTA COM AMÔNIA MUITO BAIXA E CONDIÇÕES ALTERNADAS

Espigas de milho inteiras foram processadas com moinho martelo (moinho martelo de 25,4 cm, Glen Mills Inc., Clifton, NH) para passar através

de tela de 1,27 cm. Cerca de 805 g de espigas fraturadas foram carregados no reator PEHR. O teor de umidade nas espigas foi de cerca de 7%. Vinte e dois cilindros de atrito cerâmicos (diâmetro de 3,2 cm x comprimento de 3,2 cm; E. R. Advanced Ceramics, East Palestine, OH) também foram adicionados ao reator. O reator foi previamente aquecido a 95 °C antes do início do experimento, sem rotação. Aplicou-se vácuo (cerca de 85 kPa) ao recipiente do reator antes do início e o recipiente foi vedado. Quando a temperatura no interior do recipiente do reator estabilizou-se em 95 °C, o mecanismo de rolamento no incubador foi ligado e a rotação foi ajustada em 19 rpm. A quantidade apropriada de solução diluída de hidróxido de amônio para gerar concentração de amônia de 6 g de amônia/100 g de peso seco de biomassa e concentração de sólidos de 50 g de peso seco de biomassa/100 g de peso total de mistura de biomassa e amônia foi bombeada em seguida para o reator. A solução de amônia foi bombeada através de circuito aquecido em banho de água fervente fabricado utilizando reator Parr de dois galões. A solução de hidróxido de amônio diluído aquecida foi injetada por meio de lança de injeção no recipiente do reator e pulverizada sobre as espigas fraturadas em rotação e tombamento no reator. O reator foi mantido em 95 °C por duas horas enquanto gira a 19 rpm. Ao final daquele tempo, aplicou-se vácuo (cerca de 85 kPa) ao recipiente do reator por trinta minutos para remover amônia e reduzir a temperatura do conteúdo do reator para cerca de 50 °C. Dióxido de carbono foi injetado em seguida no reator para liberar o vácuo e o reator foi pressurizado até pressão medida de 103 kPa e mantido sob pressão por trinta minutos a 50 °C.

Em seguida, o reator foi despressurizado, aberto e o pH do conteúdo foi ajustado em cerca de 5,5 por meio da injeção de 1 M tampão de ácido cítrico, pH 4,8, no qual adicionou-se e dissolveu-se monoidrato de ácido cítrico. O tampão de ácido cítrico foi injetado no reator após aquecimento a 50

°C e, em seguida, permitiu-se que o conteúdo se equilibrasse por meio de incubação do reator a 50 °C e 19 rpm por uma hora. O reator foi removido do incubador, aberto e o pH de amostra foi determinado. Caso o pH fosse de mais de 5,5, agregou-se monidrato de ácido cítrico sólido adicional e o reator foi incubado com mistura a 50 °C por uma hora adicional. Este processo foi repetido até que o pH fosse de cerca de 5,5. Após atingir-se o pH desejado, 12,9 mg/g de celulose Spezyme CP (Genencor) e 5 mg de proteína ativa por grama de associação de enzimas de celulose que consiste de β -glucosidase, xilanase, β -xilosidase e arabinofuranosidase foram carregados no reator. O reator permaneceu no incubador a 50 °C e 19 rpm por 72 horas. Após esse tratamento prévio e sacarificação, o rendimento de glicose de monômero foi de 50,7% e o rendimento de xilose de monômero foi de 35,7%. Os rendimentos totais de glicose e xilose foram de 71,7% e 89,8%, respectivamente.

EXEMPLO 5

15 TRATAMENTO PRÉVIO DE ESPIGAS COM AMÔNIA MUITO BAIXA E BASE ADICIONAL

Espigas de milho inteiras foram processadas com moedor de mordente (motor de 2,2 kW) com espaçamento de mordentes de cerca de 0,95 cm, seguido por fragmentador (motor de 1,5 kW, Franklin Miller Inc.), seguido por peneiramento com peneira Sweco equipada com peneira padrão norte-americana de 1,9 cm. Cerca de 460 g de espigas fraturadas foram carregadas no reator PEHR. O teor de umidade nas espigas foi de cerca de 7%. O reator foi aquecido previamente a 95 °C antes do início do experimento, sem rotação. Aplicou-se vácuo (cerca de 85 kPa) ao recipiente do reator antes do início e o recipiente foi lacrado. Quando a temperatura no interior do recipiente reestabilizou-se em 95 °C, o mecanismo de rolamento no incubador foi ligado e a rotação foi ajustada em 19 rpm. A quantidade apropriada de solução de hidróxido de amônio para gerar concentração de amônia de 3,2 g de amônia/100 g de peso seco de biomassa e NaOH para gerar concentração de

