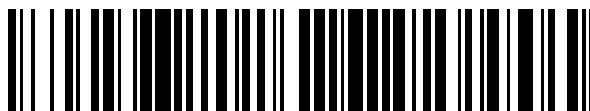


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 485**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 5/02 (2006.01)

C12P 7/04 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2009 E 13168384 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2647717**

54 Título: **Procesamiento de biomasa**

30 Prioridad:

30.04.2008 US 49407 P
03.04.2009 US 417840

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.07.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MEDOFF, MARSHALL y
MASTERMAN, CRAIG THOMAS

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 576 485 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procesamiento de biomasa

5 CAMPO TÉCNICO

Esta invención se refiere al procesamiento de biomasa y productos hechos a partir de la misma.

ANTECEDENTES

10

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

15

Se han descrito diferentes materiales celulósicos y lignocelulósicos, sus usos y aplicaciones en las patentes de EE. UU. n° 7.307.108, 7.074.918, 6.448.307, 6.258.876, 6.207.729, 5.973.035 y 5.952.105; y diferentes solicitudes de patente, incluyendo "FIBROUS MATERIALS AND COMPOSITES," PCT/US2006/010648, presentada el 23 de marzo, 2006, y "FIBROUS MATERIALS AND COMPOSITES," publicación de solicitud de patente de EE. UU. n°

20

2007/0045456.

Debido a que los materiales celulósicos y lignocelulósicos están disponibles de forma tan amplia, y los materiales celulósicos y lignocelulósicos de desecho deben ser eliminados, sería ventajoso darles un buen uso a dichos materiales. Se ha considerado el uso de los materiales celulósicos y lignocelulósicos para hacer biocombustibles

25

tales como etanol, pero todavía no se ha implementado comercialmente a gran escala.

Petersson et al (Biomass and Bioenergy 31 (2007), 812-819) describe la producción potencial de bioetanol y biogás mediante biomasa lignocelulósica de centeno de invierno, colza y habas.

30

Felby et al (ACS Symposium Series, American Chemical Society/Oxford University Press, EE. UU., vol. 855, 1 de enero de 2003, pág. 157-174) desvela la producción de etanol a partir de celulosa de paja de trigo mediante pretratamiento de oxidación húmeda y sacarificación y fermentación simultáneas.

Garde et al (Bioresource Technology, 81(2002), 217-223) desvela la producción de ácido láctico a partir de

35

hidrolizado de hemicelulosa de paja de trigo mediante *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus brevis*.

Kopsahelis et al (Bioresource Technology, 98(2007), 1440-1447) describe el estudio comparativo de los bagazos y bagazos deslignificados como apoyo de la levadura para la producción de alcohol a partir de melaza.

40

Agouridis et al (J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 2546-2551) desvela la fermentación maloláctica en el vino con células de *Lactobacillus casei* inmovilizadas en material celulósico deslignificado.

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

45

Zhang et al (Ind. Eng. Chem. Res 2005, 44, 9279-9285) desvela la caracterización del desarrollo de ácido carboxílico de fibra durante la deslignificación con oxígeno de una etapa.

US 4.769.082 describe un método de pretratamiento en la sacarificación y fermentación de los recursos de celulosa

50

de residuos.

RESUMEN

En general, los materiales que contienen carbohidratos (por ejemplo, materiales de biomasa o materiales derivados de biomasa) se describen en la presente memoria, por ejemplo materiales amiláceos, materiales celulósicos, materiales lignocelulósicos, o los materiales de biomasa que son o que incluyen cantidades significativas de azúcares de bajo peso molecular (por ejemplo, monosacáridos, disacáridos, o trisacáridos) y métodos para hacer y procesar tales materiales con el fin de cambiar su estructura, por ejemplo, funcionalizar estos materiales con uno o más tipos deseados y cantidades de grupos funcionales. Los productos hechos de los materiales estructuralmente

60

cambiados también se describen. Por ejemplo, muchos de los métodos que se describen aquí pueden proveer

materiales celulósicos y/o lignocelulósicos que tienen un menor peso molecular y/o cristalinidad con relación a un material nativo. Muchos de los métodos proveen materiales que pueden ser utilizados más fácilmente por una variedad de microorganismos para hacer productos útiles, como por ejemplo hidrógeno, alcoholes (por ejemplo, etanol o butanol), ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético), hidrocarburos, subproductos (por ejemplo, proteínas) o mezclas de cualquiera de los mismos.

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

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

La propia biomasa puede no convertirse en sí misma en el producto (tal como etanol), o puede convertirse parcial o totalmente en el producto junto con el azúcar de bajo peso molecular.

En aspectos donde la biomasa es convertida parcialmente, el área de superficie y la porosidad de la biomasa se incrementa en relación con el área de superficie y la porosidad de la biomasa inicial, lo cual puede incrementar ventajosamente la velocidad de conversión del azúcar de bajo peso molecular al producto.

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

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

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

Por ejemplo, se puede añadir un material de biomasa irradiado o no irradiado, p. ej., una fibra de papel, a un procedimiento de fermentación, tal como durante una fermentación de maíz-etanol o una fermentación de extracto de caña de azúcar, para aumentar la tasa de producción en 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100 por ciento o más, p. ej., 150 por ciento. El material de biomasa puede tener una superficie específica alta, alta porosidad, y/o baja densidad aparente. En algunas realizaciones, la biomasa está presente en la mezcla de aproximadamente 0,5 por ciento a aproximadamente 50 por ciento en peso, tal como entre aproximadamente 1 por ciento en peso y aproximadamente 25 por ciento en peso, o entre aproximadamente 2 por ciento en peso y aproximadamente 12,5 por ciento en peso. En otras realizaciones, la biomasa está presente en cantidades mayores de aproximadamente 0,5 por ciento en peso, tales como mayores de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso mayor de aproximadamente 10 por

ciento en peso. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un material oxidado, tratado con ultrasonidos, explotado con vapor y/o pirolizado, tal como una fibra de algodón o papel, se puede añadir a un proceso de fermentación de azúcar de bajo peso molecular, por ejemplo, para intensificar la velocidad de fermentación y rendimiento.

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

Algunas implementaciones incluyen una o más de las siguientes características.

10

La biomasa puede comprender un material fibroso. La conversión puede incluir permitir que el microorganismo convierta al menos una parte del azúcar de bajo peso molecular en etanol. A partir del ejemplo, la conversión puede comprender fermentación. Los microorganismos pueden comprender una levadura, p. ej., seleccionada del grupo que consiste en *S. cerevisiae* y *P. stipitis*, o una bacteria tal como *Zymomonas mobilis*. La conversión puede

15

presentar un porcentaje de rendimiento de al menos 140%, en algunos casos al menos 170%.

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

20

biomasa.

La biomasa puede tener una densidad aparente de menos de aproximadamente 0,5 g/cm³. La biomasa puede tener una superficie específica BET mayor que 0,25 m²/g y/o una relación de longitud a diámetro de al menos 5. La biomasa puede tener una porosidad mayor que 50%, p. ej., mayor que 70%.

25

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

30

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

35

coco, algodón, algas marinas, algas, y mezclas de los mismos.

El método puede incluir además someter la biomasa a hidrólisis enzimática, y en algunos casos, convertir el material hidrolizado al producto.

- 40 En otro aspecto, la invención caracteriza un método para disolver un material celulósico o lignocelulósico, comprendiendo el método combinar un material celulósico o lignocelulósico con un sistema de disolventes comprendiendo DMSO y una sal.

Los sistemas de disolventes para materiales celulósicos y lignocelulósicos incluyen sistemas de DMSO-sal. Tales sistemas incluyen, por ejemplo, DMSO en combinación con una sal de litio, magnesio, potasio, sodio o cinc. Las sales de litio incluyen LiCl, LiBr, LiI, perclorato de litio y nitrato de litio. Las sales de magnesio incluyen nitrato de magnesio y cloruro de magnesio. Las sales de potasio incluyen yoduro y nitrato de potasio. Ejemplos de sales de sodio incluyen yoduro de sodio y nitrato. Ejemplos de sales de cinc incluyen cloruro y nitrato de cinc. Cualquier sal puede ser anhidra o hidratada. Las cargas típicas de la sal en DMSO están entre aproximadamente 1 y

50

aproximadamente 50 por ciento, por ejemplo, entre aproximadamente 2 y 25, entre aproximadamente 3 y 15 o entre aproximadamente 4 y 12,5 por ciento en peso.

En otras implementaciones, la sal puede ser una sal de fluoruro, por ejemplo, fluoruro de tetrabutilamonio. El método puede incluir además irradiar el material celulósico o lignocelulósico. El material celulósico o lignocelulósico se puede seleccionar del grupo que consiste en papel, productos de papel, residuos de papel, madera, tableros de partículas, serrín, residuos agrícolas, aguas residuales, ensilado, hierbas, cáscaras de arroz, bagazo, algodón, yute, cáñamo, lino, bambú, sisal, abacá, paja, mazorcas de maíz, rastrojo de maíz, mijos, alfalfa, heno, cáscaras de arroz, fibra de coco, algodón, algas marinas, algas, y mezclas de los mismos. En algunos casos, el material celulósico o lignocelulósico tiene una densidad en masa de menos de aproximadamente 0,5 g/cm³ (antes de la adición al sistema de solventes) y una porosidad de al menos 50%.

60

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

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

Los métodos para cambiar una estructura molecular y/o supramolecular de una materia prima de biomasa se describen en la presente memoria, que incluyen 1) irradiar la materia prima de biomasa con radiación, tal como fotones, electrones o iones de suficiente energía para ionizar la materia prima de biomasa, para proporcionar un primer nivel de radicales, por ejemplo, los cuales son detectables con un espectrómetro de resonancia de espín de electrones; 2) extinguir los radicales a un grado en que los radicales están a un segundo nivel menor que el primer nivel, de manera que a un nivel que ya no es detectable con el espectrómetro de resonancia de espín de electrones, por ejemplo, tal como a un nivel menor que aproximadamente 10^{14} espines; y 3) procesar la materia prima de biomasa irradiada para producir un producto. Si se desea, antes de la irradiación y/o después de la irradiación, la materia prima de biomasa puede ser preparada reduciendo una o más dimensiones de piezas individuales de la materia prima de biomasa.

En algunas implementaciones, el paso de procesamiento incluye hacer un producto, tal como un combustible, tal como un combustible, tal como un motor, un combustible de aviación o un combustible de celda de combustible, por ejemplo, para generar electricidad, convirtiendo la materia prima de biomasa irradiada con un microorganismo con capacidad para convertir al menos una porción, por ejemplo, al menos aproximadamente 1 por ciento en peso, de la biomasa al producto.

En algunas realizaciones, la irradiación es realizada sobre la materia prima de biomasa mientras que la materia prima de biomasa es expuesta a aire, nitrógeno, oxígeno, helio o argón. En algunas realizaciones, el pretratamiento puede incluir pretratar la materia prima de biomasa con explosión de vapor.

En algunas realizaciones, el método incluye además reducir una o más dimensiones de piezas individuales de biomasa, por ejemplo, mediante corte transversal, molienda húmeda o seca, corte, estrujado, compresión o mezclas de cualquiera de estos procesos. Por ejemplo, la cizalladura se puede llevar a cabo con una cortadora de cuchillas rotativas. El corte transversal puede producir fibras teniendo una proporción promedio de longitud-a-diámetro mayor que 5/1 o al menos 5. En algunas realizaciones, la biomasa preparada puede tener un área de superficie BET mayor que 0,25 m²/g. En algunos casos, la biomasa tiene fibras internas, y la biomasa puede ser cortada a un grado en que las fibras internas de la biomasa resultan substancialmente expuestas. La biomasa puede ser cortada a un grado que tenga una densidad en masa de menos de aproximadamente 0,35 g/cm³.

En algunas realizaciones, el proceso no incluye hidrolizar la biomasa con un ácido o una base. Por ejemplo, al menos aproximadamente 70 por ciento en peso de la biomasa puede ser no hidrolizado, p. ej. al menos 95 por ciento en peso de la biomasa es un material no hidrolizado. En realizaciones específicas, substancialmente nada de la biomasa ha sido hidrolizada.

En algunas realizaciones, la irradiación es realizada sobre biomasa, en la cual menos de aproximadamente 25 por ciento en peso de la biomasa es humectada con un líquido, tal como agua. De manera específica, en algunas realizaciones, al menos un método de pretratamiento es realizado en biomasa, en la cual substancialmente nada de la biomasa es humectada con un líquido, tal como agua. La biomasa puede tener, por ejemplo, menos de aproximadamente cinco por ciento en peso de agua retenida, medida a 25 °C y un cincuenta por ciento de humedad relativa.

En algunas realizaciones, la irradiación es realizada en biomasa, en la cual menos de aproximadamente 25 por

ciento en peso de la biomasa está en un estado hinchado, siendo caracterizado el estado hinchado por tener un volumen de más de aproximadamente 2,5 por ciento mayor que un estado no hinchado. En otras realizaciones, la biomasa es mezclada con o incluye un agente de hinchamiento.

- 5 La presión puede ser utilizada en cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, la irradiación puede ser realizada en la biomasa bajo una presión de más de aproximadamente 2,5 atmósferas, tal como mayor que 5 o 10 atmósferas.

En otro aspecto, una mezcla incluye un azúcar de bajo peso molecular, un material de biomasa y un disolvente. En
10 algunos casos, la mezcla también incluye un microorganismo.

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

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

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

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

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

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

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

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

55 Cuando se usa un microorganismo, puede ser un microorganismo natural o un microorganismo genéticamente modificado. Por ejemplo, el microorganismo puede ser una bacteria, p.ej, una bacteria celulolítica, un hongo, p. ej., una levadura, una planta o un protista, p. ej., un alga, un protozoo o un protista de tipo hongo, p. ej., un moho del fango. Cuando los organismos son compatibles, se pueden usar mezclas. En general, varios microorganismos pueden producir una variedad de productos útiles, tales como un combustible, al operar sobre, por ejemplo,
60 fermentar los materiales Por ejemplo, alcoholes, ácidos orgánicos, hidrocarburos, hidrógeno, proteínas o mezclas de

cualquiera de estos materiales pueden producirse mediante fermentación u otros procesos.

Los ejemplos de productos que se pueden producir usando los métodos descritos en la presente memoria incluyen alcoholes alquílicos C1-C6 mono y polifuncionales y ácidos carboxílicos mono y polifuncionales, hidrocarburos C1-C6, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos específicos de alcoholes adecuados incluyen metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, etilenglicol, propilenglicol, 1,4-butanodiol, glicerina, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos específicos de ácidos carboxílicos adecuados incluyen ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caproico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido γ -hidroxibutírico y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de hidrocarburos adecuados incluyen metano, etano, propano, pentano, n-hexano, y combinaciones de los mismos. Muchos de estos productos se pueden usar como combustibles. Otros productos se describen en US2009312357. Los productos o coproductos pueden ser productos dirigidos a ser usados como producidos o los productos producidos pueden ser productos intermedios para cualquier otro procedimiento descrito en la presente memoria o cualquier procedimiento descrito en cualquier solicitud descrita en la presente memoria.

Los ejemplos de microorganismos que se pueden usar para producir productos útiles, incluyen bacterias, levaduras o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el microorganismo puede ser una bacteria, p.ej, una bacteria celulolítica, un hongo, p. ej., una levadura, una planta o un protista, p. ej., un alga, un protozoo o un protista de tipo hongo, p. ej., un moho del fango.

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

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

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

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

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

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

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

La “materia prima lignocelulósica” es cualquier tipo de biomasa vegetal tal como, pero no limitado a biomasa vegetal no leñosa, cultivos cultivados tales como, pero no limitado a hierbas, por ejemplo, pero no limitado a hierbas C4, tales como mijo, espartina, raigrás, miscanthus, hierba cinta, o una combinación de los mismos, o restos del procesado del azúcar, tales como bagazo, o pulpa de remolacha, restos agrícolas, por ejemplo, rastrojo de soja,

rastrajo de maíz, paja de arroz, cáscaras de arroz, rastrojo de cebada, mazorcas de maíz, paja de trigo, paja de canola, paja de arroz, paja de avena, cáscaras de avena, fibra de maíz, fibra de pasta de madera reciclada, serrín, madera dura, por ejemplo, madera y serrín de álamo, madera blanda, o una combinación de los mismos. Además, la materia prima lignocelulósica puede incluir material residual celulósico tal como, pero no limitado a papel de

5 periódico, carbón, serrín y similares.

La materia prima lignocelulósica puede incluir una especie de fibra o alternatively, la materia prima lignocelulósica puede incluir una mezcla de fibras que proceden de diferentes materias primas lignocelulósicas. Además, la materia prima lignocelulósica puede comprender materia prima lignocelulósica reciente, materia prima

10 lignocelulósica parcialmente secada, materia prima lignocelulósica totalmente secada o una combinación de los mismos.

Para los fines de esta descripción, los hidratos de carbono son materiales que están compuestos enteramente de una o más unidades de sacárido, o que incluyen una o más unidades de sacárido. Las unidades de sacárido pueden

15 estar funcionalizadas en el anillo con uno o más grupos funcionales, tales como grupos ácido carboxílico, grupos amino, grupos nitro, grupos nitroso o grupos nitrilo, y todavía se consideran hidratos de carbono. Los hidratos de carbono pueden ser poliméricos (p. ej., con un número de unidades monómeras igual o mayor que 10, 100, 1.000, 10.000 o 100.000), oligómeros (p. ej., con un número de unidades monómeras igual o mayor que 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10), trímeras, dímeras o monómeras). Cuando los hidratos de carbono están formados de más de una sola unidad

20 que se repite, cada unidad que se repite puede ser igual o diferente.

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

25

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

madera.

30 Un material amiláceo es uno que es o incluye cantidades significativas de almidón o un derivado de almidón, tal como más de aproximadamente 5 por ciento en peso de almidón o derivado de almidón. Para los fines de esta descripción, un almidón es un material que es o incluye una amilosa, una amilopectina, o una mezcla física y/o química de los mismos, p. ej., una mezcla de 20:80 o 30:70 por ciento en peso de amilosa a amilopectina. Por ejemplo, el arroz, el maíz y las mezclas de los mismos son materiales amiláceos. Los derivados de almidón incluyen,

35 p. ej., maltodextrina, almidón modificado con ácido, almidón modificado con base, almidón blanqueado, almidón oxidado, almidón acetilado, almidón acetilado y oxidado, almidón modificado con fosfato, almidón genéticamente modificado, y almidón que es resistente a la digestión.

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

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

Los agentes de hinchamiento como se usa en la presente memoria, son materiales que producen un hinchamiento discernible, p. ej., un aumento de 2,5 por ciento del volumen respecto al estado no hinchado de los materiales

50 celulósicos y/o lignocelulósicos, cuando se aplican a dichos materiales como una solución, p. ej., una solución en agua. Los ejemplos incluyen sustancias alcalinas, tales como hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido de litio e hidróxido amónico, agentes acidificantes, tales como ácidos minerales (p. ej., ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y ácido fosfórico), sales tales como cloruro de cinc, carbonato de calcio, carbonato sódico, sulfato de benciltrimetilamonio, y aminas orgánicas básicas, tales como etilendiamina.

55

Un "material cizallado", como se usa en la presente memoria, es un material que incluye fibras discretas en las que al menos aproximadamente 50% de las fibras discretas tienen una relación de longitud/diámetro (L/D) de al menos aproximadamente 5, y que tiene una densidad aparente no comprimida menor que aproximadamente 0,6 g/cm³. Un material cizallado es, por lo tanto, diferente de un material que se ha cortado, picado o triturado.

60

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

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque se
10 pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva incluyendo definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

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

Descripción de los dibujos

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

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

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

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

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

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

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

35

La figura 7B es un corte transversal de un pelet hueco en el que un centro del hueco está alineado con un centro del pelet.

La figura 7C es un corte transversal de un pelet hueco en el que un centro del hueco no está alineado con un centro
40 del pelet.

La figura 7D es un corte transversal de un pelet trilobular.

La figura 8 es un diagrama de bloques que ilustra una secuencia de tratamiento para el procesamiento de la materia
45 prima.

La figura 9 es una vista en corte, en perspectiva, de un dispositivo de irradiación gamma albergado en una cámara de cemento.

50 La figura 10 es una vista en perspectiva aumentada de la región R de la figura 9.

La figura 11A es un diagrama de bloques que ilustra una secuencia de pretratamiento de materia prima por irradiación con haz de electrones.

55 La figura 11B es una representación esquemática de biomasa que es ionizada, y después oxidada o inactivada.

La figura 12 es una vista esquemática de un sistema para el tratamiento por ultrasonidos de una corriente del procedimiento del material celulósico en un medio líquido.

60 La figura 13 es una vista esquemática de un dispositivo de ultrasonidos que tiene dos transductores acoplados a un

solo sonotrodo.

La figura 14 es un diagrama de bloques que ilustra un sistema de pretratamiento pirolítico de la materia prima.

5 La figura 15 es una vista lateral de corte transversal de una cámara de pirólisis.

La figura 16 es una vista lateral de corte transversal de una cámara de pirólisis.

La figura 17 es una vista lateral de corte transversal de un pirolizador que incluye un filamento calentado.

10

La figura 18 es una vista lateral esquemática del corte transversal de un pirolizador Curie-Point.

La figura 19 es una vista lateral esquemática del corte transversal de un pirolizador de horno.

15 La figura 20 es una vista superior esquemática del corte transversal de un aparato de pirólisis por láser.

La figura 21 es una vista superior esquemática del corte transversal de un pirolizador flash de filamento de tungsteno.

20 La figura 22 es un diagrama de bloques que ilustra un sistema de pretratamiento oxidativo de la materia prima.

La figura 23 es un diagrama de bloques que ilustra una visión general del procedimiento de conversión de una fuente de fibra en un producto, p. ej., etanol.

25 La figura 24 es una vista de corte transversal de un aparato de explosión de vapor.

La figura 25 es una vista lateral esquemática del corte transversal de un dispositivo híbrido de haz de electrones/ultrasonidos.

30 La figura 26 es una micrografía electrónica de barrido de un material fibroso producido a partir de papel polirrevestido con 25X aumentos. El material fibroso se produjo en una cortadora de cuchillas rotativas usando un tamiz con aberturas de 1/8 pulgadas.

La figura 27 es una micrografía electrónica de barrido de un material fibroso producido a partir de cartón Kraft blanqueado con 25X aumentos. El material fibroso se produjo en una cortadora de cuchillas rotativas usando un tamiz con aberturas de 1/8 pulgadas.

35

La figura 28 es una micrografía electrónica de barrido de un material fibroso producido a partir de cartón Kraft blanqueado con 25X aumentos. El material fibroso se cizalló dos veces en una cortadora de cuchillas rotativas usando un tamiz con aberturas de 1/16 pulgadas durante cada cizalladura.

40

La figura 29 es una micrografía electrónica de barrido de un material fibroso producido a partir de cartón Kraft blanqueado con 25X aumentos. El material fibroso se cizalló tres veces en una cortadora de cuchillas rotativas. Durante la primera cizalladura, se usó un tamiz de 1/8 pulgadas; durante la segunda cizalladura se usó un tamiz de 1/16 pulgadas, y durante la tercera cizalladura se usó un tamiz de 1/32 pulgadas.

45

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

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

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

55

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

60 La figura 35 es una micrografía de barrido electrónica del material fibroso de la figura 32 después de irradiar con 10

Mrad y tratamiento con ultrasonidos, con 1000 X aumentos.

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

5

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

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

10

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

15

10% en p/p de la muestra P-100e.

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

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

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La biomasa (por ejemplo, biomasa, tal como las que son o incluyen uno o más azúcares de bajo peso molecular, biomasa animal y biomasa de residuos municipales) puede ser procesada para producir productos útiles tales como combustibles, por ejemplo, combustibles para motores de combustión interna, motores de jet o materia prima para celdas de combustible. Además, los materiales funcionalizados que tienen los tipos y cantidades deseadas de grupos funcionales, tales como grupos ácido carboxílico, grupos enol, grupos aldehído, grupos cetona, grupos nitrilo, grupos nitro o grupos nitroso, se pueden preparar usando los métodos descritos en la presente memoria. Dichos materiales funcionalizados pueden ser, p. ej., más solubles, más fáciles de usar por diferentes microorganismos o pueden ser más estables a largo plazo, p. ej., menos propensos a la oxidación. Se describen sistemas y procesos en la presente memoria que pueden usar varios materiales de biomasa, tales como materiales celulósicos, materiales lignocelulósicos, materiales amiláceos o materiales que son o que incluyen azúcares de bajo peso molecular, como materiales de materia prima. Tales materiales están frecuentemente disponibles rápidamente, pero pueden ser difíciles de procesar, por ejemplo, por fermentación, o pueden dar rendimientos subóptimos a una proporción menor. Los materiales de materia prima son primero preparados físicamente para su procesamiento, frecuentemente por reducción de tamaño de materiales de materia prima. La materia prima físicamente preparada puede ser pretratada o procesada usando uno o más de los métodos de radiación, sonicación, oxidación, pirólisis y explosión de vapor. Los diferentes sistemas de preparación pueden ser usados en combinaciones de de dos, tres o incluso cuatro de estas tecnologías.

40

En algunos casos, para proveer materiales que incluyen un hidrato de carbono, tales como celulosa, que pueden ser convertidos por microorganismos en un número de productos deseables, tales como combustibles (por ejemplo, etanol, butanol o hidrógeno), materias primas que incluyen una o más unidades de sacáridos pueden ser tratadas por uno o más de los procesos descritos en la presente memoria. Otros productos y subproductos que pueden ser producidos incluyen, por ejemplo, alimento humano, alimento animal, y nutracéuticos. Se presentan diversos ejemplos que varían desde una escala de implementaciones de métodos de pretratamiento individual hasta métodos de gran escala de plantas procesadoras de biomasa.

45

Tipos de biomasa

50

En general, cualquier material de biomasa que consiste en hidratos de carbono compuestos por completo por una o más unidades de sacárido o que incluyen una o más unidades de sacárido, o que los incluye, se puede tratar por cualquiera de los métodos que se describen en la presente memoria. Por ejemplo, los materiales de biomasa pueden ser materiales celulósicos o lignocelulósicos, materiales amiláceos, como por ejemplo granos de maíz, granos de arroz u otros alimentos, o materiales que consisten en uno o más azúcares de bajo peso molecular o que los incluyen, como por ejemplo sacarosa o celobiosa.

55

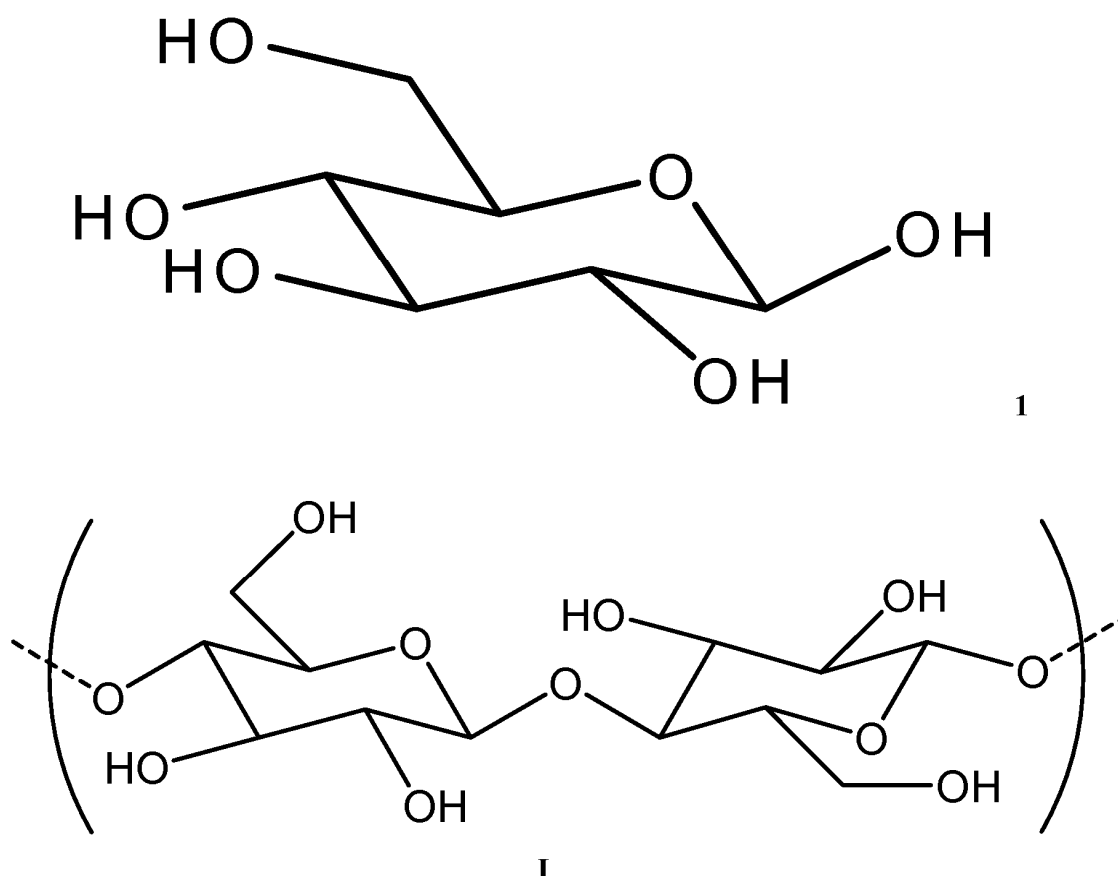
Por ejemplo, dichos materiales pueden incluir papel, productos de papel, madera, materiales relacionados con la madera, tableros de partículas, hierbas, cáscaras de arroz, bagazo, algodón, yute, cáñamo, lino, bambú, sisal, abacá, paja, mazorcas de maíz, cáscaras de arroz, fibra de coco, algas, algas marinas, algodón, celulosas sintéticas,

60

o mezclas de cualquiera de estos. Los materiales adecuados incluyen los listados en la sección de Resumen, anterior.

La fuentes de fibras incluyen fuentes de fibras celulósicas, incluyendo papel y productos de papel (p. ej., papel 5 polirrevestido y papel Kraft), y fuentes de fibras lingocelulósicas, incluyendo madera y materiales relacionados con la madera, p. ej., tableros de partículas. Otras fuentes de fibras adecuadas incluyen fuentes de fibras naturales, p. ej., hierbas, cáscaras de arroz, bagazo, algodón, yute, cáñamo, lino, bambú, sisal, abacá, paja, mazorcas de maíz, cáscaras de arroz, fibra de coco; fuentes de fibras con alto contenido en α -celulosa, p. ej., algodón; y fuentes de 10 fibras sintéticas, p. ej., hilo extruido (hilo orientado o hilo no orientado). Las fuentes de fibras naturales o sintéticas se pueden obtener de materiales textiles en trozos vírgenes, p. ej., remanentes o pueden ser residuos postconsumo, p. ej., trapos. Cuando se usan productos de papel como fuentes de fibra, pueden ser materiales vírgenes, p. ej., materiales vírgenes en trozos, o pueden ser residuos postconsumo. Aparte de los materiales brutos vírgenes, también se pueden usar residuos postconsumo, industriales (p. ej., despojos), y residuos de procesamiento (p. ej., 15 efluente del procesamiento del papel) como fuentes de fibras. Además, la fuente de fibra se puede obtener o derivar de residuos humanos (p. ej., aguas residuales), animales o vegetales. Se han descrito fuentes de fibras adicionales en las patentes de EE. UU. n° 6.448.307, 6.258.876, 6.207.729, 5.973.035 y 5.952.105.

En algunas realizaciones, el hidrato de carbono es o incluye un material que tiene uno o más enlaces β -1,4 y que 20 tiene un peso molecular medio numérico entre aproximadamente 3.000 y 50.000. Dicho hidrato de carbono es o incluye celulosa (I), que se obtiene de la (β -glucosa 1) por condensación de enlaces glucosídicos β (1 $\rightarrow$ 4). El enlace contrasta con los enlaces glucosídicos α (1 $\rightarrow$ 4) presentes en el almidón y otros hidratos de carbono.



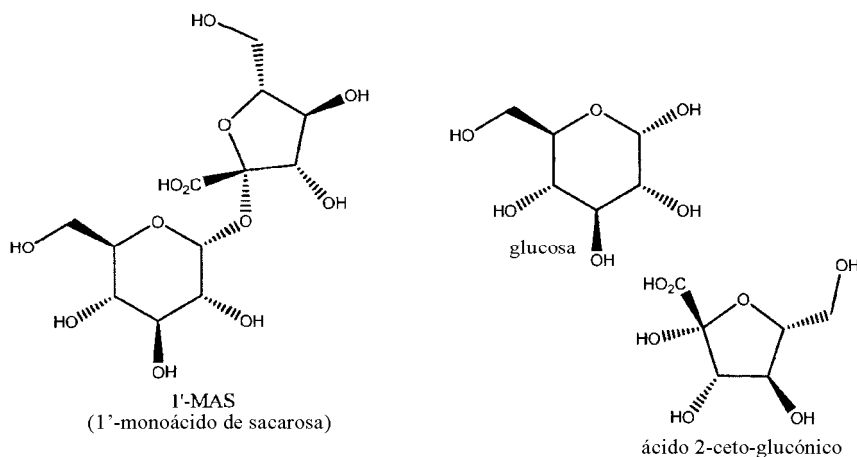
25 Los materiales amiláceos incluyen al almidón en sí mismo, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de patata o almidón de arroz, un derivado de almidón, o un material que incluye almidón, como por ejemplo un

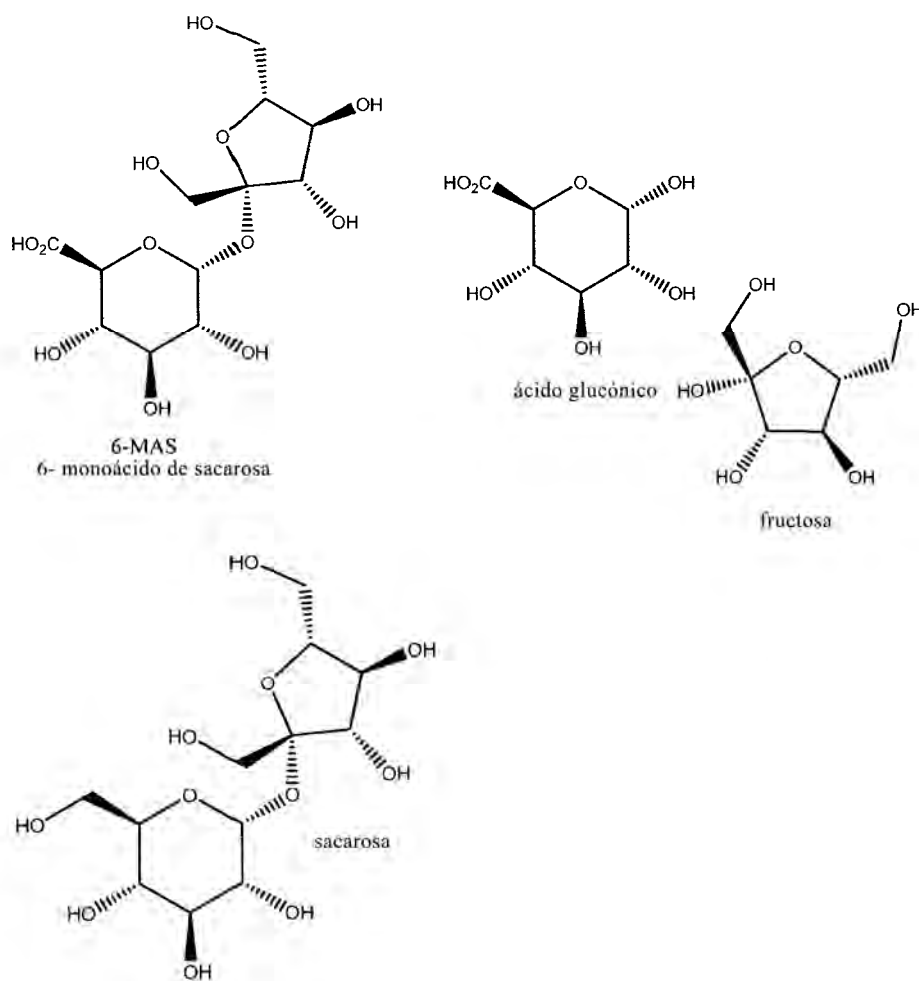
producto alimenticio comestible o una cosecha. Por ejemplo, el material amiláceo puede ser arracacha, trigo sarraceno, plátano, cebada, mandioca, kudzu, oca, sagú, sorgo, patatas domésticas comunes, batata, taro, ñame, o uno o más legumbres, como por ejemplo habas, lentejas o guisantes. Una mezcla de cualquiera de dos o más materiales amiláceos es también un material amiláceo. En algunas realizaciones en particular, los materiales amiláceos derivan del maíz. Diversos almidones de maíz y derivados se describen en "Corn Starch", Corn Refiners Association (11ª edición, 2006).