1,9 g de NaOH/100 g de peso seco de biomassa, mantendo ao mesmo tempo concentração de sólidos de 30 g de peso seco de biomassa/100 g de peso total de mistura de biomassa e amônia foram bombeados em seguida no reator. A amônia e solução base adicional foi bombeada através de circuito aquecido em
5 banho de água fervente fabricado utilizando reator Parr de dois galões. A solução de hidróxido de amônio diluído aquecida foi injetada por meio de lança de injeção para o recipiente do reator e pulverizada sobre as espigas fraturadas em rotação e tombamento no reator. Após a injeção, o vácuo sobre o recipiente foi liberado até pressão atmosférica. O reator foi mantido a 95 °C por trinta
10 minutos e, em seguida, a temperatura foi reduzida para 85 °C, que foi mantida por quatro horas. Ao final desse período, aplicou-se vácuo (cerca de 85 kPa) ao recipiente de reação por trinta minutos para remover amônia e reduzir a temperatura do conteúdo do reator para cerca de 50 °C. Dióxido de carbono foi injetado em seguida no reator para liberar o vácuo e o reator foi pressurizado
15 até pressão medida de 103 kPa e mantido sob pressão por trinta minutos a 50 °C.

Em seguida, o reator foi despressurizado, aberto e o pH do conteúdo foi ajustado a cerca de 5,5 por meio de injeção de cerca de 75 ml de 1 M tampão de ácido cítrico, pH 4,8, no qual adicionou-se e dissolveu-se
20 monodrato de ácido cítrico. O tampão de ácido cítrico foi injetado no reator após aquecimento a 50 °C e o conteúdo foi mantido em seguida até o equilíbrio por meio de incubação do reator a 50 °C e 19 rpm por uma hora. Injeção do tampão de ácido cítrico mediante rotação do reator utilizando a lança de injeção permitiu pulverização e distribuição mais regular do tampão sobre as
25 partículas de espigas previamente tratadas. O reator foi removido do incubador, aberto e o pH de amostra foi determinado. Caso o pH fosse de mais de 5,5, agregava-se monodrato de ácido cítrico sólido adicional e o reator foi incubado com mistura a 50 °C por uma hora adicional. Este processo foi repetido até que

o pH fosse de cerca de 5,5. Após atingir-se o pH desejado, 28,4 mg/g de celulose Spezyme CP (Genencor) e 28,4 mg/g de celulose Multifect foram carregados no reator. O reator permaneceu no incubador a 50 °C e 19 rpm por 72 horas. Após esse tratamento prévio e sacarificação, o rendimento de glicose de monômero foi de 56,1% e o rendimento de xilose de monômero foi de 39,5%. Os rendimentos de glicose e xilose total foram de 82,8% e 84,2%, respectivamente. Estes valores são as médias de dois experimentos.

EXEMPLO 6

TRATAMENTO PRÉVIO E SACARIFICAÇÃO DE ESPIGAS DE MILHO EM ALTA

10 CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA SECA EM REATOR PEHR À TEMPERATURA AMBIENTE

Espigas de milho inteiras foram processadas com moedor de mordente (motor de 2,2 kW) com espaçamento de mordentes de cerca de 0,95 cm seguido por fragmentador (motor de 1,5 kW, Franklin Miller Inc.), seguido por peneiramento com peneira Sweco equipada com peneira padrão norte-americana de 1,9 cm. Cerca de 460 g de espigas fraturadas foram carregados no reator PEHR. O teor de umidade nas espigas foi de cerca de 7%. Vinte e dois cilindros de atrito cerâmicos (diâmetro de 3,2 cm x comprimento de 3,2 cm; E. R. Advanced Ceramics, East Palestine, OH) também foram adicionados ao reator. Aplicou-se vácuo (cerca de 85 kPa) ao recipiente do reator antes do início e o recipiente foi vedado. Quando a temperatura no interior do reator reestabilizou-se à temperatura ambiente (22 a 26 °C), o mecanismo de rolamento no incubador foi ligado e a rotação foi ajustada em 19 rpm. A quantidade apropriada de solução diluída de hidróxido de amônio para gerar concentração de amônia de 4 g de amônia/100 g de peso seco de biomassa, mantendo ao mesmo tempo concentração de sólidos de 30 g de peso seco de biomassa/peso total de mistura de biomassa e amônia foi bombeada em seguida para o reator. A solução diluída de hidróxido de amônio foi injetada por meio de lança de injeção para o recipiente do reator e pulverizada sobre as espigas fraturadas em rotação e tombamento no reator. Após a injeção, o

vácuo sobre cada recipiente foi liberado até a pressão atmosférica. O reator foi mantido à temperatura ambiente (22-26 °C) por 24 horas. Ao final daquele período, aplicou-se vácuo (cerca de 81 kPa) ao recipiente de reação por trinta minutos para remover amônia. Dióxido de carbono foi injetado em seguida no reator para liberar o vácuo e o reator foi pressurizado até pressão medida de 103 kPa com CO₂ e mantido sob pressão por trinta minutos à temperatura ambiente.