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

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

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





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

Sistemas para el tratamiento de la biomasa

- La figura 1 muestra un sistema de 100 para convertir biomasa, en particular biomasa con componentes celulósicos y lignocelulósicos significativos y/o componentes amiláceos, en productos y coproductos útiles. El sistema (100) incluye un subsistema de preparación de la alimentación (110), un subsistema de pretratamiento (114), un subsistema de procedimiento primario (118) y un subsistema de postprocesado (122). El subsistema de preparación de la alimentación (110) recibe biomasa en su forma bruta, prepara físicamente la biomasa para usarla como materia prima por los procedimientos corriente abajo (p. ej., reduce el tamaño y homogeneiza la biomasa), y almacena la biomasa tanto en su forma bruta como en forma de materia prima. La materia prima de biomasa con componentes celulósicos y lignocelulósicos significativos, o componentes amiláceos puede tener un peso molecular medio y cristalinidad altos, que pueden hacer difícil el procesamiento de la materia prima en productos útiles (p. ej., fermentación de la materia prima para producir etanol). Por ejemplo, otros han usado ácidos, bases y enzimas para procesar materias primas celulósicas, lignocelulósicas o amiláceas. Como se describe en la presente memoria, en algunas realizaciones, dichos tratamientos no son necesarios o son necesarios solo en cantidades pequeñas o catalíticas.

El subsistema de pretratamiento (114) recibe la materia prima del subsistema de preparación de la alimentación

- (110) y prepara la materia prima para usarla en los procedimientos de producción primarios, por ejemplo reduciendo el peso molecular medio y la cristalinidad de la materia prima. El subsistema del procedimiento primario (118) recibe la materia prima pretratada del subsistema de pretratamiento (114) y produce productos útiles (p. ej., etanol, otros alcoholes, productos farmacéuticos y/o alimentos). En algunos casos, el producto del subsistema del procedimiento
- 5 primario (118) es útil directamente pero, en otros casos, requiere el procesamiento adicional proporcionado por el subsistema de postprocesamiento (122). El subsistema de postprocesamiento (122) proporciona procesamiento adicional a corrientes de producto del sistema del procedimiento primario (118) que lo requieran (p. ej., destilación y desnaturalización del etanol) así como tratamiento para corrientes residuales de otros subsistemas. En algunos
- 10 casos, los coproductos de los subsistemas (114, 118, 122) también pueden ser útiles directa o indirectamente como subproductos y/o para aumentar la eficacia general del subsistema (100). Por ejemplo, el subsistema de postprocesamiento (122) puede producir agua tratada para ser reciclada para usar como agua del procedimiento en otros subsistemas y/o puede producir residuo incinerable que se puede usar como combustible para calderas que producen vapor y/o electricidad.
- 15 El tamaño óptimo de las instalaciones de conversión de biomasa está afectado por factores que incluyen la economía de escala y el tipo y disponibilidad de biomasa usada como materia prima. Los tamaños crecientes de instalaciones tienden a aumentar la economía de escala asociada con los procedimientos de la instalación. Sin embargo, aumentar el tamaño de la instalación también tiende a aumentar los costes (p. ej., costes de transporte) por unidad de materia prima. Los estudios que analizan estos factores sugieren que el tamaño adecuado para las
- 20 instalaciones de conversión de biomasa puede estar en el intervalo de 2000 a 10.000 toneladas secas de materia prima por día, dependiendo de al menos en parte el tipo de materia prima usada. El tipo de materia prima también puede tener impacto en los requisitos de almacenamiento de la instalación, requiriendo las instalaciones diseñadas principalmente para procesar materia prima cuya disponibilidad varía estacionalmente (p. ej., rastrojo de maíz), más almacenamiento de materia prima dentro o fuera, que las instalaciones diseñadas para procesar materia prima cuya
- 25 disponibilidad es relativamente constante (p. ej., papel residual).

Preparación física

- En algunos casos, los métodos de procesamiento empiezan con una preparación física de la materia prima, p. ej.,
- 30 reducción de tamaño de los materiales brutos de la materia prima, tal como por corte, trituración, cizalladura o picado. En algunos casos, se prepara materia prima (p. ej., papel reciclado, materiales amiláceos, o mijo) por cizalladura o desmenuzado. Se pueden usar tamices y/o imanes para separar objetos de tamaño excesivo o indeseados tales como, por ejemplo, piedras o clavos de la corriente de alimentación.
- 35 Los sistemas de preparación de la alimentación se pueden configurar para producir corrientes de alimentación con características específicas tales como, por ejemplo, tamaños máximos específicos, relación longitud a anchura específica, o relaciones de superficies específicas. Como parte de la preparación de la alimentación, se puede controlar la densidad aparente de las materias primas (p. ej., aumentar o disminuir).

Reducción de tamaño

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

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

60

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

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

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

La fuente de fibra también se puede cizallar bajo un gas (tal como una corriente o atmósfera de gas distinto del aire), p. ej., oxígeno o nitrógeno, o vapor.

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

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

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

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

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

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

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

5 malla es menor que 52%, p. ej., menor que 41%, menor que 36%, menor que 31%, menor que 30%.

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

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

En algunas realizaciones, un área superficial BET del segundo material fibroso mayor que 0,1 m^2/g , por ejemplo, más del 0,25 m^2/g , mayor que 0,5 m^2/g , mayor que 1,0 m^2/g , mayor que 1,5 m^2/g , mayor que 1,75 m^2/g , mayor que 5,0 m^2/g , mayor que 10 m^2/g , mayor que 25 m^2/g , mayor que 35 m^2/g , mayor que 50 m^2/g , mayor que 60 m^2/g , mayor que 75 m^2/g , mayor que 100 m^2/g , mayor que 150 m^2/g , mayor que 200 m^2/g , o aún mayor que 250 m^2/g . Una porosidad del segundo material fibroso (14) puede ser, p. ej., mayor que 20 por ciento, mayor que 25 por ciento, mayor que 35 por ciento, mayor que 50 por ciento, mayor que 60 por ciento, mayor que 70 por ciento, p. ej., mayor que 80 por ciento, mayor que 85 por ciento, mayor que 90 por ciento, mayor que 92 por ciento, mayor que 94 por ciento, mayor que 95 por ciento, mayor que 97,5 por ciento, mayor que 99 por ciento, o incluso mayor que 99,5 por ciento.

40

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

45

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

50

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

55

60

Densificación

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

El material fibroso densificado se puede hacer en un molino de pelets. En relación con la figura 6, un molino de pelets 300 tiene una tolva 301 para contener el material no densificado 310 que incluye un material que contiene hidratos de carbono, tales como celulosa. La tolva está comunicada con un tornillo sinfín (312) que es accionado por un motor de velocidad variable (314), de modo que el material no densificado puede ser transportado a una zona de acondicionamiento (320) que agita el material no densificado con palas (322) que son giradas por el motor de acondicionamiento (330). Otros aditivos, p. ej. cualquiera de los aditivos y/o cargas descritas en la presente memoria, se pueden añadir en la entrada (332). Si se desea, se puede añadir calor mientras el material fibroso está en la zona de acondicionamiento. Después del acondicionamiento, el material pasa de la zona de acondicionamiento a través de un tubo de vaciado (340), y a otro tornillo sinfín (342). El tubo de vaciado, controlado por el accionador (344), permite el paso sin obstrucción del material desde la zona de acondicionamiento al tornillo sinfín. El tornillo sinfín es girado por el motor (346), y controla la alimentación del material fibroso a la boquilla y conjunto de rodillos (350). Específicamente, el material se introduce en una boquilla cilíndrica hueca (352), que rota sobre un eje horizontal y que tiene agujeros de boquilla que se extienden radialmente (250). La boquilla (352) es rotada sobre el eje por el motor (360), que incluye un indicador de potencia, que indica la potencia total consumida por el motor. El material densificado (370), p. ej., en forma de pelets, cae del tubo de descarga (372) y es capturado y procesado, tal como por irradiación.

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

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

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

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

Ejemplos

- En un ejemplo, se puede usar como materia prima 0,5 galones de cartones de zumo hechos de cartón Kraft blanco no impreso que tiene una densidad aparente de 20 lb/ft³. Los cartones pueden estar doblados planos y entonces
- 5 alimentar a una desmenuzadora para producir un material de tipo confeti que tiene una anchura entre 0,1 pulgadas y 0,5 pulgadas, una longitud de entre 0,25 pulgadas y 1 pulgada y un espesor equivalente al del material de partida (aproximadamente 0,075 pulgadas). El material de tipo confeti se puede alimentar a una cortadora de cuchillas rotativas, que cizalla los trozos de tipo confeti, desgarrando los trozos y liberando material fibroso.
- 10 En algunos casos, se pueden disponer múltiples trenes de desmenuzadora-cizalladora en serie con la salida. En una realización, se pueden disponer dos trenes de desmenuzadora-cizalladora en serie con la salida de la primera cizalladora alimentada como entrada a la segunda desmenuzadora. En otra realización, se pueden disponer tres trenes de desmenuzadora-cizalladora en serie con la salida de la primera cizalladora alimentada como entrada a la segunda desmenuzadora y la salida de la segunda cizalladora alimentada como entrada en la tercera
- 15 desmenuzadora. Se prevé que múltiples pasos por trenes de desmenuzadora-cizalladora aumenten la reducción del tamaño de partículas y aumenten la superficie específica general en la corriente de alimentación.

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

25 Pretratamiento

- La materia prima preparada físicamente se puede pretratar para utilizarla en procesos de producción primaria, por ejemplo, reduciendo el peso molecular promedio y la cristalinidad de la materia prima y/o aumentando el área superficial y/o la porosidad de la materia prima. En algunas realizaciones, el material celulósico y/o lignocelulósico
- 30 incluye una primera celulosa que tiene un primer peso molecular medio numérico y el hidrato de carbono resultante incluye una segunda celulosa que tiene un segundo peso molecular medio numérico menor que el primer peso molecular medio numérico. Por ejemplo, el segundo promedio de pesos moleculares en número es menor que el primer promedio de pesos moleculares en número en más de aproximadamente 25 por ciento, por ejemplo, una reducción de 2x, 3x, 5x, 7x, 10x, 25x e incluso 100x.
- 35 En algunas realizaciones, la primera celulosa tiene una primera cristalinidad y la segunda celulosa tiene una segunda cristalinidad menor que la primera cristalinidad, como por ejemplo menor que aproximadamente 2, 3, 5, 10, 15 o 25 por ciento menor.
- 40 En algunas realizaciones, la primera celulosa tiene un primer nivel de oxidación y la segunda celulosa tiene un segundo nivel de oxidación mayor que el primer nivel de oxidación, tal como 2, 3, 4, 5, 10 o incluso 25% más.

- Los procesos de pretratamiento pueden incluir uno o más de irradiación, tratamiento con ultrasonidos, oxidación, pirólisis, y explosión con vapor. Los diferentes sistemas de preparación pueden ser usados en combinaciones de de
- 45 dos, tres o incluso cuatro de estas tecnologías.

Combinaciones de pretratamientos

- En algunas realizaciones, la biomasa se puede tratar aplicando dos o más de cualquiera de los procesos que se describen en la presente memoria, como por ejemplo dos, tres, cuatro o más de radiación, tratamiento con ultrasonidos, oxidación, pirólisis y explosión con vapor con o sin una preparación de la materia prima según se describe aquí ya sea anterior, en una etapa intermedia, o subsiguiente. Los procesos se pueden aplicar a la biomasa en cualquier orden o de manera concurrente. Por ejemplo, un hidrato de carbono se puede preparar aplicando radiación, tratamiento con ultrasonidos, oxidación, pirólisis, y, opcionalmente, explosión con vapor a un material
- 55 celulósico y/o lignocelulósico (en cualquier orden o de manera concurrente). El material provisto que contiene hidrato de carbono se puede convertir luego mediante uno o más microorganismos, como por ejemplo bacterias, levaduras, o mezclas de levaduras y bacterias, a diversos productos deseables, tal como se describe en la presente memoria. Los procesos múltiples pueden proveer materiales que pueden ser utilizados más fácilmente por una variedad de microorganismos debido a su menor peso molecular, menor cristalinidad, y/o solubilidad mejorada. Los
- 60 procesos múltiples pueden proveer sinergia y reducir la entrada total de energía necesaria en comparación con

cualquier proceso único.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, se proveen materias primas que incluyen un hidrato de carbono que se produce mediante un proceso que incluye irradiación, tratamiento con ultrasonidos, oxidación y pirólisis, o irradiación y sometimiento a explosión con vapor (en cualquier orden o de manera concurrente) a un material celulósico y/o lignocelulósico. A continuación, la materia prima provista se puede poner en contacto con un microorganismo con capacidad de convertir por lo menos una porción, por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 1 por ciento en peso, de la materia prima en el producto, tal como el combustible.

10 **Condiciones de pretratamiento**

En algunas realizaciones, el procedimiento no incluye hidrolizar el material celulósico y/o lignocelulósico, tal como con un ácido o una base, p. ej., un ácido mineral, tal como ácido clorhídrico o sulfúrico. Si se desea, parte o nada de la materia prima puede incluir un material hidrolizado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 70 por ciento en peso de la materia prima es un material no hidrolizado, p. ej. al menos 95 por ciento en peso de la materia prima es un material no hidrolizado. En algunas realizaciones, sustancialmente toda la materia prima es un material no hidrolizado.

Cualquier materia prima o cualquier reactor o fermentador cargado con una materia prima puede incluir un tampón, tal como bicarbonato sódico, cloruro amónico o Tris; un electrolito, tal como cloruro potásico, cloruro sódico o cloruro cálcico; un factor de crecimiento, tal como biotina y/o una pareja de base tal como uracilo o un equivalente del mismo; un tensioactivo, tal como Tween®1 o polietilenglicol; un mineral, tal como calcio, cromo, cobre, yodo, hierro, selenio o cinc; o un agente quelante, tal como etilendiamina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (o su forma da sal, p. ej. EDTA de sodio o potasio), o dimercaprol.

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

En algunas realizaciones, cualquier procesado descrito en la presente memoria se produce después de que el material celulósico y/o lignocelulósico permanezca seco como se ha adquirido o se ha secado, p. ej., usando calor y/o presión reducida. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el material celulósico y/o lignocelulósico tiene menos de aproximadamente 5 por ciento en peso de agua retenida, medido a 25 °C y 50% de humedad relativa.

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

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

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

Tratamiento de radiación

Se pueden utilizar una o más secuencias de tratamiento con irradiación para tratar la materia prima en bruto

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

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

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

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

En algunos casos, el segundo material tiene celulosa que tiene una cristalinidad (C_2) que es menor que la cristalinidad (C_1) de la celulosa del primer material. Por ejemplo, (C_2) puede ser menor que (C_1) en más de aproximadamente 10 por ciento, p. ej. 15, 20, 25, 30, 35, 40, o incluso más de aproximadamente 50 por ciento.

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

En algunas realizaciones, el peso molecular medio numérico inicial (antes de irradiación) es de aproximadamente 200.000 a aproximadamente 3.200.000, p. ej., de aproximadamente 250.000 a aproximadamente 1.000.000 o de aproximadamente 250.000 a aproximadamente 700.000, y el peso molecular medio numérico después de irradiación de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 200.000, p. ej., de aproximadamente 60.000 a aproximadamente

150.000 o de aproximadamente 70.000 a aproximadamente 125.000. Sin embargo, en algunas realizaciones, p. ej., después de irradiación extensa, se puede tener un peso molecular medio numérico menor que aproximadamente 10.000 o incluso menor que aproximadamente 5.000.

- 5 En algunas realizaciones, el segundo material puede tener un nivel de oxidación ($^{T}O_2$) que es mayor que el nivel de oxidación ($^{T}O_1$) del primer material. Un nivel mayor de oxidación del material puede ayudar a su dispersabilidad, hinchabilidad y/o solubilidad, potenciando además la susceptibilidad de los materiales al ataque químico, enzimático o biológico. En algunas realizaciones, para aumentar el nivel de oxidación del segundo material con respecto al primer material, la irradiación se lleva a cabo en un entorno oxidante, p. ej., bajo una capa de aire u oxígeno, produciendo un segundo material que está más oxidado que el primer material. Por ejemplo, el segundo material puede tener más grupos hidroxilo, grupos aldehído, grupos cetona, grupos éster o grupos ácido carboxílico, que aumentan la hidrofiliidad.

Radiación ionizante

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

- 20 Cuando se usan partículas, pueden ser neutras (no cargadas), tener carga positiva o tener carga negativa. Cuando están cargadas, las partículas cargadas pueden llevar una sola carga positiva o negativa, o múltiples cargas, p. ej., 1, 2, 3 o incluso 4 o más cargas.

- En aspectos en los que se desea la escisión de cadena, pueden ser deseables partículas con carga positiva, en parte debido a su naturaleza ácida. Cuando se usan partículas las partículas pueden tener la masa de un electrón en reposo, o mayor, p. ej., 500, 1000, 1500, o 2000 o más veces la masa de un electrón en reposo. Por ejemplo, las partículas que tienen una masa de aproximadamente 1 unidad atómica a aproximadamente 150 unidades atómicas, p. ej., de aproximadamente 1 unidad atómica a aproximadamente 50 unidades atómicas, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12 o 15 uma. Los aceleradores usados para acelerar las partículas pueden ser electrostáticos DC, electrodinámicos DC, lineales RF, lineales de inducción magnética o de onda continua. Por ejemplo, los aceleradores de tipo ciclotrón están disponibles en IBA, Bélgica, tal como el sistema Rhodotron®, mientras que los aceleradores de tipo DC están disponibles en RDI, ahora IBA Industrial, tal como Dynamitron®. Los iones y aceleradores de iones se describen en *Introductory Nuclear Physics*, Kenneth S. Krane, John Wiley & Sons, Inc. (1988), *FIZIKA B* 6 (1997) 4, 177-206, Chu, William T., "Overview of Light-Ion Beam Therapy", Columbus-Ohio, ICRU-IAEA Meeting, 18-20 de marzo 2006, Iwata, Y. et al., "Alternating-Phase-Focused IH-DTL for Heavy-Ion Medical Accelerators", *Proceedings of EPAC 2006*, Edinburgo, Escocia y Leitner, C.M. et al., "Status of the Superconducting ECR Ion Source Venus", *Proceedings of EPAC 2000*, Viena, Austria.

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

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

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

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

que las fuentes de radiación gamma pasen a través del almacenamiento en su camino próximo a la mesa de trabajo.

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

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

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

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

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

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

Se pueden usar varios otros dispositivos de irradiación en los métodos descritos en la presente memoria, incluyendo fuentes de ionización de campo, separadores de iones electrostáticos, generadores de ionización de campo, fuentes de emisión termiónica, fuentes de iones de descarga de microondas, aceleradores de recirculación o estáticos, aceleradores lineales dinámicos, aceleradores de van de Graaff, y aceleradores en tandem plegados. Dichos dispositivos se desvelan, por ejemplo, en US2009314487.

30 **Haz de electrones**

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

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

La figura 11A muestra un diagrama de flujo del procedimiento 3000 que incluye varias etapas en una secuencia de pretratamiento de la materia prima por irradiación de haz de electrones. En la primera etapa 3010, se recibe un suministro de materia prima seca de una fuente de alimentación. Como se ha descrito antes, la materia prima seca de la fuente de alimentación puede ser preprocesada antes del suministro a los dispositivos de irradiación de haz de electrones. Por ejemplo, si la materia prima deriva de fuentes vegetales, se pueden separar determinadas partes del material vegetal antes de recoger el material vegetal y/o antes de suministrar el material vegetal mediante el dispositivo de transporte de materia prima. Alternativamente, o además, como se expresa en la etapa opcional (3020), la materia prima de biomasa se puede someter a procesamiento mecánico (p. ej., para reducir la longitud media de las fibras en la materia prima) antes de suministrar a los dispositivos de irradiación de haz de electrones.

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

irradiación de haz de electrones.

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

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

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

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

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

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

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

50
Radiación electromagnética.

En realizaciones en las que la irradiación se lleva a cabo con radiación electromagnética, la radiación electromagnética puede tener, p. ej., una energía por fotón (en electronvoltios), mayor que 10^2 eV, p. ej., mayor que
55 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , o incluso mayor que 10^7 eV. En algunas realizaciones, la radiación electromagnética tiene una energía por fotón de entre 10^4 y 10^7 , p. ej., entre 10^5 y 10^6 eV. La radiación electromagnética puede tener una frecuencia de, p. ej., mayor que 10^{16} Hz, mayor que 10^{17} Hz, 10^{18} , 10^{19} , 10^{20} , o incluso mayor que 10^{21} Hz. En algunas realizaciones, la radiación electromagnética tiene una frecuencia de entre 10^{18} y 10^{22} Hz, p. ej., entre 10^{19} y
60 10^{21} Hz.

Dosis

En algunas realizaciones, la irradiación (con cualquier fuente de radiación o combinación de fuentes) se lleva a cabo hasta que el material recibe una dosis de al menos 0,25 Mrad, por ejemplo, al menos 1,0, al menos 2,5 Mrad, al menos 5,0 Mrad, o al menos 10,0 Mrad. En algunas realizaciones, la irradiación se lleva a cabo hasta que el material recibe una dosis de entre 1,0 Mrad y 6,0 Mrad, por ejemplo, entre 1,5 Mrad y 4,0 Mrad.

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

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

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

En un ejemplo del uso de radiación como un pretratamiento, se usa como materia prima medio galón de cartones de zumo hechos de cartón Kraft blanco polirrevestido no impreso, que tiene una densidad aparente de 20 lb/ft³). Los cartones se doblan planos y después se alimentan a una secuencia de tres trenes de desmenuzadora-cizalladora dispuestos en serie con la salida de la primera cizalladora alimentada como entrada a la segunda desmenuzadora, y la salida de la segunda cizalladora alimentada como entrada a la tercera desmenuzadora. El material fibroso producido por el tren de desmenuzadora-cizalladora se puede pulverizar con agua y procesar mediante un molino de pelets que trabaja a temperatura ambiente. Los pelets densificados se ponen en una ampolla de vidrio, que se evacúa con alto vacío y después se vuelve a llenar con gas argón. La ampolla se sella bajo atmósfera de argón. Alternativamente, en otro ejemplo, la ampolla se sella en una atmósfera de aire. Los pelets de la ampolla se irradian con radiación gamma durante aproximadamente 3 horas con una dosis por unidad de tiempo de aproximadamente 1 Mrad por hora para proporcionar un material irradiado en el que la celulosa tiene un peso molecular menor que el material de partida.

Aditivos para potenciar la reducción de peso molecular durante la irradiación

En algunas realizaciones, antes de la irradiación, se pueden añadir diferentes materiales, p. ej., sólidos o líquidos, a la biomasa para potenciar la reducción de peso molecular. En esos aspectos en que se usa un líquido, el líquido puede estar en contacto con las superficies externas de la biomasa y/o el líquido puede estar en porciones interiores de la biomasa, por ejemplo, infundido dentro de la biomasa.

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

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

Inactivación y funcionalización controlada de la biomasa

Después del tratamiento con una o más radiaciones ionizantes, tales como radiación fotónica (p. ej., rayos X o rayos gamma), radiación de haz de electrones o partículas más pesadas que los electrones con carga positiva o negativa (p. ej., protones o iones de carbono), cualquiera de los materiales que contienen hidratos de carbono o mezclas descritas en la presente memoria son ionizadas, es decir, incluyen radicales en niveles que son detectables con un espectrómetro de resonancia de espín electrónico. El límite práctico actual de la detección de los radicales es aproximadamente 10¹⁴ espines a temperatura ambiente. Después de ionización, cualquier material de biomasa que se ha ionizado puede reducir el nivel de radicales en la biomasa ionizada, p. ej. de modo que los radicales ya no sean detectables con el espectrómetro de resonancia de espín electrónico. Por ejemplo, los radicales se pueden inactivar por aplicación de suficiente presión a la biomasa y/o usando un fluido en contacto con la biomasa ionizada, tal como un gas o líquido, que reaccione (inactive) los radicales. El uso de un gas o líquido para al menos ayudar a la inactivación de los radicales también permite que el operador controle la funcionalización de la biomasa ionizada.

con una cantidad y tipo de grupos funcionales deseados, tales como grupos ácido carboxílico, grupos enol, grupos aldehído, grupos nitro, grupos nitrilo, grupos amino, grupo alquilamino, grupos alquilo, grupos cloroalquilo o grupos clorofluoroalquilo. En algunos aspectos, dicha inactivación puede mejorar la estabilidad de algunos de los materiales de biomasa ionizados. Por ejemplo, la inactivación puede mejorar la resistencia de la biomasa a la oxidación. La funcionalización mediante extinción también puede mejorar la solubilidad de cualquier biomasa descrita en la presente memoria, puede mejorar su estabilidad térmica, que puede ser importante en la fabricación de materiales compuestos y cartones descritos en la presente memoria, y puede mejorar la utilización de material por parte de diferentes microorganismos. Por ejemplo, los grupos funcionales impartidos al material de la biomasa por inactivación pueden actuar como sitios receptores para la unión por microorganismos, p. ej., para potenciar la hidrólisis de la celulosa por diferentes microorganismos.

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

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

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

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

La funcionalización se puede potenciar usando iones pesados con carga, tal como cualquiera de los iones más pesados descritos en la presente memoria. Por ejemplo, si se desea potenciar la oxidación, se pueden usar iones de

oxígeno cargados para la irradiación. Si se desean grupos funcionales con nitrógeno, se pueden usar iones de nitrógeno o iones que incluyen nitrógeno. Igualmente, si se desean grupos funcionales con azufre o fósforo, se pueden usar iones de azufre o fósforo en la irradiación.

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

- En realizaciones particulares, los materiales funcionalizados descritos en la presente memoria se tratan con un
10 ácido, base, nucleófilo o ácido de Lewis, para el cambio adicional de estructura molecular y/o supramolecular, tal como reducción adicional del peso molecular. Los ejemplos de ácidos incluyen ácidos orgánicos, tales como ácido acético y ácidos minerales, tal como ácido clorhídrico, sulfúrico y/o nítrico. Los ejemplos de bases incluyen bases minerales fuertes, tales como una fuente de iones hidróxido, iones básicos, tales como ion fluoruro, o bases orgánicas más débiles, tales como aminas. Incluso el agua y bicarbonato sódico, p. ej., cuando se disuelve en agua,
15 puede realizar el cambio de estructura molecular y/o supramolecular, tal como la reducción adicional de peso molecular.

Exposición a haz de partículas en fluidos

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

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

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

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

- Durante el tratamiento de los materiales de biomasa con radiación ionizante, en especial con dosis por unidad de
50 tiempo altas, tales como con dosis mayores de 0,15 Mrad por segundo, p. ej., 0,25 Mrad/s, 0,35 Mrad/s, 0,5 Mrad/s, 0,75 Mrad/s o incluso mayor que 1 Mrad/s, los materiales de la biomasa pueden retener cantidades significativas de calor de modo que se eleva la temperatura de los materiales de la biomasa. Aunque en algunas realizaciones temperaturas más altas pueden ser ventajosas, p. ej., cuando se desea una velocidad de reacción más rápida, es ventajoso controlar el calentamiento de la biomasa para mantener el control sobre las reacciones químicas iniciadas
55 por la radiación ionizante, tales como la reticulación, escisión de cadenas y/o injerto, p. ej., para mantener el control del procedimiento. Los materiales de baja densidad aparente, tales como los que tienen una densidad aparente menor que aproximadamente 0,4 g/cm³, p. ej., menor que aproximadamente 0,35, 0,25 o menor que aproximadamente 0,15 g/cm³, en especial cuando se combinan con materiales que tienen perfiles transversales finos, tales como fibras que tienen dimensiones transversales pequeñas, en general son más fáciles de enfriar.
60 Además, los fotones y las partículas en general pueden penetrar más dentro y a través de los materiales que tienen

una densidad aparente relativamente baja, lo cual puede permitir el procesamiento de volúmenes mayores de materiales con velocidades mayores, y puede permitir el uso de fotones y partículas que tienen menores energías, p. ej., 0,25 MeV, 0,5 MeV, 0,75 MeV o 1,0 MeV, que pueden reducir los requisitos de apantallamiento de seguridad. Por ejemplo, en un método de cambio de una estructura molecular y/o supramolecular de una materia prima de biomasa, la biomasa se pretrata a una primera temperatura con radiación ionizante, tal como fotones, electrones o iones (p. ej., cationes o aniones con una o múltiples cargas), durante un tiempo suficiente y/o con una dosis suficiente para elevar la materia prima de biomasa a una segunda temperatura mayor que la primera temperatura. La biomasa pretratada después se enfría a una tercera temperatura inferior a la segunda temperatura. Finalmente, si se desea, la biomasa enfriada se puede tratar una o más veces con radiación, p. ej., con radiación ionizante. Si se desea, se puede aplicar enfriamiento a la biomasa después y/o durante cada tratamiento de radiación.

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

En algunas implementaciones, la radiación ionizante se aplica con una dosis total menor que 25 Mrad o menor que 10 Mrad, tal como menos de 5 Mrad o menos de 2,5 Mrad y a una velocidad de más de 0,25 Mrad por segundo, tal como más de 0,5, 0,75 o mayor que 1,0 Mrad/s, antes de enfriar la biomasa.

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

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

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

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

En algunas realizaciones, la materia prima de biomasa a la que se aplica la radiación ionizante tiene una densidad aparente menor que aproximadamente 0,35 g/cm³, tal como menor que aproximadamente 0,3, 0,25, 0,20, o menor que aproximadamente 0,15 g/cm³ durante la aplicación de la radiación ionizante. En dichas realizaciones, la materia prima de biomasa se puede enfriar, y después la radiación ionizante se puede aplicar a la biomasa enfriada. En algunas realizaciones ventajosas, la materia prima de biomasa es o incluye fibras discretas y/o partículas que tienen una dimensión máxima de no más de aproximadamente 0,5 mm, tal como no más de aproximadamente 0,25 mm, no más de aproximadamente 0,1 mm, no más de aproximadamente 0,05 mm, o no más de aproximadamente 0,025 mm.

Sonicación

Se pueden utilizar una o más secuencias de tratamiento con ultrasonidos para tratar la materia prima en bruto proveniente de una amplia variedad de diversas fuentes para extraer sustancias útiles de la materia prima, y para
5 proveer materia orgánica parcialmente degradada que funciona como entrada para los pasos y/o secuencias de tratamiento adicionales. La sonicación puede reducir el peso molecular y/o la cristalinidad de la materia prima.

Con referencia nuevamente a la Figura 8, en un método, un primer material (2) que incluye celulosa con un primer promedio de pesos moleculares en número ($\overline{M}_{N1}$) se dispersa en un medio, como por ejemplo agua, y se trata con
10 ultrasonidos y/o se cavita de otra manera, para proveer un segundo material (3) que incluye celulosa con un segundo promedio de pesos moleculares en número ($\overline{M}_{N2}$) menor que el primer promedio de pesos moleculares en número. El segundo material (o el primer y segundo material en algunas realizaciones) se puede combinar con un microorganismo (p. ej., una bacteria o una levadura) que puede usar el segundo y/o primer material para producir un combustible (5) que es o incluye hidrógeno, un alcohol, un ácido orgánico, un hidrocarburo o mezclas de cualquiera
15 de estos.

Puesto que el segundo material tiene celulosa que tiene un peso molecular reducido con respecto al primer material, y en algunos casos, también una cristalinidad reducida, en general el segundo material es más dispersable, hinchable y/o soluble en una solución que contiene el microorganismo, p. ej., en una concentración de más que 10^6
20 microorganismos/ml. Estas propiedades hacen que el segundo material (3) sea más susceptible al ataque químico, enzimático y/o microbiano con respecto al primer material (2), lo cual puede mejorar mucho la tasa de producción y/o el nivel de producción de un producto deseado, p. ej., etanol. La sonicación también puede esterilizar los materiales, pero no se debería utilizar mientras se suponga que los microorganismos estén vivos.

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

En algunos casos, el segundo material tiene celulosa que tiene una cristalinidad ($\overline{C}_2$) que es menor que la
30 cristalinidad ($\overline{C}_1$) de la celulosa del primer material. Por ejemplo, ($\overline{C}_2$) puede ser menor que ($\overline{C}_1$) en más de aproximadamente 10 por ciento, p. ej. 15, 20, 25, 30, 35, 40, o incluso más de aproximadamente 50 por ciento.

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

40 En algunas realizaciones, el peso molecular medio numérico inicial (antes de sonicación) es de aproximadamente 200.000 a aproximadamente 3.200.000, p. ej., de aproximadamente 250.000 a aproximadamente 1.000.000 o de aproximadamente 250.000 a aproximadamente 700.000, y el peso molecular medio numérico después de sonicación de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 200.000, p. ej., de aproximadamente 60.000 a aproximadamente
45 150.000 o de aproximadamente 70.000 a aproximadamente 125.000. Sin embargo, en algunas realizaciones, p. ej., después de sonicación extensa, se puede tener un peso molecular medio numérico menor que aproximadamente 10.000 o incluso menor que aproximadamente 5.000.

En algunas realizaciones, el segundo material puede tener un nivel de oxidación ($\overline{O}_2$) que es mayor que el nivel de oxidación ($\overline{O}_1$) del primer material. Un nivel mayor de oxidación del material puede ayudar a su dispersabilidad, hinchabilidad y/o solubilidad, potenciando además la susceptibilidad de los materiales al ataque químico, enzimático o microbiano. En algunas realizaciones, para aumentar el nivel de oxidación del segundo material con respecto al primer material, la sonicación se lleva a cabo en un entorno oxidante, produciendo un segundo material que está
50 más oxidado que el primer material. Por ejemplo, el segundo material puede tener más grupos hidroxilo, grupos aldehído, grupos cetona, grupos éster o grupos ácido carboxílico, que aumentan la hidrofiliidad.

En algunas realizaciones, el medio de la sonicación es un medio acuoso. Si se desea, el medio puede incluir un oxidante, como por ejemplo un peróxido (por ejemplo, peróxido de hidrógeno), un agente dispersante y/o un amortiguador. Los ejemplos de agentes dispersantes incluyen agentes dispersantes iónicos, por ejemplo, lauril
60 sulfato de sodio, y agentes dispersantes no iónicos, por ejemplo, polietilenglicol.

En otras realizaciones, el medio de la sonicación no es acuoso. Por ejemplo, la sonicación se puede llevar a cabo en un hidrocarburo, por ejemplo, tolueno o heptano, un éter, por ejemplo, dietil éter o tetrahidrofurano, o incluso en un gas licuado tal como argón, xenón, o nitrógeno.

5

Sin perseguir la limitación de cualquier teoría en particular, se cree que la sonicación rompe las uniones en la celulosa creando burbujas en el medio que contiene la celulosa, que crecen y luego colapsan violentamente. Durante el colapso de la burbuja, que puede suceder en menos de un nanosegundo, la fuerza implosiva eleva la temperatura local dentro de la burbuja hasta aproximadamente 5100 K (aún mayor en algunos casos; véase, por ejemplo, Suslick et al., Nature 434, 52-55) y genera presiones de entre unos pocos cientos de atmósferas y más de 1000 atmósferas o más. Son dichas altas temperaturas y presiones las que rompen las uniones. Además, sin deseos de limitación por ninguna teoría en particular, se cree que la reducción de la cristalinidad surge, por lo menos en parte, de las velocidades de enfriamiento extremadamente altas durante el colapso de la burbujas, que pueden ser mayores de aproximadamente 10^{11} K/segundo. Las altas velocidades de enfriamiento generalmente no permiten que la celulosa se organice y cristalice, dando como resultado materiales que tienen una cristalinidad reducida. Los sistemas ultrasónicos y la sonoquímica se exponen, por ejemplo, en Olli et al., Patente de EE. UU. nº 5.766.764; Roberts, Patente de EE. UU. nº 5.828.156; Mason, Chemistry with Ultrasound, Elsevier, Oxford, (1990); Suslick (editor), Ultrasound: its Chemical, Physical and Biological Effects, VCH, Weinheim, (1988); Price, "Current Trends in Sonochemistry" Royal Society of Chemistry, Cambridge, (1992); Suslick et al., Ann Rev. Mater. Sci. 29, 295, (1999); Suslick et al., Nature 353, 414 (1991); Hiller et al., Phys. Rev. Lett. 69, 1182 (1992); Barber et al., Nature, 352, 414 (1991); Suslick et al., J. Am. Chem. Soc., 108, 5641 (1986); Tang et al., Chem. Comm., 2119 (2000); Wang et al., Advanced Mater., 12, 1137 (2000); Landau et al., J. of Catalysis, 201, 22 (2001); Perkash et al., Chem. Comm., 988 (2001); Nikitenko et al., Angew. Chem. Inter. Ed. (December 2001); Shafi et al., J. Phys. Chem B 103, 3358 (1999); Avivi et al., J. Amer. Chem. Soc. 121, 4196 (1999), and Avivi et al., J. Amer. Chem. Soc. 122, 4331 (2000).