Em seguida, o reator foi despressurizado, aberto e o pH do conteúdo foi ajustado em cerca de 5,5 por meio da adição de monohidrato de ácido cítrico após aquecimento a 50 °C e mantido em seguida em equilíbrio por meio de incubação do reator a 50 °C e 19 rpm. O reator foi removido do incubador, aberto e o pH de amostra foi determinado. Caso o pH fosse de mais de 5,5, agregava-se monohidrato de ácido cítrico sólido adicional e o reator foi incubado com mistura a 50 °C. Este processo foi repetido até que o pH fosse de cerca de 5,5. Após atingir-se o pH desejado, 12,9 mg por grama de celulose Spezyme CP (Genencor) e 5 mg de proteína ativa por grama de associação de enzimas de celulose que consiste de β-glucosidase, xilanase, β-xilosidase e arabinofuranosidase foram carregados no reator. O reator permaneceu no incubador a 50 °C e 19 rpm por 72 horas. Após esse tratamento prévio e sacarificação, o rendimento de glicose de monômero foi de 41,7% e o rendimento de xilose de monômero foi de 25,4%. Os rendimentos totais de glicose e xilose foram de 50,1% e 53,2%, respectivamente. Estes valores foram as médias de dois experimentos.

EXEMPLO 7

TRATAMENTO PRÉVIO E SACARIFICAÇÃO DE BIOMASSA COMBINADA QUE CONTÉM ESPIGAS DE MILHO E DIFERENTES AMOSTRAS DE GRÃOS ESGOTADOS EM REATOR PEHR

As amostras de grãos esgotados foram preparadas a partir de:

1. Grãos de milho inteiros com dentes amarelos nº 2 (adquiridos da Agway).

2. Grãos de milho com gérmen retirado por meio do processo Quick Germ desenvolvido na Universidade de Illinois (Singh e Eckoff (1996), *Cereal Chem.* 74: 462-466). Material de partida foi obtido por meio de Vijay Singh da Universidade de Illinois.

3. Grãos de milho processados por meio do processo Quick Fiber para remover o gérmen e a fibra da casca (US 6.254.914). Material de partida foi obtido por meio de Vijay Singh da Universidade de Illinois.

4. Farelos de cerveja foram obtidos por meio da Cargill (Mineápolis, MN).

Grãos esgotados designam sólidos residuais do processamento de grãos em que o amido é convertido em açúcar. Os grãos esgotados foram produzidos essencialmente por meio de processo de uísque básico. Os diferentes materiais de partida foram tratados com enzimas degradantes de amido para produzir açúcares e o mingau resultante foi filtrado para recuperar os sólidos aglomerados de filtragem ou grãos esgotados.

Os materiais de partida foram moídos em moinho de amostras Foss (sede norte-americana: Eden Prarie, MN) Cyclotec 1093 (materiais de partida 1 e 2 acima) até 250 μm ou em misturador (materiais de partida 3 e 4 acima), combinados em seguida com água e 200 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em recipiente de reação de vidro agitado com revestimento de dois litros. O pH da mistura foi ajustado em 6,5 com 1 N NaOH e adicionou-se metade da α -amilase total (Spezyme HPA, Genencor International, Palo Alto CA). O recipiente de reação foi aquecido em seguida até 95 °C e a α -amilase restante foi adicionada vinte minutos mais tarde. Após permanecer a 95 °C pelo tempo especificado, o recipiente foi resfriado a 70 °C e o pH da mistura foi ajustado em 4,5 com 1 M HCl. Adicionou-se glucoamilase (Gzyme 480, Genencor) e a

temperatura foi adicionalmente rebaixada para 50 °C e mantida por uma noite. Nesse momento, o reator foi resfriado a menos de 40 °C e o conteúdo foi filtrado através de pano de filtro Dacron com tamanho de poros de 10 µm. O aglomerado de filtragem foi lavado com água e o aglomerado de filtragem final, ou grãos esgotados, foi seco a 105 °C por uma noite e armazenado à temperatura ambiente até o uso em experimentos de tratamento prévio. Condições específicas de reação para cada material de partida são relacionadas na Tabela 3 abaixo.