25

Sistemas de ultrasonicos

La figura 12 muestra un sistema general donde se mezcla una corriente de material celulósico (1210) con una corriente de agua (1212) en un depósito (1214) para formar una corriente de proceso (1216). Una primera bomba (1218) extrae la corriente de proceso (1216) del depósito (1214) y hacia una celda de flujo (1224). Un transductor ultrasónico (1226) transmite energía ultrasónica a la corriente de proceso (1216) a medida que la corriente de proceso fluye a través de la celda de flujo (1224). Una segunda bomba (1230) extrae la corriente de proceso (1216) de la celda de flujo (1224) y hacia el tratamiento subsiguiente.

El depósito (1214) incluye una primera admisión (1232) y una segunda admisión (1234) en comunicación de fluidos con un volumen (1236). Un transportador (no se muestra) suministra la corriente de material celulósico (1210) al depósito (1214) a través de la primera admisión (1232). La corriente de agua (1212) entra al depósito (1214) a través de la segunda admisión (1234). En algunas realizaciones, la corriente de agua (1212) entra al volumen (1236) a lo largo de una tangente estableciendo un flujo en forma de remolino dentro del volumen (1236). En algunas realizaciones, la corriente de material celulósico (1210) y la corriente de agua (1212) se pueden introducir al volumen (1236) a lo largo ejes opuestos para mejorar la mezcla dentro del volumen.

La válvula (1238) controla el flujo de la corriente de agua (1212) a través de la segunda admisión (1232) para producir una proporción deseada de material celulósico a agua (por ejemplo, aproximadamente 10% de material celulósico, peso en volumen). Por ejemplo, se pueden combinar 2000 toneladas/día de material celulósico con entre 1 millón y 1,5 millón de galones/día, por ejemplo, 1,25 millón de galones/día, de agua.

La mezcla de material celulósico y agua en el depósito (1214) está controlada por la magnitud del volumen (1236) y los caudales de material celulósico y agua que entran al volumen. En algunas realizaciones, el volumen (1236) se dimensiona para obtener un mínimo tiempo de residencia del material celulósico y el agua para que ocurra la mezcla. Por ejemplo, cuando están fluyendo 2000 toneladas/día de material celulósico y 1,25 millón de galones/día de agua a través del depósito 1214, el volumen 1236 puede ser de aproximadamente 32.000 galones para producir un mínimo tiempo de residencia de aproximadamente 15 minutos para que ocurra la mezcla.

El depósito (1214) incluye una mezcladora (1240) en comunicación de fluidos con el volumen (1236). La mezcladora (1240) agita el contenido del volumen (1236) para dispersar el material celulósico a través de toda el agua presente en el volumen. Por ejemplo, la mezcladora (1240) puede ser una pala rotativa dispuesta en el depósito (1214). En algunas realizaciones, la mezcladora (1240) dispersa el material celulósico de una manera sustancialmente uniforme a través de toda el agua.

60

El depósito (1214) también incluye una salida (1242) en comunicación de fluidos con el volumen (1236) y la corriente de proceso (1216). La mezcla de biomasa y agua en el volumen (1236) fluye hacia afuera del depósito (1214) a través de la salida (1242). La salida (1242) está dispuesta cerca del fondo del depósito (1214) para permitir que la gravedad impulse a la mezcla de biomasa y agua a salir del depósito (1214) y dentro de la corriente de proceso (1216).

La primera bomba (1218) (por ejemplo, cualquiera de diversas bombas de vórtice de rotor cóncavo que produce Essco Pumps & Controls, Los Angeles, California) traslada a los contenidos de la corriente de proceso (1216) hacia la celda de flujo (1224). En algunas realizaciones, la primera bomba (1218) agita el contenido de la corriente del proceso (1216) de modo que la mezcla de materia celulósica y agua sea sustancialmente uniforme en la entrada (1220) de la celda de flujo (1224). Por ejemplo, la primera bomba (1218) puede agitar la corriente del proceso (1216) para crear un flujo turbulento que persiste a través de la corriente del proceso entre la primera bomba y la entrada (1220) de la celda de flujo (1224).

La celda de flujo (1224) incluye un volumen de reactor (1244) en comunicación de fluidos con la admisión (1220) y la salida (1222). En algunas realizaciones, el volumen de reactor (1244) es un tubo de acero inoxidable capaz de soportar altas presiones (por ejemplo, 10 bares). Además o como alternativa, el volumen de reactor (1244) incluye una sección transversal rectangular.

La celda de flujo (1224) además incluye un intercambiador de calor (1246) en comunicación térmica con al menos una parte del volumen del reactor (1244). El fluido de enfriamiento (1248) (p. ej., agua) fluye al intercambiador de calor (1246) y absorbe el calor generado cuando la corriente del proceso (1216) se trata con ultrasonidos en el volumen de reactor (1244). En algunas realizaciones, la velocidad de flujo y/o la temperatura del fluido de enfriamiento (1248) al intercambiador de calor (1246) se controla para mantener una temperatura aproximadamente constante en el volumen del reactor (1244). En algunas realizaciones, la temperatura en el volumen del reactor (1244) se mantiene en entre 20 y 50°C, por ejemplo, 25, 30, 35, 40, o 45 °C. Adicionalmente o como alternativa, el calor que se transfiere al fluido refrigerante (1248) desde el volumen del reactor (1244) se puede utilizar en otras partes del proceso total.

Una sección adaptadora (1226) crea una comunicación de fluidos entre el volumen del reactor (1244) y un reforzador (1250) acoplado (por ejemplo, acoplado mecánicamente usando una brida) al transductor ultrasónico (1226). Por ejemplo, la sección adaptadora (1226) puede incluir un conjunto de brida y junta tórica dispuesto para crear una conexión a prueba de fugas entre el volumen del reactor (1244) y el reforzador (1250). En algunas realizaciones, el transductor ultrasónico (1226) es un transductor ultrasónico de alta potencia que produce Hielscher Ultrasonics de Teltow, Alemania.

Durante la operación, un generador (1252) suministra electricidad a un transductor ultrasónico (1252). El transductor ultrasónico (1226) incluye un elemento piezoeléctrico que convierte a la energía eléctrica en sonido en el rango ultrasónico. En algunas realizaciones, los materiales se tratan con ultrasonidos usando sonido con una frecuencia de entre aproximadamente 16 kHz y aproximadamente 110 kHz, por ejemplo, entre aproximadamente 18 kHz y aproximadamente 75 kHz o entre aproximadamente 20 kHz y aproximadamente 40 kHz (por ejemplo, sonido con una frecuencia de entre 20 kHz y 40 kHz). En ciertas formas de implementación, se realiza un tratamiento con ultrasonidos, por ejemplo, con una frecuencia de entre aproximadamente 15 kHz y aproximadamente 25 kHz, tal como entre aproximadamente 18 kHz y 22 kHz. En realizaciones específicas, se puede realizar el tratamiento con ultrasonidos utilizando un resonador de 1 KW o mayor, por ejemplo un resonador de 2, 3, 4, 5 o incluso 10 kW.

A continuación, la energía ultrasónica se suministra al medio de trabajo a través del reforzador (1248). La energía ultrasónica que viaja a través del impulsor (1248) en el volumen del reactor (1244) crea una serie de compresiones y rarefacciones en la corriente del proceso (1216) con una intensidad suficiente para crear cavitación en la corriente del proceso (1216). La cavitación disgrega el material celulósico disperso en la corriente de proceso (1216). La cavitación también produce radicales libres en el agua de la corriente del proceso (1216). Estos radicales libres actúan para romper más el material celulósico en la corriente del proceso (1216).

En general, se aplican entre 5 y 4000 MJ/m³, por ejemplo, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000 o 3000 MJ/m³, de energía ultrasónica a la corriente de proceso (1216) que fluye con una velocidad de aproximadamente 0,2 m³/s (aproximadamente 3200 galones/min). Después de exposición a energía ultrasónica en el volumen del reactor (1244), la corriente del proceso (1216) sale de la celda de flujo (1224) a través de la salida (1222). La segunda bomba (1230) traslada la corriente de proceso (1216) al tratamiento subsiguiente (por ejemplo, cualquiera de diversas bombas de vórtice de rotor cóncavo que produce Essco Pumps & Controls, Los Angeles, California).

Aunque se han descrito determinadas realizaciones, son posibles otras realizaciones.

Como ejemplo, aunque la corriente de proceso (1216) se ha descrito como una única vía de flujo, son posibles otras disposiciones. En algunas realizaciones por ejemplo, la corriente de proceso (1216) incluye múltiples vías de flujo
5 paralelas (por ejemplo, que fluyen con una velocidad de 10 galones/min). Además o como alternativa, las múltiples vías de flujo paralelas de la corriente de proceso (1216) fluyen dentro de células de flujo separadas y se tratan con ultrasonidos en paralelo (por ejemplo, usando varios transductores ultrasónicos de 16 kW),

Como otro ejemplo, aunque se ha descrito un único transductor ultrasónico (1226) acoplado a una celda de flujo
10 (1224), son posibles otras disposiciones. En algunas realizaciones, en la celda de flujo (1224) hay dispuestos varios transductores ultrasónicos (1226) (por ejemplo, en una celda de flujo (1224) se pueden disponer diez transductores ultrasónicos). En algunas realizaciones, las ondas de sonido generadas por cada uno de los diversos transductores ultrasónicos (1226) están sincronizadas (por ejemplo, sincronizadas fuera de fase entre sí) para mejorar la cavitación que actúa sobre la corriente de proceso (1216).

15 Como otro ejemplo, aunque se ha descrito una única celda de flujo (1224), son posibles otras disposiciones. En algunas realizaciones, una segunda bomba (1230) traslada a la corriente de proceso hacia una segunda celda de flujo donde un segundo reforzador y transductor ultrasónico continúa tratando con ultrasonidos la corriente de proceso (1216).

20 Como otro ejemplo, aunque el volumen del reactor (1244) se ha descrito como un volumen cerrado, en algunas realizaciones el volumen del reactor (1244) está abierto en determinadas condiciones ambiente. En dichas realizaciones, el pretratamiento por ultrasonidos se puede llevar a cabo de manera sustancialmente simultánea con otras técnicas de pretratamiento. Por ejemplo, se puede aplicar energía ultrasónica a la corriente de proceso (1216)
25 en el volumen del reactor (1244) mientras simultáneamente se introducen haces de electrones a la corriente de proceso (1216).

Como otro ejemplo, aunque se ha descrito un proceso continuo, son posibles otras disposiciones. En algunas realizaciones, el tratamiento con ultrasonidos se puede llevar a cabo en un proceso por lotes. Por ejemplo, se puede
30 rellenar un volumen con una mezcla 10% (peso en volumen) de biomasa en agua y se puede exponer al sonido con una intensidad de entre aproximadamente 50 W/cm² y aproximadamente 600 W/cm², por ejemplo, entre aproximadamente 75 W/cm² y aproximadamente 300 W/cm² o entre aproximadamente 95 W/cm² y aproximadamente 200 W/cm². Adicionalmente o como alternativa, la mezcla en el volumen se puede tratar con ultrasonidos durante entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 24 horas, por ejemplo, entre
35 aproximadamente 1,5 horas y aproximadamente 12 horas, o entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 10 horas. En algunas realizaciones, el material se trata con ultrasonidos durante un tiempo predeterminado, y luego se deja en reposo durante un segundo tiempo predeterminado antes de volverlo reiniciar el tratamiento.

Con referencia a la figura 13, en algunas realizaciones, hay dos transductores electroacústicos acoplados
40 mecánicamente a un único resonador. Según se muestra, hay un par de transductores piezoeléctricos (60 y 62) acoplados a un resonador (64) que consiste en una barra con rendijas mediante respectivos resonadores de acoplamiento intermediarios (70 y 72), donde estos últimos también se conocen como resonadores reforzadores. Las vibraciones mecánicas provistas por los transductores, en respuesta a la energía eléctrica de alta frecuencia que se les aplica, son transmitidas a los respectivos resonadores de acoplamiento, que se pueden construir para proveer
45 una ganancia mecánica, como por ejemplo con una proporción de 1 a 1,2. Los resonadores se proveen de respectivas bridas de montaje (74 y 76) para sostener el conjunto de transductor y resonador en un alojamiento estacionario.

Las vibraciones transmitidas desde los transductores a través de los resonadores de acoplamiento o reforzadores se
50 acoplan a la superficie de entrada (78) del resonador y son transmitidas a través del resonador a la superficie de salida (80) dispuesta en posición opuesta, que, durante la operación, está acoplada de manera forzada con una pieza de trabajo (no se muestra) a la cual se aplican las vibraciones.

La energía eléctrica de alta frecuencia provista por el suministro de energía (82) se alimenta a cada uno de los
55 transductores, conectado eléctricamente en paralelo, a través de un transformador simétrico/asimétrico (84) y un respectivo capacitor conectado en serie (86 y 90), un capacitor conectado en serie con la conexión eléctrica de cada uno de los transductores. El transformador simétrico/asimétrico es conocido también como "balún" por "unidad de balance". El transformador simétrico/asimétrico incluye un núcleo magnético (92) y un par de bobinados idénticos (94 y 96), que también se denominan bobinado primario y bobinado secundario, respectivamente.

60

En algunas realizaciones, los transductores incluyen transductores piezoeléctricos que se pueden obtener comercialmente, como por ejemplo los modelos (105 o 502) de Branson Ultrasonics Corporation, cada uno de los cuales está diseñado para operar a 20 kHz y una clasificación de potencia máxima de 3 kW. El voltaje que suministra la energía para proveer un máximo desplazamiento espacial en la superficie de salida del transductor es de 930 V rms. El flujo de la corriente a través de un transductor puede variar entre cero y 3,5 A, dependiendo de la impedancia de carga. A 930 V rms el desplazamiento a la salida es de aproximadamente 20 micrones. Por lo tanto, la máxima diferencia de voltaje terminal para la misma amplitud de movimiento, puede ser de 186 V. Dicha diferencia de voltaje puede originar una circulación de grandes corrientes que fluyen entre los transductores. El transformador simétrico/asimétrico (430) asegura una condición equilibrada proveyendo un flujo de corriente igual a través de los transductores, eliminando de esa manera la posibilidad de las corrientes de circulación. El tamaño del alambre de los bobinados se debe seleccionar para la corriente de carga completa que se mencionó anteriormente y el máximo voltaje que aparece a través de la entrada del bobinado es de 93 V.

Como una alternativa a la energía ultrasónica, pueden utilizarse dispositivos de rotor-estátor, de alta frecuencia. Este tipo de dispositivo produce fuerzas de microcavitación, de alto corte, las cuales pueden desintegrar la biomasa en contacto con tales fuerzas. Dos dispositivos de dispersión de rotor-estátor, de alta frecuencia, comercialmente disponibles, son los dispositivos Suprator^{MR} fabricados por Krupp Industrietechnik GmbH y comercializados por Dorr-Oliver Deutschland GmbH de Connecticut, y los dispositivos DispaxMR fabricados y comercializados por Ika-Works, Inc., de Cincinnati, Ohio. La operación de tal dispositivo de microcavitación se trata en Stuart, Patente de EE. UU. n° 5.370.999.

Aunque el transductor ultrasónico (1226) se ha descrito incluyendo uno o más elementos piezoeléctricos activos para crear energía ultrasónica, son posibles otras disposiciones. En algunas realizaciones, el transductor ultrasónico (1226) incluye elementos activos hechos de otros tipos de materiales magnetostrictivos (por ejemplo, metales ferrosos). El diseño y la operación de un transductor ultrasónico de alta potencia con dichas características se expone en Hansen et al., Patente de EE. UU. n° 6.624.539. En algunas realizaciones, la energía ultrasónica se transfiere a la corriente de proceso (16) a través de un sistema electrohidráulico.

Aunque se ha descrito que el transductor ultrasónico (1226) utiliza la respuesta electromagnética de materiales magnetostrictivos para producir energía ultrasónica, son posibles otras disposiciones. En algunas realizaciones, se puede aplicar energía acústica en forma de una intensa onda de choque directamente a la corriente de proceso (16) usando una chispa bajo el líquido. En algunas realizaciones, la energía ultrasónica se transfiere a la corriente de proceso (16) a través de un sistema termohidráulico. Por ejemplo, se pueden producir ondas acústicas de alta densidad de energía aplicando potencia a través de un volumen cerrado de electrolito, calentando de esa manera el volumen cerrado y produciendo un aumento de presión que subsiguientemente se transmite a través de un medio que propaga el sonido (por ejemplo, la corriente de proceso (1216)). El diseño y la operación de un transductor termohidráulico con dichas características se expone en Hartmann et al., Patente de EE. UU. n° 6.383.152.

Pirólisis

Se pueden utilizar una o más secuencias de procesamiento con pirólisis para tratar la materia prima en bruto proveniente de una amplia variedad de fuentes para extraer sustancias útiles de la materia prima, y para proveer materia orgánica parcialmente degradada que funciona como entrada para los pasos y/o secuencias de tratamiento adicionales.

Con referencia nuevamente a la figura 8, en un método, un primer material (2) que incluye celulosa con un primer promedio de pesos moleculares en número (M_{N1}) se dispersa en un medio, como por ejemplo agua, y se trata con ultrasonidos y/o se cavita de otra manera, para proveer un segundo material (3) que incluye celulosa con un segundo promedio de pesos moleculares en número (M_{N2}) menor que el primer promedio de pesos moleculares en número. El segundo material (o el primer y segundo material en determinadas realizaciones) se combina(n) con un microorganismo (p. ej., una bacteria o una levadura) que puede usar el segundo y/o primer material para producir un combustible (5) que es o incluye hidrógeno, un alcohol (p. ej., etanol o butanol, tal como n-, sec- o t-butanol), un ácido orgánico, un hidrocarburo o mezclas de cualquiera de estos.

Puesto que el segundo material tiene celulosa que tiene un peso molecular reducido con respecto al primer material, y en algunos casos, también una cristalinidad reducida, en general el segundo material es más dispersable, hinchable y/o soluble en una solución que contiene el microorganismo, p. ej., en una concentración mayor que 10^6 microorganismos/ml. Estas propiedades hacen que el segundo material 3 sea más susceptible al ataque químico, enzimático y/o microbiano con respecto al primer material 2, lo cual puede mejorar mucho la tasa de producción y/o el nivel de producción de un producto deseado, p. ej., etanol. La pirólisis también puede esterilizar el primer y

segundo materiales.

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

En algunos casos, el segundo material tiene celulosa que tiene una cristalinidad (C_2) que es menor que la cristalinidad (C_1) de la celulosa del primer material. Por ejemplo, (C_2) puede ser menor que (C_1) en más de aproximadamente 10 por ciento, p. ej. 15, 20, 25, 30, 35, 40, o incluso más de aproximadamente 50 por ciento.

10

En algunas realizaciones, al cristalinidad inicial (antes de pirólisis) es de aproximadamente 40 a aproximadamente 87,5 por ciento, p. ej., de aproximadamente 50 a aproximadamente 75 por ciento o de aproximadamente 60 a aproximadamente 70 por ciento, y el índice de cristalinidad después de pirólisis es de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 por ciento, p. ej., de aproximadamente 15 a aproximadamente 45 por ciento o de

15

aproximadamente 20 a aproximadamente 40 por ciento. Sin embargo, en determinadas realizaciones, p. ej., después de pirólisis extensa, se puede tener un índice de cristalinidad menor que 5 por ciento. En algunas realizaciones, el material después de pirólisis es sustancialmente amorfo.

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

En algunas realizaciones, el segundo material puede tener un nivel de oxidación (O_2) que es mayor que el nivel de oxidación (O_1) del primer material. Un mayor nivel de oxidación del material puede contribuir a su dispersibilidad, capacidad de hincharse y/o solubilidad, aumentando adicionalmente la susceptibilidad de los materiales al ataque químico, enzimático o microbiano. En algunas realizaciones, para aumentar el nivel de oxidación del segundo material con respecto al primer material, la pirólisis se lleva a cabo en un entorno oxidante, produciendo un segundo material que está más oxidado que el primer material. Por ejemplo, el segundo material puede tener más grupos hidroxilo, grupos aldehído, grupos cetona, grupos éster o grupos ácido carboxílico, que aumentan la hidrofiliidad.

En algunas realizaciones, la pirólisis de los materiales es continua. En otras realizaciones, el material se piroliza durante un tiempo predeterminado, y luego se deja enfriar durante un segundo tiempo predeterminado antes de volver a pirolizarlo.

Sistemas de pirólisis

40

La figura 14 muestra un diagrama de flujo del procedimiento (6000) que incluye varias etapas en un sistema de pretratamiento pirolítico de la materia prima. En la primera etapa (6010), se recibe un suministro de materia prima seca de una fuente de alimentación.

Como se ha descrito antes, la materia prima seca de la fuente de alimentación puede ser preprocesada antes del suministro a la cámara de pirólisis. Por ejemplo, si la materia prima deriva de fuentes vegetales, se pueden separar determinadas partes del material vegetal antes de recoger el material vegetal y/o antes de suministrar el material vegetal mediante el dispositivo de transporte de materia prima. Alternativamente, o además, la materia prima de biomasa se puede someter a procesamiento mecánico (6020) (p. ej., para reducir la longitud media de las fibras en la materia prima) antes de suministrar a la cámara de pirólisis.

Después del procesamiento mecánico, la materia prima se somete a un paso de ajuste de humedad (6030). La naturaleza del paso de ajuste de humedad depende del contenido de humedad de la materia prima procesada mecánicamente. Generalmente, la pirólisis de la materia prima ocurre más eficazmente cuando el contenido de humedad de la materia prima se encuentra entre aproximadamente 10% y aproximadamente 30% (por ejemplo, entre 15% y 25%) en peso de materia prima. Si el contenido de humedad de la materia prima es mayor que aproximadamente 40% en peso, la carga calórica extra presentada 10 por el contenido de agua de la materia prima aumenta el consumo de energía de los siguientes pasos de pirólisis.

En algunas realizaciones, si la materia prima tiene un contenido de humedad que es mayor que aproximadamente

30% en peso, se puede mezclar con material de materia prima más seca (6220), que tiene un bajo contenido de humedad, creando una mezcla de materia prima en el paso (6030) con un contenido de humedad promedio que se encuentra en los límites expuestos anteriormente. En algunas realizaciones, la materia prima con un alto contenido de humedad puede ser simplemente secada por dispersión de la materia prima en una cinta transportadora que cicla el material celulósico a través de una unidad de calentamiento en serie. La unidad de calentamiento evapora una porción del agua presente en la materia prima.

En algunas realizaciones, si la materia prima del paso (6020) tiene un contenido de humedad que es muy bajo (por ejemplo, menor que aproximadamente 10% en peso), la materia prima procesada mecánicamente puede ser procesada con material de materia prima más húmeda (6230) con un contenido mayor de humedad, tal como aguas residuales. Como alternativa, o adicionalmente, se puede agregar agua (6240) a la materia prima seca del paso (6020) para aumentar su contenido de humedad.

En el paso (6040), la materia prima - ahora con su contenido de humedad ajustado para entrar en límites adecuados - se puede precalentar en un paso de precalentamiento opcional (6040). El paso de precalentamiento (6040) se puede usar para aumentar la temperatura de la materia prima a entre 75 °C y 150 °C en preparación para la posterior pirólisis de la biomasa. Dependiendo de la naturaleza de la materia prima y del diseño particular de la cámara de pirólisis, el precalentamiento del material celulósico puede asegurar que la distribución de calor en la materia prima de biomasa se mantiene más uniforme durante la pirólisis, y puede reducir la carga calórica en la cámara de pirólisis.

La materia prima se transporta posteriormente a una cámara de pirólisis para ser sometida a pirólisis en el paso (6050). En algunas realizaciones, el transporte de la materia prima se asiste por agregado de uno o más gases presurizados (6210) a la corriente de materia prima. Los gases crean un gradiente de presión en un conducto de transporte de materia prima, propulsando la materia prima hacia la cámara de pirólisis (e incluso a través de la cámara de pirólisis). En algunas realizaciones, el transporte de la materia prima ocurre mecánicamente; es decir, un sistema de transporte que incluye una cinta transportadora, tal como un sinfín, que transporta la materia prima a la cámara de pirólisis.

Se pueden agregar otros gases (6210) a la materia prima antes de la cámara de pirólisis. En algunas realizaciones, por ejemplo, se pueden agregar uno o más gases catalizadores a la materia prima para ayudar a la descomposición de la materia prima durante la pirólisis. En algunas realizaciones, se puede agregar uno o más agentes de eliminación a la materia prima para atrapar materiales volátiles liberados durante la pirólisis. Por ejemplo, durante la pirólisis se pueden liberar diferentes compuestos basados en azufre tales como sulfuros, y se puede agregar un agente tal como gas hidrógeno a la materia prima para causar la desulfurización de los productos de pirólisis. El hidrógeno se combina con los sulfuros para formar gas sulfuro de hidrógeno, que se puede eliminar de la materia prima pirolizada.

La pirólisis de la materia prima en la cámara puede incluir el calentamiento de la materia prima a temperaturas relativamente altas para causar la descomposición parcial de la materia prima. Generalmente, la materia prima es calentada a una temperatura en un rango entre 150 °C y 1100 °C. La temperatura a la cual se calienta la materia prima depende de varios factores, que incluyen la descomposición de la materia prima, el tamaño de partícula promedio de la materia prima, el contenido de humedad, y los productos deseados de pirólisis. Para muchos tipos de materia prima de biomasa, por ejemplo, se usan temperaturas de pirólisis entre 300 °C y 550 °C.

El tiempo de residencia de la materia prima en la cámara de pirólisis generalmente depende de varios factores, que incluyen la temperatura de pirólisis, la composición de la materia prima, el tamaño de partícula promedio de la materia prima, el contenido de humedad y los productos deseados de pirólisis. En algunas realizaciones, los materiales de materia prima son sometidos a pirólisis a una temperatura justo por encima de la temperatura de descomposición del material en una atmósfera inerte, por ejemplo, entre aproximadamente 2 °C por encima y aproximadamente 10 °C por encima de la temperatura de descomposición o entre aproximadamente 3 °C por encima y aproximadamente 7 °C por encima de la temperatura de descomposición. En dichas realizaciones, el material generalmente se mantiene a esta temperatura más de 0,5 horas, por ejemplo, más de 1,0 hora o más de aproximadamente 2,0 horas. En otras realizaciones, los materiales se someten a pirólisis a una temperatura muy por encima de la temperatura de descomposición del material en una atmósfera inerte, por ejemplo, entre aproximadamente 75 °C por encima y aproximadamente 175 °C por encima de la temperatura de descomposición o entre aproximadamente 85 °C por encima y aproximadamente 150 °C por encima de la temperatura de descomposición. En dichas realizaciones, el material generalmente se mantiene a esta temperatura menos de 0,5 horas, por ejemplo, menos de 20 minutos, menos de 10 minutos, menos de 5 minutos o menos de 2 minutos. En aun otras realizaciones, los materiales se someten a pirólisis a una temperatura extrema, por ejemplo, entre

aproximadamente 200 °C por encima y aproximadamente 500 °C por encima de la temperatura de descomposición del material en un ambiente inerte o entre aproximadamente 250 °C por encima y aproximadamente 400 °C por encima de la temperatura de descomposición. En dichas realizaciones, el material generalmente se mantiene a esta temperatura durante menos de 1 minuto, por ejemplo, menos de 30 segundos, 15 segundos, 10 segundos, 5 segundos, 1 segundo o menos de 500 milisegundos. Dichas realizaciones generalmente se refieren como pirólisis rápida.

En algunas realizaciones, la materia prima se calienta relativamente rápido a la temperatura de pirólisis seleccionada en la cámara. Por ejemplo, la cámara se puede diseñar para calentar la materia prima a una velocidad de entre 500 °C/s y 11.000 °C/s, por ejemplo 500 °C/s y 1000 °C/s.

Un flujo turbulento de material de materia prima en la cámara de pirólisis generalmente es ventajoso, ya que asegura una transferencia de calor relativamente eficaz al material de materia prima desde el subsistema de calentamiento. El flujo turbulento, por ejemplo, se puede lograr arrastrando el material de materia prima a través de la cámara usando uno o más gases vehículo inyectados (6210). En general, los gases vehículo son relativamente inertes para el material de materia prima, incluso a altas temperaturas en la cámara de pirólisis. Los gases vehículo ejemplificativos incluyen, por ejemplo, nitrógeno, argón, metano, monóxido de carbono y dióxido de carbono. Como alternativa, o adicionalmente, sistemas de transporte mecánico tales como sinfín pueden transportar y hacer circular la materia prima en la cámara de pirólisis para crear un flujo de materia prima turbulento.

En algunas realizaciones, la pirólisis de la materia prima ocurre sustancialmente en la ausencia de oxígeno y otros gases reactivos. El oxígeno se puede eliminar de la cámara de pirólisis por medio de purgas periódicas de la cámara con nitrógeno a alta presión (por ejemplo, con presiones de nitrógeno de 2 bar o más). Luego del purgado de la cámara, una mezcla de gas presente en la cámara de pirólisis (por ejemplo, durante la pirólisis de la materia prima) puede incluir menos de 4 mol % de oxígeno (por ejemplo, menos de 1 mol % de oxígeno, e incluso menos de 0,5 mol % de oxígeno). La ausencia de oxígeno asegura que la ignición de la materia prima no ocurra a las elevadas temperaturas de pirólisis.

En algunas realizaciones, se pueden introducir cantidades relativamente pequeñas de oxígeno en la materia prima y que estén presentes durante la pirólisis. Dicha técnica es referida como pirólisis oxidativa. Generalmente, la pirólisis oxidativa se lleva a cabo en etapas de calentamiento múltiples. Por ejemplo, en una primera etapa de calentamiento, la materia prima se calienta en la presencia de oxígeno para provocar la oxidación parcial de la materia prima. Esta etapa consume el oxígeno disponible en la cámara de pirólisis. Posteriormente, en etapas posteriores de calentamiento, la temperatura de la materia prima se eleva más. Sin embargo, con todo el oxígeno consumido en la cámara, la combustión de la materia prima no ocurre, y ocurre la descomposición pirolítica libre de combustión de la materia prima (por ejemplo, para generar productos hidrocarburos). En general, el proceso de calentamiento de la materia prima en la cámara de pirólisis para iniciar la descomposición es endotérmico.

Sin embargo, en la pirólisis oxidativa, la formación de dióxido de carbono por oxidación de la materia prima es un proceso exotérmico. El calor liberado de la formación de dióxido de carbono puede ayudar a las siguientes etapas de calentamiento de pirólisis, reduciendo de esta manera la carga calórica presentada por la materia prima.

En algunas realizaciones, la pirólisis ocurre en un ambiente inerte, tal como cuando los materiales de materia prima se cubren con gas argón o nitrógeno. En algunas realizaciones, la pirólisis puede ocurrir en un ambiente oxidante, tal como en aire o argón enriquecido en aire.

En algunas realizaciones, la pirólisis se puede realizar en un ambiente reductor, tal como cuando los materiales de materia prima se cubren con gas hidrógeno. Para ayudar con la pirólisis, se pueden agregar diferentes agentes químicos, tales como oxidantes, reductores, ácidos o bases al material antes o durante la pirólisis. Por ejemplo, se puede agregar ácido sulfúrico o se puede agregar un peróxido (por ejemplo, peróxido de benzoilo).

Tal como se expone anteriormente, se puede usar una variedad de condiciones de procesamiento, dependiendo de factores tales como la composición de la materia prima y de los productos deseados de pirólisis. Por ejemplo, para material de materia prima que contienen celulosa, se pueden emplear condiciones de pirólisis relativamente suaves, incluyendo temperaturas de pirólisis rápida entre 375 °C y 450 °C, y tiempos de residencia de menos de 1 segundo. Como otro ejemplo, para material de desecho sólido orgánico tal como aguas residuales, generalmente se usan temperaturas de pirólisis rápida entre 500 °C y 650 °C, con tiempos de residencia de entre 0,5 y 3 segundos. En general, muchos de los parámetros del proceso de pirólisis, incluyendo tiempo de residencia, temperatura de pirólisis, turbulencia de la materia prima, contenido de humedad, composición de la materia prima, composición del producto de pirólisis, y composición del gas agregado, se pueden regular automáticamente por un sistema de

reguladores y un sistema de control automatizado.

Después del paso de pirólisis (6050), los productos de pirólisis sufren un paso de enfriamiento (6250) para reducir la temperatura de los productos antes del procesamiento adicional. Generalmente, el paso de enfriamiento (6250) incluye el rociado de los productos de pirólisis con corrientes de agua refrigerante (6260). El agua refrigerante también forma una suspensión que incluye material producto no disuelto, sólido y diferentes productos disueltos. También se encuentra presente en la corriente de producto una mezcla que incluye diferentes gases, incluyendo gases producto, gases vehículo y otros tipos de gases de proceso.

- 10 La corriente de producto es transportada por medio de una tubería en serie hacia un separador de gas que lleva a cabo el paso de separación de gas (6060), en donde se separan los gases productos y otros gases de la suspensión formada por el enfriamiento de los productos de pirólisis. La mezcla de gas separada se opcionalmente dirige hacia un sistema de soplado (6130), el cual aumenta la presión del gas por soplado de aire en la mezcla. La mezcla de gas puede ser sometida a un paso de filtración (6140), en el cual la mezcla de gas pasa a través de uno o más filtros (por ejemplo, filtros de carbono activado) para eliminar partículas y otras impurezas. En un paso posterior (6150), el gas filtrado puede ser comprimido y almacenado para el posterior uso. Como alternativa, el gas filtrado puede ser sometido a pasos de procesamiento adicionales (6160). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el gas filtrado puede ser condensado para separar los diferentes compuestos gaseosos en la mezcla de gas. Los diferentes compuestos pueden incluir, por ejemplo, diferentes productos hidrocarburos (por ejemplo, alcoholes, alcanos, alquenos, alquinos, éteres) producidos durante la pirólisis. En algunas realizaciones, el gas filtrado que contiene una mezcla de componentes hidrocarburos se puede combinar con gas vapor (6170) (por ejemplo, una mezcla de vapor de agua y oxígeno) y ser sometido a un proceso de ruptura para reducir los pesos moleculares de los componentes hidrocarburos.
- 25 En algunas realizaciones, la cámara de pirólisis incluye fuentes de calor que quema gases hidrocarburo tales como metano, propano, y/o butano para calentar la materia prima. Una porción 6270 de los gases separados puede ser recirculada en la cámara de pirólisis para la combustión, para generar calor de proceso para sustentar el proceso de pirólisis.
- 30 En algunas realizaciones, la cámara de pirólisis puede recibir calor de proceso que se puede usar para aumentar la temperatura de los materiales de materia prima. Por ejemplo, la irradiación de la materia prima con radiación (por ejemplo, radiación gamma, radiación de haz de electrones, u otros tipos de radiación) puede calentar los materiales de materia prima a temperaturas relativamente altas. Los materiales de materia prima calentados se pueden enfriar por medio de un sistema de intercambio de calor que elimina parte del exceso de calor de la materia prima irradiada.
- 35 El sistema de intercambio de calor se puede configurar para transportar parte de la energía calórica hacia la cámara de pirólisis para calentar (o precalentar) el material de materia prima, reduciendo de esta manera los costes de energía para el proceso de pirólisis.

- La suspensión que contiene productos líquidos y sólidos de pirólisis puede ser sometida a un paso opcional de extracción de agua 6070, en el cual el exceso de agua puede ser eliminado de la suspensión por medio de procesos tales como presión mecánica o evaporación. El exceso de agua (6280) se puede filtrar y luego recircular para el posterior uso en el enfriamiento de los productos de descomposición de pirólisis en el paso (6250).

- La suspensión deshidratada luego sufre un paso de separación mecánica (6080), en la cual el material producto sólido (6110) se separa del material producto líquido (6090) por medio de una serie de filtros cada vez más finos. En el paso (6100), el material producto líquido (6090) luego puede ser condensado (por ejemplo, por medio de evaporación) para eliminar el agua de desecho (6190), y purificado por procesos tales como extracción. La extracción puede incluir el agregado de uno o más disolventes orgánicos (6180), por ejemplo, para separar productos tales como aceites de productos tales como alcoholes. Los disolventes orgánicos adecuados incluyen, por ejemplo, diferentes hidrocarburos y halohidrocarburos. Los productos líquidos purificados (6200) posteriormente pueden ser sometidos a pasos de procesamiento adicionales. El agua de desecho (6190) puede ser filtrada si es necesario, y recirculada para el posterior uso en el enfriamiento de los productos de descomposición de pirólisis en el paso (6250).

- 55 Después de la separación en el paso (6080), el material de producto sólido (6110) se somete opcionalmente a un paso de secado (6120) que puede incluir la evaporación de agua. El material sólido (6110) puede ser entonces almacenado para su posterior uso, o sometido a pasos adicionales de tratamiento, como sea apropiado.

- Los parámetros del proceso de pirólisis expuestos anteriormente son ejemplificativos. En general, los valores de estos parámetros pueden variar ampliamente de acuerdo con la naturaleza de la materia prima y de los productos

deseados. Asimismo, se puede usar una gran variedad de diferentes técnicas de pirólisis, incluyendo el uso de fuentes de calor tales como llama de hidrocarburos y/u hornos, láseres infrarrojos, calentadores de microondas, calentadores por inducción, calentadores por resistividad, y otros dispositivos y configuraciones de calentamiento.