TABELA 3**PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE GRÃOS ESGOTADOS**

Material de partida	Material de partida adicionado (g)	Água adicionada (g)	α -amilase adicionada (ml)	Tempo total a 95 °C	Glucoamilase adicionada (ml)	Tempo a 50 °C (h)
1	375	1095	3	150	3	17
2	505	1095	3	150	3	23
3	1180	500	6	120	3	17,5
4	1160	500	6	120	3	18

Espigas de milho inteiras foram processadas com moedor de mordente (motor de 2,2 kW) com espaçamento de mordente de cerca de 0,95 cm, seguido por fragmentador (motor de 1,5 kW, Franklin Miller Inc., Livingston, NJ), seguido por peneiramento com peneira Sweco equipada com peneira padrão norte-americana de 1,9 cm. Espigas fraturadas foram carregadas com um tipo de grão esgotado, conforme relacionado na Tabela 3, em reator PEHR. Os grãos esgotados foram cerca de 10% do peso seco total de biomassa no reator. A carga de biomassa seca total foi de cerca de 473 g. Cada reator carregado foi aquecido previamente no incubador de rolo a 95 °C, sem rotação, antes do início do experimento. Aplicou-se vácuo (pressão medida de cerca de

85 kPa) ao recipiente de reação e o recipiente foi vedado. Quando a temperatura em cada recipiente de reação reestabilizou-se em 95 °C, iniciou-se a rotação a 19 rpm. Adicionou-se solução diluída de hidróxido de amônio para gerar concentração de amônia de 4 g de amônia/100 g de peso seco de biomassa e concentração de sólidos de 30 g de peso seco de biomassa/100 g de peso total de mistura de biomassa e amônia. Após a injeção, o vácuo sobre o recipiente foi liberado até pressão atmosférica. O reator foi mantido a 95 °C por trinta minutos e, em seguida, a temperatura foi rebaixada para 85 °C, na qual foi mantida por quatro horas com rotação. Ao final daquele período, aplicou-se vácuo (pressão medida de cerca de 85 kPa) ao recipiente do reator por trinta minutos para remover amônia e rebaixar a temperatura do conteúdo de cada reator para cerca de 50 °C. Dióxido de carbono foi injetado em seguida em cada reator para liberar o vácuo e os reatores foram pressurizados até pressão medida de 138 kPa com CO₂ e mantido sob pressão por trinta minutos a 50 °C.

Em seguida, o reator foi despressurizado, aberto e o pH do conteúdo foi ajustado em cerca de 5,5 por meio de injeção de 75 ml de 1 M tampão ácido cítrico, pH 4,8, no qual adicionou-se e dissolveu-se monidrato de ácido cítrico. O tampão de ácido cítrico foi injetado em cada reator após aquecimento a 50 °C e, em seguida, mantido em equilíbrio por meio de incubação dos reatores a 50 °C e 19 rpm por uma hora. Os reatores foram removidos do incubador, abertos e o pH de amostra foi determinado. Caso o pH fosse de mais de 5,5, agregava-se monidrato de ácido cítrico sólido adicional e os reatores foram incubados com rotação a 50 °C por uma hora adicional. Este processo foi repetido com a frequência necessária até obter pH para cada reator de cerca de 5,5. Ao atingir-se o pH desejado, 28,4 mg/g de celulase Spezyme CP de celulose (Genencor) e 10,1 mg de proteína ativa por grama de celulose de coquetel Diversa D2 que contém beta-glucosidase,

xilanase, beta-xilosidase e arabinofuranosidase foram carregados no reator. Os reatores permaneceram no incubador a 50 °C e 19 rpm por 72 horas. Após esse tratamento prévio e sacarificação, os rendimentos de açúcar foram testados conforme descrito nos Métodos Gerais. Os rendimentos de glicose e xilose, com base em glucano e xilano total chegando com as duas 5 alimentações, são exibidos na Tabela 4. Os rendimentos de amostras de biomassa de combinação de grãos esgotados mais espigas foram similares aos rendimentos da amostra de espiga isolada.

TABELA 4

10 **RENDIMENTOS DE AÇÚCAR APÓS O TRATAMENTO PRÉVIO E SACARIFICAÇÃO DE ALIMENTOS DE BIOMASSA COMBINADOS**

	Glicose de monômero	Rendimento total de glicose	Rendimento de xilose de monômero	Rendimento total de xilose
Somente espiga (média de duas)	68,2%	85,6%	41,8%	88,9%
Espiga + grãos esgotados Quick Germ	67,9%	86,5%	49,0%	86,5%
Espiga + grãos esgotados Quick Fiber	69,5%	88,3%	54,6%	87,3%
Espiga + grãos esgotados de farelo de produtores	65,6%	79,5%	48,3%	83,2%

EXEMPLO 8

TRATAMENTO PRÉVIO E SACARIFICAÇÃO DE BIOMASSA COMBINADA CONTENDO ESPIGAS DE MILHO, GRÃOS ESGOTADOS E COMPONENTES ADICIONAIS NO REATOR

15

PEHR

Espigas fraturadas e grãos esgotados em uísque, preparados

conforme descrito no Exemplo 7, foram combinados no reator PEHR conforme descrito no Exemplo 7. Além disso, foram adicionados outros componentes de grãos. Em uma amostra, amido (Sigma S4126, lote nº 093K0033) foi adicionado a 5 g/100 g de peso seco total de biomassa. Em outra amostra, óleo de milho (óleo de milho Sysco Classic, lote nº 4119095) foi adicionado em nível de cerca de 2 g/100 g de peso total de biomassa. As amostras foram tratadas previamente e sacarificadas conforme descrito no Exemplo 7. Os resultados são exibidos na Tabela 4. Estes resultados também apresentam comparação favorável com os dados de controle somente de espigas da Tabela 3.