- 5 Se puede usar una amplia variedad de diferentes cámaras de pirólisis para descomponer la materia prima. En algunas realizaciones, por ejemplo, la pirólisis de la prima puede incluir el calentamiento del material usando un miembro calefactor por resistividad, tal como un filamento de metal o una cinta de metal. El calentamiento puede ocurrir por contacto directo entre el miembro calefactor por resistividad y el material.
- 10 En algunas realizaciones, la pirólisis puede incluir el calentamiento del material por inducción, tal como por uso de un pirolizador de punto Curie. En algunas realizaciones, la pirólisis puede incluir el calentamiento del material por la aplicación de radiación, tal como radiación infrarroja. La radiación puede ser generada por un láser, tal como un láser infrarrojo.
- 15 En algunas realizaciones, la pirólisis puede incluir el calentamiento del material con un calentador por convección. El calor por convección puede ser generado por una corriente de gas calentado que fluye. El gas calentado puede ser mantenido a una temperatura menor que aproximadamente 1200 °C, tal como a menos de 1000 °C, menos de 750 °C, menos de 600 °C, menos de 400 °C o incluso a menos de 300 °C. El gas calentado puede ser mantenido a una temperatura mayor que aproximadamente 250 °C. El calor por convección puede ser generado por un cuerpo caliente rodeando el primer material, tal como en un horno.
- 20

En algunas realizaciones, la pirólisis puede incluir el calentamiento del material con una corriente a una temperatura por encima de aproximadamente 250 °C.

- 25 Una realización de una cámara de pirólisis se muestra en la figura 15. La cámara (6500) incluye una pared de cámara aislada (6510) con una salida de ventilación (6600) para los gases de escape, una variedad de quemadores (6520) que generan calor para el proceso de pirólisis, un conducto de transporte (6530) para transportar la materia prima a través de la cámara (6500), un sinfín (6590) para mover la materia prima a través del conducto (6530) en un flujo turbulento, y un sistema de enfriamiento (6540) con un sinfín (6610) para el movimiento de los productos de pirólisis, chorros de agua (6550) para rociar los productos de pirólisis con agua refrigerante, y un separador de gas para separar los productos gaseosos (6580) de una suspensión (6570) que contiene productos sólidos y líquidos.
- 30

Otra realización de una cámara de pirólisis se muestra en la figura 16 La cámara (6700) incluye una pared de cámara aislada (6710), un conducto de suministro de materia prima (6720, una pared interna de cámara con declive (6730), quemadores (6740) que generan calor para el proceso de pirólisis, una salida de ventilación (6750) para los gases de escape, y un separador de gases (6760) para separar los productos gaseosos (6770) de los productos líquidos y sólidos (6780). La cámara (6700) está configurada para rotar en la dirección que se muestra por la flecha (6790) para asegurar el mezclado adecuado y el flujo turbulento de la materia prima en la cámara.

- 40 Otra realización de una cámara de pirólisis se muestra en la figura 17 El pirolizador con filamento (1712) incluye un soporte para muestra (1713) con un elemento de calentamiento por resistividad (1714) en la forma de un cable bobinado a través del espacio abierto definido por el soporte para muestra (1713). Opcionalmente, el elemento calentador puede girar alrededor del eje (1715) (como lo indica la flecha (1716)) para hacer caer el material que incluye el material celulósico en soporte para muestra (1713). El espacio (1718) definido por las paredes (1719) se mantiene a una temperatura por encima de la temperatura ambiente, por ejemplo, entre 200 y 250 °C. En un uso típico, un gas vehículo, por ejemplo, un gas inerte, o un gas oxidante o reductor, atraviesa por el soporte para muestra (1713) mientras que el elemento de calentamiento por resistividad se hace rotar y se calienta a una temperatura deseada, por ejemplo, 325 °C. Después de un tiempo apropiado, por ejemplo, entre 5 y 10 minutos, el material pirolizado se vacía del soporte para muestra. El sistema que se muestra en la figura 17 puede ser modificado a escala y convertirse en continuo. Por ejemplo, en lugar de un cable como miembro calefactor, el miembro calefactor puede ser un tornillo sinfín. El material puede caer continuamente en el soporte para muestra, golpeando un tornillo caliente que piroliza el material. Al mismo tiempo, el tornillo puede empujar el material pirolizado hacia afuera del soporte para muestra a fin de permitir la entrada de material nuevo sin pirolizar.
- 45
- 50
- 55 Otra realización de una cámara de pirólisis se muestra en la figura 18, que presenta un pirolizador de punto Curie (1820) que incluye una cámara para muestra (1821) que alberga una lámina de metal ferromagnética (1822). Alrededor de la cámara para muestra (1821) hay una bobina de RF 1823. El espacio (1824) definido por las paredes (1825) se mantiene a una temperatura por encima de la temperatura ambiente, por ejemplo, entre 200 y 250 °C. En un uso típico, un gas vehículo atraviesa por la cámara para muestra (1821) mientras que la lámina de metal (1822) se calienta por inducción por medio de un campo aplicado de RF para pirolizar el material a la temperatura deseada.
- 60

Otra realización de una cámara de pirólisis se muestra en la figura 19. El pirolizador con horno (130) incluye un soporte para muestra (131) que se puede desplazar y un horno (132). En un uso típico, la muestra se baja (como lo indica la flecha (137)) a una zona caliente (135) del horno (132), mientras un gas vehículo llena la caja (136) y atraviesa por el soporte para muestra (131). La muestra se calienta hasta la temperatura deseada durante un tiempo deseado para proveer un producto pirolizado. El producto pirolizado se quita del pirolizador levantando el soporte para muestra (como lo indica la flecha 134).

En algunas realizaciones, como se muestra en la figura 20, un blanco celulósico (140) puede ser pirolizado por tratamiento del blanco, que está albergado en una cámara de vacío 141, con luz de un láser, por ejemplo, luz que tiene una longitud de onda de entre aproximadamente 225 nm y aproximadamente 1500 nm. Por ejemplo, el blanco puede ser vaporizado a 266 nm, usando el cuarto armónico de un láser Nd-YAG (Spectra Physics, GCR170, San José, California). La configuración óptica mostrada permite que se dirija la luz casi monocromática (143) generada por el láser (142) usando los espejos (144) y (145) sobre en blanco luego de pasar a través de una lente (146) en la cámara de vacío (141). Generalmente, la presión en la cámara de vacío se mantiene menor que aproximadamente 10^{-6} mm Hg. En algunas realizaciones, se usa radiación infrarroja, por ejemplo, radiación de 1,06 micrones de un láser Nd-YAG. En dichas realizaciones, se puede combinar un indicador sensible a infrarrojo con el material celulósico para producir un blanco celulósico. El indicador infrarrojo puede potenciar el calentamiento del material celulósico. La vaporización con láser se describe por Blanchet-Fincher et al. en la Patente de EE. UU. n° 5.942.649.

En referencia a la figura 21, en algunas realizaciones, se puede pirolizar de forma rápida un material celulósico por recubrimiento de un filamento de tungsteno (150), tal como un filamento de tungsteno de entre 5 y 25 mil, con el material celulósico deseado al mismo tiempo que el material se encuentra albergado en una cámara de vacío (151). Para efectuar la pirólisis, la corriente se hace pasar a través del filamento, la cual causa un rápido calentamiento del filamento durante el tiempo deseado. Generalmente, el calentamiento se sigue durante unos segundos antes de permitir que se enfríe el filamento. En algunas realizaciones, el calentamiento se realiza un número de veces para producir la cantidad deseada de pirólisis.

En algunas realizaciones, el material de biomasa que contiene hidrato de carbono se puede calentar en ausencia de oxígeno en un reactor de lecho fluidizado. Si se desea, el material celulósico que contiene hidrato de carbono puede tener secciones transversales relativamente finas, y puede incluir cualquiera de los materiales fibrosos descritos en la presente memoria, para la transferencia eficaz de calor. El material se puede calentar por transferencia calórica desde un metal o cerámica caliente, tal como perlas de vidrio o arena en el reactor, y el líquido o aceite resultante de la pirólisis puede ser transportado a una refinería central para hacer combustible inflamable u otros productos útiles.

Oxidación

Se pueden utilizar una o más secuencias de tratamiento con ultrasonidos para tratar la materia prima en bruto proveniente de una amplia variedad de diversas fuentes para extraer sustancias útiles de la materia prima, y para proveer materia orgánica parcialmente degradada que funciona como entrada para los pasos y/o secuencias de tratamiento adicionales.

En referencia nuevamente a la figura 8, se oxida un primer material (2) que incluye celulosa que tiene un promedio de peso molecular en número inicial ($^1M_{N1}$) y que tiene un contenido de oxígeno ($^1O_1$) inicial, por ejemplo, por calentamiento del primer material en un horno con tubo en corriente de aire o aire enriquecido con oxígeno, para proveer un segundo material (3) que incluyen celulosa que tiene un segundo promedio de peso molecular en número ($^1M_{N2}$) y que tiene un segundo contenido de oxígeno ($^1O_2$) más alto que el contenido de oxígeno inicial ($^1O_1$). El segundo material (o el primer y segundo material en algunas realizaciones) puede ser, por ejemplo, combinado con una resina, tal como una resina termoplástica fundida o un microorganismo, para proveer una combinación (4) que tiene propiedades mecánicas deseables o un combustible (5).

Dichos materiales también pueden ser combinados con un sólido y/o un líquido. Por ejemplo, el líquido puede estar en la forma de una solución y el sólido puede tener forma particulada. El líquido y/o sólido pueden incluir un microorganismo, por ejemplo, una bacteria, y/o una enzima. Por ejemplo, la bacteria y/o enzima pueden trabajar sobre el material celulósico o lignocelulósico para producir un combustible, tal como etanol, o un subproducto, tal como una proteína. Los combustibles y subproductos se describen en FIBROUS MATERIALS AND COMPOSITES, USSN 11/453.951, presentada el 15 de Junio de 2006.

En algunas realizaciones, el segundo no es más del 97 por ciento más bajo del primer promedio de peso molecular en número, por ejemplo, no más del 95 por ciento, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 30, 20, 12,5, 10,0, 7,5,

5,0, 4,0, 3,0, 2,5, 2,0 o no más del 1,0 por ciento más bajo que el primer promedio de peso molecular en número. La cantidad de reducción del peso molecular dependerá de la aplicación

En algunas realizaciones en las que los materiales se usan para hacer un combustible o un coproducto, el peso molecular medio numérico inicial (antes de oxidación) es de aproximadamente 200.000 a aproximadamente 3.200.000, p. ej., de aproximadamente 250.000 a aproximadamente 1.000.000 o de aproximadamente 250.000 a aproximadamente 700.000, y el peso molecular medio numérico después de oxidación de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 200.000, p. ej., de aproximadamente 60.000 a aproximadamente 150,0 o de aproximadamente 70.000 a aproximadamente 125.000. Sin embargo, en algunas realizaciones, p. ej., después de oxidación extensa, se puede tener un peso molecular medio numérico menor que aproximadamente 10.000 o incluso menor que aproximadamente 5.000.

En algunas realizaciones, el segundo contenido de oxígeno es al menos aproximadamente cinco por ciento mayor que el primer contenido de oxígeno, por ejemplo, 7,5 por ciento mayor, 10,0 por ciento mayor, 12,5 por ciento mayor, 15,0 por ciento mayor o 17,5 por ciento mayor. En algunas realizaciones preferidas, el segundo contenido de oxígeno es al menos aproximadamente 20,0 por ciento mayor que el contenido de oxígeno del material inicial. El contenido de oxígeno se mide por análisis elemental mediante pirólisis de una muestra en un horno que trabaja a 1300 °C o superior. Un analizador de elementos adecuado es el analizador LECO CHNS-932 con un horno de alta temperatura de pirólisis VTF-900.

En algunas realizaciones, la oxidación del primer material 200 no da como resultado un cambio sustancial en la cristalinidad de la celulosa. Sin embargo, en algunos casos, por ejemplo, luego de la oxidación extrema, el segundo material tiene celulosa que tiene una cristalinidad (T_{C2}) que es más baja que la cristalinidad (T_{C1}) de la celulosa del primer material. Por ejemplo, (T_{C2}) puede ser menor que (T_{C1}) por más de aproximadamente 5 por ciento, por ejemplo, 10, 15, 20 o incluso 25 por ciento. Esto puede ser deseable para mejorar la solubilidad de los materiales en un líquido, tal como un líquido que incluye bacterias y/o una enzima.

En algunas realizaciones, el índice de cristalinidad inicial (antes de oxidación) es de aproximadamente 40 a aproximadamente 87,5 por ciento, p. ej., de aproximadamente 50 a aproximadamente 75 por ciento o de aproximadamente 60 a aproximadamente 70 por ciento, y el índice de cristalinidad después de oxidación es de aproximadamente 30 a aproximadamente 75,0 por ciento, p. ej., de aproximadamente 35,0 a aproximadamente 70,0 por ciento o de aproximadamente 37,5 a aproximadamente 65,0 por ciento. Sin embargo, en determinadas realizaciones, p. ej., después de oxidación extensa, se puede tener un índice de cristalinidad menor que 5 por ciento. En algunas realizaciones, el material después de oxidación es sustancialmente amorfo.

Sin el deseo de estar ligado a ninguna teoría en particular, se cree que la oxidación aumenta el número de grupos con puentes de hidrógeno en la celulosa, tal como grupos hidroxilos, grupos aldehídos, grupos cetona, grupos ácido carboxílicos o grupos anhídridos, que pueden aumentar su dispersibilidad y/o su solubilidad (por ejemplo, en un líquido). Para mejorar aun más la dispersibilidad en una resina, la resina puede incluir un componente que incluya grupos con puentes de hidrógeno, tal como uno o más grupos anhídridos, grupos carboxílicos, grupos hidroxilo, grupos amida, grupos amina o mezclas de cualquiera de estos grupos. En algunas realizaciones preferidas, el componente incluye un polímero copolimerizado con y/o injertado con anhídrido maleico. Dichos materiales están disponibles de DuPont bajo el nombre comercial FUSABOND®.

Generalmente, la oxidación del primer material (200) ocurre en un ambiente oxidante. Por ejemplo, la oxidación se puede afectar o ser ayudada por la pirólisis en un ambiente oxidante, tal como en aire o argón enriquecido en aire. Para ayudar en la oxidación, se pueden agregar diferentes agentes químicos, tales como oxidantes, ácidos o bases al material antes o durante la oxidación. Por ejemplo, se puede agregar un peróxido (por ejemplo, peróxido de benzoílo) antes de la oxidación.

Sistemas de oxidación

La figura 22 muestra un diagrama de flujo del procedimiento (5000) que incluye varias etapas de un sistema de pretratamiento oxidativo de materia prima. En la primera etapa (5010), se recibe un suministro de materia prima seca de una fuente de alimentación. La fuente de alimento puede incluir, por ejemplo, un lecho o contenedor de almacenamiento que se conecta a un reactor de oxidación en serie a través de una cinta transportadora u otro dispositivo de transporte de materia prima.

Como se ha descrito antes, la materia prima seca de la fuente de alimentación puede ser preprocesada antes del suministro al reactor de oxidación. Por ejemplo, si la materia prima deriva de fuentes vegetales, se pueden separar

determinadas partes del material vegetal antes de recoger el material vegetal y/o antes de suministrar el material vegetal mediante el dispositivo de transporte de materia prima. Alternativamente, o además, la materia prima de biomasa se puede someter a procesamiento mecánico (p. ej., para reducir la longitud media de las fibras en la materia prima) antes del suministro al reactor de oxidación.

5

Después del tratamiento mecánico (5020), la materia prima (5030) es transportada a un sistema de mezclado que introduce agua (5150) en la materia prima en un proceso de mezclado mecánico. La combinación del agua con la materia prima procesada en el paso de mezclado (5040) crea una suspensión de materia prima acuosa (5050), que después se puede tratar con uno o más agentes oxidantes.

10

Generalmente, se agrega un litro de agua a la mezcla por cada entre 0,02 kg y 1,0 kg de materia prima seca. La relación de materia prima y agua en la mezcla depende de la fuente de la materia prima y de los agentes oxidantes específicos usados luego en el proceso completo. Por ejemplo, en las secuencias de tratamiento industrial típicas para biomasa lignocelulósica, la suspensión de materia prima acuosa (5050) incluye entre aproximadamente 0,5 kg y

15

aproximadamente 1,0 kg de biomasa seca por litro de agua.

En algunas realizaciones, también se pueden agregar uno o más aditivos protectores de fibra 5170 a la suspensión de materia prima en el paso de mezclado de la materia prima 5040. Los aditivos protectores de fibra ayudan a reducir la degradación de ciertos tipos de fibras de biomasa (por ejemplo, fibras de celulosa) durante la oxidación de la materia prima. Los aditivos protectores de fibra que se pueden usar, por ejemplo, si un producto deseado del

20

tratamiento de una materia prima lignocelulósica incluye fibras de celulosa. Los aditivos protectores de fibra ejemplificativos incluyen compuestos de magnesio tales como hidróxido de magnesio. Las concentraciones de los aditivos protectores de fibra en la suspensión de materia prima (5050) pueden estar entre 0,1% y 0,4% del peso seco de la materia prima de biomasa, por ejemplo.

25

En algunas realizaciones, la suspensión de materia prima acuosa (5050) puede ser sometida a una extracción adicional (5180) con un disolvente orgánico para eliminar sustancias insolubles en agua de la suspensión. Por ejemplo, con la extracción de suspensión (5050) con uno o más disolventes orgánicos se obtiene una suspensión purificada y una corriente de desecho orgánico (5210) que incluye materiales insolubles en agua tales como grasas, aceites, y otras sustancias no polares, basadas en hidrocarburos. Los disolventes adecuados para realizar la extracción de la suspensión (5050) incluyen diferentes alcoholes, hidrocarburos, y halohidrocarburos, por ejemplo.

30

En algunas realizaciones, la suspensión de materia prima acuosa (5050) puede ser sometida a un tratamiento térmico opcional (5190) para preparar adicionalmente la materia prima para la oxidación. Un ejemplo de un

35

tratamiento térmico incluye el calentamiento de la suspensión de materia prima en presencia de vapor presurizado. En la materia prima de biomasa fibrosa, el vapor presurizado hincha las fibras, exponiendo una fracción más grande de superficie de la fibra al disolvente acuoso y a los agentes oxidantes que se introducen en los pasos de tratamiento posteriores.