10

TABELA 4

RENDIMENTOS DE AÇÚCAR RESULTANTES DE TRATAMENTO PRÉVIO E SACARIFICAÇÃO DE ESPIGAS, GRÃOS ESGOTADOS E COMPONENTES DE GRÃOS

ADICIONAIS

	Glicose de monômero	Rendimento total de glicose	Rendimento de xilose de monômero	Rendimento total de xilose
Espiga + grãos esgotados de uísque + amido	70,4%	90,2%	48,4%	96,1%
Espiga + grãos esgotados de uísque + óleo	79,2%	87,5%	54,9%	101,4%

EXEMPLO 9

15

TRATAMENTO PRÉVIO E SACARIFICAÇÃO DE BIOMASSA COMBINADA QUE CONTÉM ESPIGAS DE MILHO E FIBRA DE MILHO NO REATOR PEHR

Espigas de milho fraturadas e fibra de milho Farelo Cargill 80 (Cargill, Minnetonka, MN) foram combinadas de tal forma que a fibra fosse cerca de 10% da biomassa seca total. A biomassa combinada foi previamente

tratada e sacarificada conforme descrito no Exemplo 7. Os rendimentos de açúcar resultantes são exibidos na Tabela 5. Os rendimentos da biomassa de combinação de espiga mais fibra de milho foram similares aos rendimentos da amostra de espiga isolada.

5

TABELA 5**RENDIMENTOS DE AÇÚCAR RESULTANTES DO TRATAMENTO PRÉVIO DE ESPIGAS DE MILHO COMBINADAS COM FIBRA DE MILHO**

	Glicose de monômero	Rendimento total de glicose	Rendimento de xilose de monômero	Rendimento total de xilose
Espiga + Farelo Cargill 80	66,4%	82,3%	47,0%	83,5%

REIVINDICAÇÕES

1. SISTEMA DE PROCESSAMENTO DE BIOMASSA EM BATELADAS, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um aparelho que compreende:

5 (i) um recipiente de reação cilíndrico com abertura em pelo menos uma extremidade;

(ii) uma ou mais pás fixadas ao lado interno do mencionado recipiente;

10 (iii) meios de atrito que compreendem pelotas em livre flutuação no interior do recipiente de reação;

(iv) uma tampa para a extremidade aberta do mencionado recipiente, que compreende uma ou mais portas; e

15 (v) uma lança de injeção que compreende meio de fornecimento de um reagente de processamento, em que o mencionado meio é uma lança de injeção que se estende pelo comprimento do recipiente de reação e conectam-se a primeira porta na tampa de (iv); e

(b) meios de rotação das pás do recipiente.

20 2. SISTEMA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os meios de atrito do aparelho ocupam menos de cerca de 10% do volume do recipiente de reação.

3. SISTEMA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o aparelho compreende adicionalmente uma junção giratória conectada à porta na tampa do recipiente de reação.

25 4. SISTEMA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a segunda porta do aparelho é uma porta de adição de reagentes ao recipiente de reação, para amostragem do conteúdo do recipiente de reação, ou ambos.

5. SISTEMA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado

pelo fato de que o mencionado recipiente do aparelho é composto de um material não corrosivo capaz de suportar temperaturas que variam de cerca de -10°C a cerca de 220°C.

5 6. SISTEMA, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o recipiente do sistema é capaz de suportar temperaturas que variam de cerca de 4°C a cerca de 170°C.

7. SISTEMA, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o mencionado material é aço inoxidável.

10 8. SISTEMA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o mencionado recipiente do aparelho é composto de um material não corrosivo capaz de suportar pressões de até cerca de 1200 kPa.

9. SISTEMA, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o recipiente do aparelho é capaz de suportar pressões de até cerca de 310 kPa.

15 10. SISTEMA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as mencionadas pás do aparelho são fixadas em ângulos perpendiculares à superfície interna do recipiente de reação.

20 11. SISTEMA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o mencionado reagente de processamento do aparelho é uma solução aquosa que compreende amônia.

12. SISTEMA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o mencionado reagente de processamento do aparelho é uma mistura de enzimas de sacarificação.

25 13. SISTEMA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente meios de controle de temperatura.

14. SISTEMA, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que os mencionados meios de controle da temperatura são um

revestimento de controle da temperatura ou um incubador externo.

15. SISTEMA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente uma fonte de vácuo conectada à porta.

5 16. SISTEMA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o mencionado sistema fornece tratamento de biomassa em altas concentrações de biomassa seca que variam de cerca de 15% em peso a cerca de 80% em peso de uma mistura de biomassa e reagente.

10 17. SISTEMA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o mencionado sistema fornece tratamento de biomassa em altas concentrações de biomassa seca que variam de cerca de 15% em peso a cerca de 60% em peso de uma mistura de biomassa e reagente.

15 18. SISTEMA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os mencionados meios de rotação são rolos, eixo e manivela, cintas, rodas ou mancais de pino.

19. PROCESSO DE TRATAMENTO DE BIOMASSA, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) introdução de biomassa no recipiente de reação do aparelho conforme descrito no sistema da reivindicação 1;

20 (b) introdução de um reagente de processamento no recipiente de reação; e

(c) assimilação do mencionado reagente de processamento na mencionada biomassa por meio de rotação das pás do recipiente de rotação, por meio do quê as pás erguem e deixam cair os meios de atrito.

25 20. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o mencionado processo é um processo de tratamento prévio de biomassa.

21. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 20,

caracterizado pelo fato de que o mencionado reagente de processamento é uma solução aquosa que compreende amônia.

22. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o mencionado processo é um processo de
5 sacarificação.

23. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o mencionado reagente de processamento é uma mistura de enzimas de sacarificação.

24. PROCESSO DE TRATAMENTO DE BIOMASSA,
10 caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) tratamento prévio de biomassa no recipiente de reação do aparelho conforme descrito no sistema da reivindicação 1, produzindo biomassa previamente tratada;

(b) ajuste da temperatura e do pH da biomassa previamente
15 tratada de (a) no recipiente de reação; e

(c) sacarificação da biomassa previamente tratada ajustada de (b) no recipiente de reação.

25. PROCESSO DE TRATAMENTO PRÉVIO DE BIOMASSA, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) introdução de biomassa no recipiente de reação do
20 aparelho conforme descrito no sistema da reivindicação 1;

(b) contato da mencionada biomassa com uma solução aquosa que compreende amônia para formar uma mistura de biomassa e amônia aquosa no recipiente de reação, em que a amônia está presente em
25 uma concentração pelo menos suficiente para manter o pH alcalino da mistura de biomassa e amônia aquosa, mas em que a mencionada amônia encontra-se presente em menos de cerca de 12% em peso com relação ao peso seco de biomassa e, adicionalmente, em que o peso seco de biomassa encontra-se em

alta concentração de sólidos de pelo menos cerca de 15% em peso com relação ao peso da mistura de biomassa e amônia aquosa.

26. PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO DE BIOMASSA, previamente tratada em alta concentração de biomassa seca, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) fornecimento de biomassa, em que a mencionada biomassa tenha sido opcionalmente tratada previamente para fornecer uma composição facilmente sacarificável;

(b) fornecimento de uma associação de enzimas capaz de hidrolisar a biomassa de (a);

(c) assimilação das enzimas de (b) na biomassa de (a) no aparelho conforme descrito no sistema da reivindicação 1.

27. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que são produzidos açúcares fermentáveis.

28. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o peso seco de biomassa encontra-se em alta concentração de sólidos de pelo menos cerca de 15% em peso com relação ao peso da mistura de biomassa e reagente.

29. PROCESSO, de acordo com uma das reivindicações 25 ou 26, caracterizado pelo fato de que a mencionada biomassa é selecionada a partir do grupo que consiste de brotos de grama, resíduos de papel, lodo de fabricação de papel, grãos de milho, espigas de milho, cascas de milho, forragem de milho, gramas, trigo, palha de trigo, feno, cevada, palha de cevada, palha de arroz, bagaço de cana de açúcar, sorgo, soja, componentes obtidos por meio do processamento de grãos, árvores, ramos, raízes, folhas, lascas de madeira, serragem, arbustos e moitas, vegetais, frutas, flores e esterco animal.

30. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 29,

caracterizado pelo fato de que a biomassa é selecionada a partir do grupo que consiste de espigas de milho, forragem de milho, cascas de milho, bagaço de cana de açúcar, serragem, brotos de grama, palha de trigo, feno, palha de arroz e gramas.

5 31. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a biomassa é selecionada a partir do grupo que consiste de espigas de milho, forragem de milho, serragem e bagaço de cana de açúcar.

10 32. PROCESSO, de acordo com uma das reivindicações 25 ou 26, caracterizado pelo fato de que a mencionada biomassa é derivada de diversos estoques de alimentação.

33. MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO DE TRATAMENTO, caracterizado pelo fato de que compreende:

15 (a) introdução de biomassa no recipiente de reação do aparelho conforme descrito no sistema da reivindicação 1;

 (b) variação das condições de tratamento no recipiente de reação;

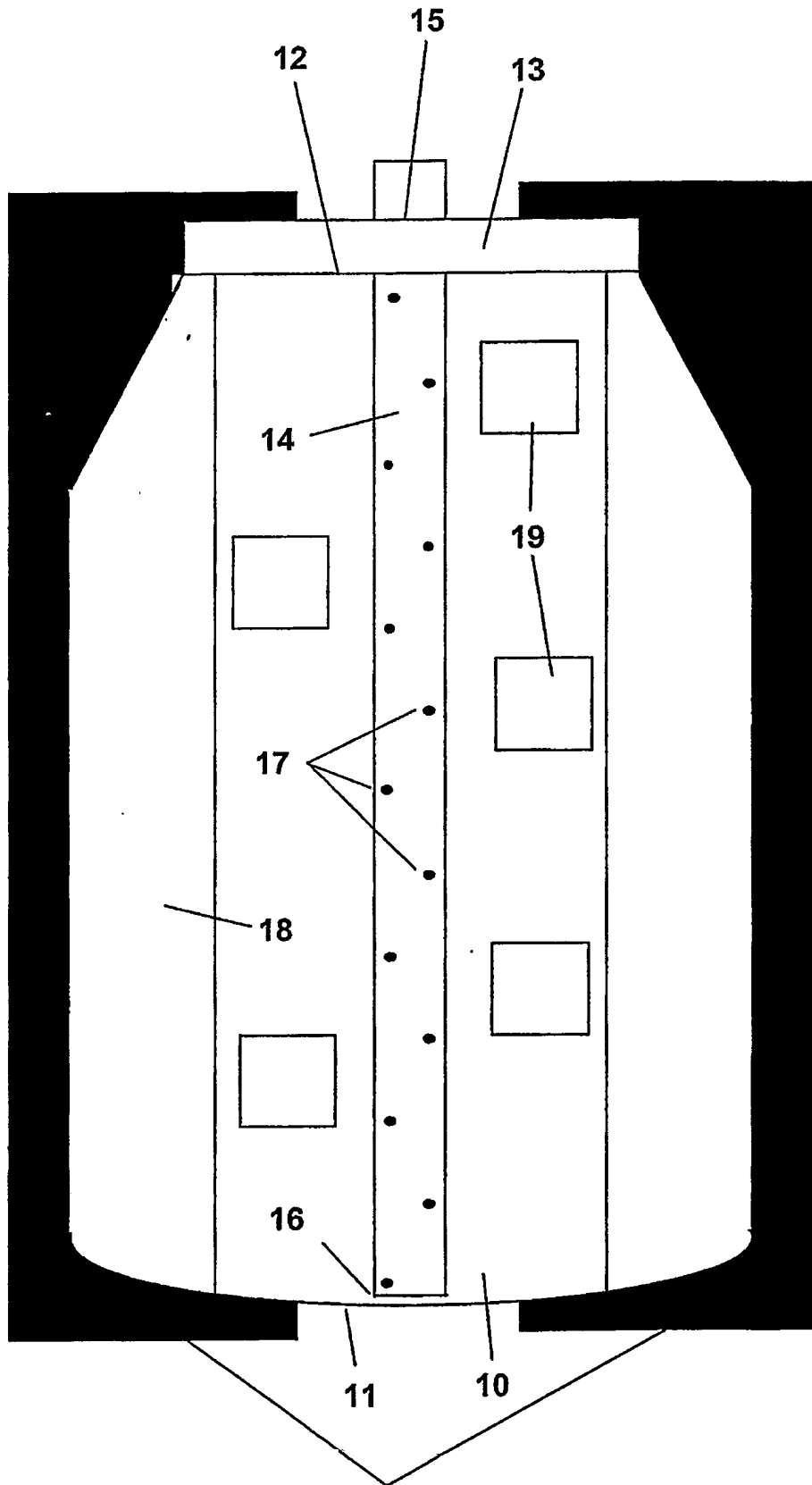
 (c) amostragem da biomassa tratada por meio da mencionada uma ou mais portas, sob as mencionadas condições de tratamento variáveis; e

20 (d) teste das mencionadas amostras para determinar condições de tratamento ideais para o processamento de biomassa.

34. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que as mencionadas condições variáveis incluem pH, temperatura, reagentes de processamento e concentrações de reagentes de
25 processamento, percentual inicial de peso seco de biomassa na mistura de biomassa e reagente, tipo e forma de biomassa, tipo de atmosfera inerte, pressão, estratégias de alimentação para reagentes de processamento e tempo de processamento.

35. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o mencionado processo de tratamento é um processo de sacarificação.

5 36. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o mencionado processo de tratamento é um processo de tratamento prévio.



20
Fig. 1

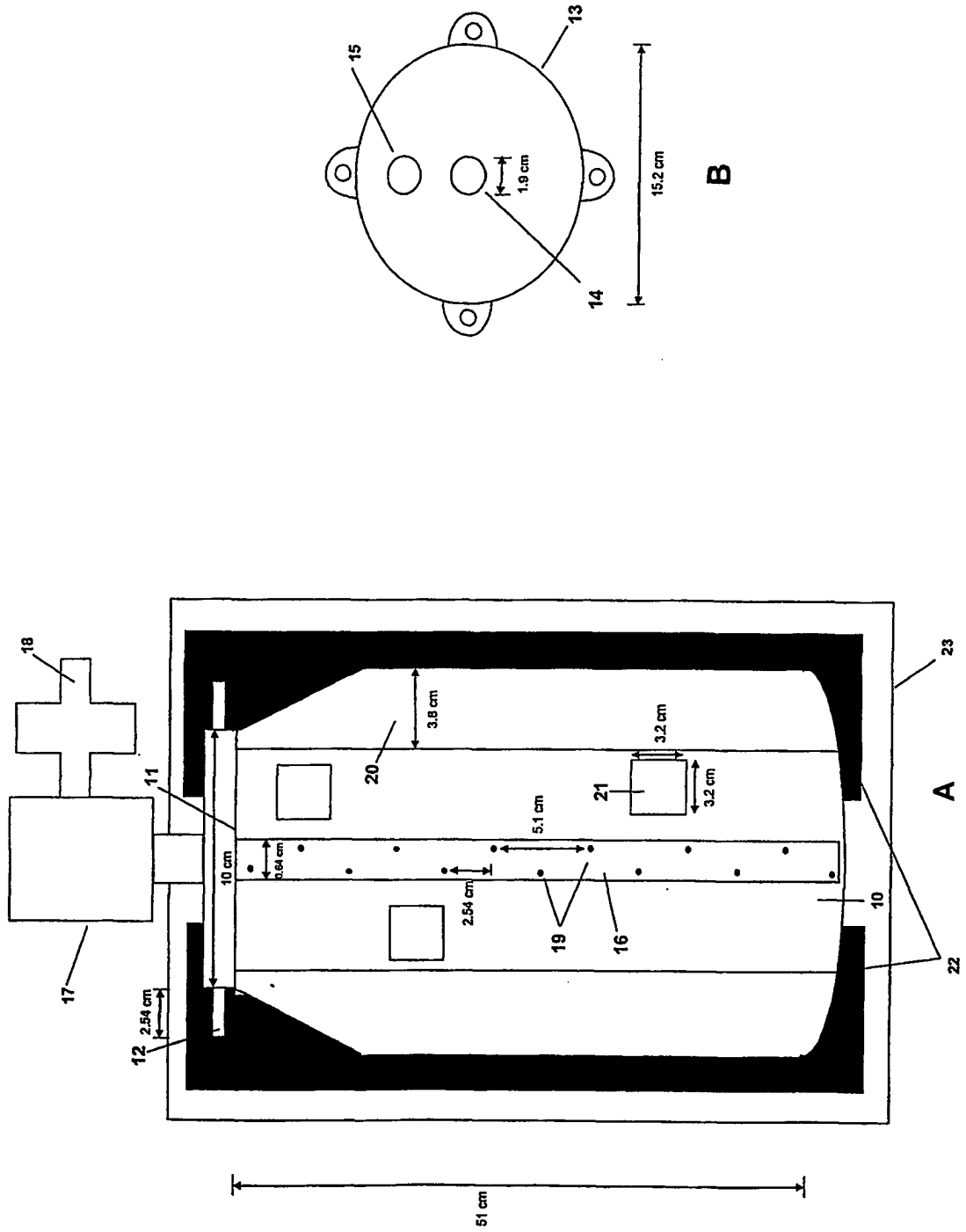


Fig. 2

RESUMO**“SISTEMA DE PROCESSAMENTO DE BIOMASSA EM BATELADAS,
PROCESSOS DE TRATAMENTO DE BIOMASSA, PROCESSO DE
TRATAMENTO PRÉVIO DE BIOMASSA, PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO
5 DE BIOMASSA E MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO DE
TRATAMENTO”**

É apresentado um sistema que inclui um aparelho para tratamento de biomassa que permite o tratamento bem sucedido de biomassa em alto peso seco de sólidos de biomassa na mistura de biomassa. O projeto
10 do sistema fornece extensa distribuição de reagente por meio da difusão do reagente sobre a biomassa à medida que o reagente é introduzido através de lança de injeção, enquanto a biomassa é girada utilizando pás (18). O sistema de aparelho fornece extensa assimilação do reagente na biomassa utilizando pás (18) para erguer e deixar cair a biomassa, bem como meios de atrito (19)
15 que caem sobre a biomassa para melhorar o processo de tratamento.