40

En algunas realizaciones, la suspensión de materia prima acuosa (5050) puede ser sometida a un tratamiento opcional con agentes básicos (5200). El tratamiento con uno o más agentes básicos puede ayudar a separar lignina de la celulosa en la materia prima de biomasa lignocelulósica, mejorando de esta manera la posterior oxidación de la materia prima. Los agentes básicos ejemplificativos incluyen hidróxidos alcalinos y alcalinotérreos tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, e hidróxido de calcio. En general, se pueden usar una variedad de agentes

45

básicos, generalmente en concentraciones entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 0,5% del peso de la materia prima seca.

La suspensión de materia prima acuosa (5050) es transportada (por ejemplo, por un sistema de tuberías en serie) hacia una cámara, que puede ser una cámara de pretratamiento de oxidación o un reactor de oxidación. En el paso de pre-tratamiento de oxidación (5060), se agregan uno o más agentes oxidantes (5160) a la suspensión de materia prima (5050) para formar un medio oxidante. En algunas realizaciones, por ejemplo, los agentes oxidantes (5160) pueden incluir peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno se puede agregar a la suspensión (5050) como una solución acuosa, y en proporciones que varían en un rango entre 3% y entre 30% y 35% en peso de suspensión (5050). El peróxido de hidrógeno tiene varias ventajas como agente oxidante. Por ejemplo, la solución acuosa de

55

peróxido de hidrógeno es relativamente poco costosa, relativamente estable químicamente y no es particularmente peligrosa en relación con otros agentes oxidantes (y por lo tanto no requiere procedimientos complicados de manejo ni equipamiento de seguridad caro). Asimismo, el peróxido de hidrógeno se descompone para formar agua durante la oxidación de la materia prima, de modo que la limpieza de la corriente de desecho es relativamente sencilla y barata.

60

En algunas realizaciones, los agentes oxidantes (5160) pueden incluir oxígeno (por ejemplo, gas oxígeno) solo, o en combinación con peróxido de hidrógeno. El gas oxígeno puede ser burbujeado en la suspensión (5050) en proporciones que varían en un rango entre 0,5% y 10% en peso de suspensión (5050). Como alternativa, o adicionalmente, el gas oxígeno también puede ser introducido en una fase gaseosa en equilibrio con la suspensión (5050), por ejemplo, una cabeza de vapor por encima de la suspensión (5050). El gas oxígeno puede ser introducido en una cámara de pretratamiento de oxidación o en un reactor de oxidación (o en ambos), dependiendo de la configuración del sistema de tratamiento oxidante. Generalmente, por ejemplo, la presión parcial de oxígeno en el vapor por encima de la suspensión (5050) es mayor que en la presión ambiente de oxígeno, y varía en un rango entre 0,5 bar y 35 bar, dependiendo de la naturaleza de la materia prima.

El gas oxígeno puede ser introducir en forma pura, o se puede mezclar con uno o más gases vehículo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, aire con alta presión provee el oxígeno en el vapor. En algunas realizaciones, el gas oxígeno puede ser provisto continuamente a la fase vapor para asegurar que permanece una concentración de oxígeno en el vapor dentro de ciertos límites predeterminados durante el tratamiento de la materia prima. En algunas realizaciones, puede ser introducido inicialmente gas oxígeno en una concentración suficiente para oxidar la materia prima, y luego la materia prima puede ser transportada a un recipiente cerrado y presurizado (por ejemplo, un reactor de oxidación) para el proceso.

En algunas realizaciones, los agentes oxidantes (5160) pueden incluir oxígeno naciente (por ejemplo, radicales de oxígeno). Generalmente, el oxígeno naciente se produce a medida que se lo necesita en un reactor de oxidación o en una cámara con comunicación fluida con un reactor de oxidación por una o más reacciones de descomposición. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el oxígeno naciente puede ser producido a partir de una reacción entre NO y O₂ en una mezcla de gas o en solución. En algunas realizaciones, el oxígeno naciente puede ser producido a partir de la descomposición de HOCl en solución. Otros métodos por los cuales se puede producir oxígeno naciente incluyen por medio de la generación electroquímica en una solución de electrolitos, por ejemplo.

En general, el oxígeno naciente es un agente oxidante eficaz debido a la relativamente alta reactividad del radical oxígeno. Sin embargo, el oxígeno naciente también puede ser un agente oxidante relativamente selectivo. Por ejemplo, cuando la materia prima lignocelulósica es tratada con oxígeno naciente, la oxidación selectiva de la lignina se produce con preferencia respecto a otros componentes de la materia prima tal como celulosa. Como resultado, la oxidación de la materia prima con oxígeno naciente provee un método para la eliminación selectiva de la fracción lignina en ciertas materias primas. Generalmente, se usan concentraciones de oxígeno naciente de entre aproximadamente 0,5% y 5% del peso seco de la materia para provocar una oxidación eficaz.

Sin el deseo de estar ligado a cualquier teoría, se cree que el oxígeno naciente reacciona con la materia prima lignocelulósica de acuerdo con al menos dos mecanismos diferentes. En un primer mecanismo, el oxígeno naciente sufre una reacción de adicional con la lignina, que da como resultado una oxidación parcial de la lignina, el cual solubiliza la lignina en solución acuosa. Como resultado, la lignina solubilizada puede ser eliminada del resto de la materia prima por medio de lavado. En un segundo mecanismo, el oxígeno naciente afecta los enlaces de butano y/o abre los anillos aromáticos que están conectados a través de los enlaces de butano. Como resultado, aumenta la solubilidad de la lignina en solución acuosa, facilitando la separación de la fracción lignina del resto de la materia prima por medio de lavado.

En algunas realizaciones, los agentes oxidantes (5160) incluyen ozono (O₃). El uso de ozono puede introducir muchas consideraciones del manejo químico en la secuencia de tratamiento de oxidación. Si se calienta muy vigorosamente, una solución acuosa de ozono se puede descomponer violentamente, con consecuencias potencialmente adversas para los operarios humanos del sistema y para el equipamiento del sistema. Por consiguiente, el ozono generalmente es generado en un recipiente aislado térmicamente, de paredes gruesas separado del recipiente que contiene la suspensión de materia prima, y se transporta al mismo en la etapa apropiada del proceso.

Sin el deseo de estar ligado por la teoría, se cree que el ozono se descompone en oxígeno y radicales de oxígeno, y que los radicales de oxígeno (por ejemplo, oxígeno naciente) son los responsables de las propiedades oxidantes del ozono del modo que se expone más arriba. El ozono generalmente oxida preferentemente la fracción lignina en los materiales lignocelulósicos, dejando la fracción celulosa relativamente sin alterar.

Las condiciones para la oxidación basada en ozono de la materia prima de biomasa generalmente dependen de la naturaleza de la biomasa. Por ejemplo, para materia primas celulósicas y/o lignocelulósicas, las concentraciones de ozono de entre 0,1 g/m³ y 20 g/m³ de materia prima seca proveen una eficaz oxidación de la materia prima.

Generalmente, el contenido de agua en la suspensión (5050) es entre 10% en peso y 80% en peso (por ejemplo,

entre 40% en peso y 60% en peso).

Durante la oxidación en base a ozono, la temperatura de la suspensión (5050) puede mantenerse entre 0 °C y 100 °C para evitar la descomposición violenta del ozono.

5

En algunas realizaciones, la suspensión de materia prima (5050) puede ser tratada con una solución acuosa, alcalina que incluye uno o más hidróxidos alcalinos o alcalinotérreos tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, e hidróxido de calcio, y entonces tratada luego con un gas que contiene ozono en un reactor de oxidación. Se ha observado que este proceso aumenta significativamente la descomposición del material celulósico en

10

suspensión (5050). Generalmente, por ejemplo, una concentración de iones hidróxido en la solución alcalina está entre 0,001% y 10% en peso de suspensión (5050). Después de que la materia prima ha sido mojada por medio del contacto con la solución alcalina, el gas que contiene ozono se introduce en el reactor de oxidación, donde se pone en contacto y oxida la materia prima.

15

Los agentes oxidantes (5160) también pueden incluir otras sustancias. En algunas realizaciones, por ejemplo, los agentes oxidantes basados en halógenos tales como cloro y agentes de oxiclora (por ejemplo, hipoclorito) se pueden introducir en la suspensión (5050). En algunas realizaciones, las sustancias oxidantes que contienen nitrógeno se pueden introducir en la suspensión (5050). Las sustancias oxidantes que contienen nitrógeno ejemplificativas incluyen NO y NO₂, por ejemplo. Los agentes que contienen nitrógeno también pueden ser combinados con oxígeno

20

en la suspensión (5050) para crear agentes oxidantes adicionales. Por ejemplo, NO y NO₂ se combinan con oxígeno en la suspensión (5050) para formar compuestos nitrato, que son eficaces agentes oxidantes para la materia prima de biomasa. Los agentes oxidantes en base a halógeno y nitrógeno pueden, en algunas realizaciones, causar el blanqueamiento de la materia prima de biomasa, dependiendo de la naturaleza de la materia prima. El blanqueamiento puede ser deseable para ciertos productos derivados de biomasa que son extraídos en pasos de

25

tratamiento posteriores.

Otros agentes oxidantes pueden incluir, por ejemplo, diferentes peroxiacidos, ácidos peroxiacéticos, persulfatos, percarbonatos, permanganatos, tetróxido de osmio y óxidos de cromo.

30

Siguiendo al paso de pretratamiento de oxidación (5060), la suspensión de materia prima (5050) es oxidada en el paso (5070). Si los agentes oxidantes (5160) se agregan a la suspensión (5050) en un reactor de oxidación, entonces la oxidación procede en el mismo reactor. Como alternativa, si los agentes oxidantes (5160) fueron agregados a la suspensión (5050) en una cámara de pretratamiento, entonces la suspensión (5050) es transportada a un reactor de oxidación a través de un sistema de tuberías en serie. Una vez dentro del reactor de oxidación, la

35

oxidación de la materia prima de biomasa procede bajo un conjunto de condiciones ambientales controladas. Generalmente, por ejemplo, el reactor de oxidación es un recipiente cilíndrico que está cerrado al medio ambiente externo y presurizado. Tanto la operación en lote así como la continua es posible, a pesar que las condiciones ambientales son generalmente más fáciles de controlar en una operación de tratamiento en lote en serie.

40

La oxidación de la suspensión de materia prima (5050) generalmente ocurre a temperaturas elevadas en el reactor de oxidación. Por ejemplo, la temperatura de la suspensión (5050) en el reactor de oxidación generalmente se mantiene por encima de 100 °C, por ejemplo en un rango entre 120 °C y 240 °C. Para muchos tipos de materia prima de biomasa, la oxidación es particularmente eficaz si la temperatura de la suspensión (5050) se mantiene entre 150 °C y 220 °C. La suspensión (5050) puede ser calentada usando una variedad de dispositivos de

45

transferencia térmica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el reactor de oxidación está en contacto con un baño de calentamiento que incluye aceite o sales fundidas. En algunas realizaciones, una serie de tuberías de intercambio de calor rodea y está en contacto con el reactor de oxidación, y la circulación de fluido caliente en las tuberías calienta la suspensión (5050) en el reactor. Otros dispositivos de calentamiento que se pueden usar para calentar la suspensión (5050) incluyen elementos de calentamiento por resistividad, calentadores por inducción, y fuentes de

50

microondas, por ejemplo.

El tiempo de residencia de la suspensión de materia prima (5050) en el reactor de oxidación puede ser variado tal como se desee para procesar la materia prima. Generalmente, la suspensión (5050) pasa entre 1 minuto y 60 minutos sometida a la oxidación en el reactor. Para materiales de biomasa relativamente blandos tales como materia

55

lignocelulósica, el tiempo de residencia en el reactor de oxidación puede ser entre 5 minutos y 30 minutos, por ejemplo, a una presión de oxígeno de entre 3 y 12 bar en el reactor, y a una temperatura de la suspensión de entre 160 °C y 210 °C. Para otros tipos de materia prima, sin embargo, los tiempos de residencia en el reactor de oxidación pueden ser mayores, por ejemplo, tan largos como 48 horas. Para determinar los tiempos de residencia apropiados para la suspensión (5050) en el reactor de oxidación, se pueden extraer alícuotas de la suspensión

60

desde el reactor a intervalos específicos y ser analizados para determinar las concentraciones de productos

particulares de interés tales como sacáridos complejos. La información sobre el aumento en las concentraciones de ciertos productos en suspensión (5050) como una función del tiempo se puede usar para determinar los tiempos de residencia para clases particulares de material de materia prima.

- 5 En algunas realizaciones, durante la oxidación de la suspensión de materia prima (5050), se puede realizar el ajuste del pH de la suspensión por introducción de uno o más agentes químicos en el reactor de oxidación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la oxidación ocurre más eficazmente en un rango de pH de entre aproximadamente 9 y 11. Para mantener el pH en este rango, se pueden introducir en el reactor de oxidación agentes tales como hidróxidos alcalinos y alcalinotérreos, carbonatos, amoníaco, y soluciones amortiguadoras alcalinas.

10

La circulación de la suspensión (5050) durante la oxidación puede ser importante para asegurar el contacto suficiente entre los agentes oxidantes (5160) y la materia prima. La circulación de la suspensión se puede lograr usando diferentes técnicas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se puede implementar un aparato de agitación mecánica que incluye aspas impulsoras o una rueda hidráulica de paletas en el reactor de oxidación. En algunas realizaciones, el reactor de oxidación puede ser un reactor en ciclo, en el cual el disolvente acuoso en el que la materia prima está suspendida, se drena simultáneamente del fondo del reactor y se recircula en el ciclo del reactor por medio de bombeo, asegurando de esta manera que la suspensión se mezcla de nuevo continuamente y no se estanca en el reactor.

15

- 20 Después de completarse la oxidación de la materia prima, la suspensión es transportada a un aparato de separación en donde se produce un paso de separación mecánica (5080). Generalmente, el paso de separación mecánica (5080) incluye una o más etapas de filtrado cada vez más fino de la suspensión para separar mecánicamente los constituyentes sólidos y líquidos.

- 25 La fase líquida (5090) se separa de la fase sólida 5100, y las dos fases son procesadas independientemente más tarde. La fase sólida (5100) puede sufrir opcionalmente un paso de secado (5120) en un aparato de secado, por ejemplo. El paso de secado (5120) puede incluir, por ejemplo, la dispersión mecánica del material sólido material sobre una superficie de secado, y la evaporación del agua de la fase sólida (5100) por calentamiento suave del material sólido. Seguidamente al paso de secado (5120), o como alternativa, sin someterla al paso de secado (5120), la fase sólida (5100) es transportada para los pasos de tratamiento adicionales (5140).

La fase líquida (5090) puede opcionalmente sufrir un paso de secado (5110) para reducir la concentración de agua en la fase líquida. En algunas realizaciones, por ejemplo, el paso de secado (5110) puede incluir la evaporación y/o destilación y/o extracción de agua de la fase líquida (5090) por calentamiento suave del líquido. Como alternativa, o

35

adicionalmente, se pueden usar uno o más agentes de secado químico para eliminar agua de la fase líquida (5090). Seguidamente al paso de secado (5110), o como alternativa, sin someterla al paso de secado (5110), la fase líquida (5090) es transportada para los pasos de tratamiento posteriores (5130), que pueden incluir una variedad de pasos de tratamiento químicos y biológicos tales como hidrólisis química y/o enzimática.

- 40 El paso de secado (5110) crea una corriente de desecho (5220), una solución acuosa que puede incluir agentes químicos disueltos tales como ácidos y bases en concentraciones relativamente bajas. El tratamiento de la corriente de desecho (5220) puede incluir, por ejemplo, la neutralización del pH con uno o más ácidos o bases minerales. Dependiendo de la concentración de sales disueltas en la corriente de desecho (5220), la solución puede ser parcialmente desionizada (por ejemplo, por pasaje de la corriente de desecho a través de un sistema de intercambio iónico). Luego, la corriente de desecho, que incluye principalmente agua, puede ser recirculada en el proceso completo, por ejemplo, como agua (5150), desviada a otro proceso, o descargada.

45

Generalmente, para materias primas de biomasa lignocelulósicas después del paso de separación (5070), la fase líquida (5090) incluye una variedad de poli y oligosacáridos solubles, que luego pueden ser separados y/o reducidos a sacáridos de cadena pequeña por medio de pasos adicionales de tratamiento. La fase sólida (5100) generalmente incluye principalmente celulosa, por ejemplo, con cantidades menores de productos derivados de hemicelulosa y lignina.

50

En algunas realizaciones, la oxidación se puede llevar a cabo a temperatura elevadas en un reactor tal como una cámara de pirólisis. Por ejemplo, en referencia nuevamente a la figura 17, los materiales de materia prima pueden ser oxidados en un pirolizador de filamento (1712). En un uso típico, un gas vehículo oxidante, por ejemplo, aire o una mezcla de aire/argón, atraviesa por el soporte para muestra (1713) mientras que el elemento de calentamiento por resistividad rota y es calentado a una temperatura deseada, por ejemplo, 325 °C. Después de un tiempo apropiado, por ejemplo, entre 5 y 10 minutos, el material oxidado se vacía del soporte para muestra. El sistema que se muestra en la figura 17 puede ser modificado a escala y convertirse en continuo. Por ejemplo, en lugar de un

60

cable como miembro calefactor, el miembro calefactor puede ser un tornillo sinfín. El material puede caer continuamente en el soporte para muestra, golpeando un tornillo caliente que piroliza el material. Al mismo tiempo, el tornillo puede empujar el material oxidado por fuera del soporte para muestra para permitir la entrada de nuevo material no oxidado.

5

Los materiales de materia prima también pueden ser oxidados en cualquiera de los sistemas de pirólisis mostrados en las figuras 18 a 20 y descritos anteriormente en la sección Sistemas de pirólisis

En referencia nuevamente a la figura 21, los materiales de materia prima pueden ser fácilmente oxidados por recubrimiento de un filamento de tungsteno (150), junto con un oxidante, tal como un peróxido, con el material celulósico deseado al mismo tiempo que el material es albergado en una cámara de vacío (151). Para efectuar la oxidación, la corriente se hace pasar a través del filamento, la cual causa un rápido calentamiento del filamento durante el tiempo deseado. Generalmente, el calentamiento se sigue durante unos segundos antes de permitir que se enfríe el filamento. En algunas realizaciones, el calentamiento se realiza un número de veces para producir la cantidad deseada de oxidación.

15

En referencia nuevamente a la figura 12, en algunas realizaciones, los materiales de materia prima pueden ser oxidados con la ayuda de sonido y/o cavitación. Generalmente, para efectuar la oxidación, los materiales son tratados con ultrasonidos en un ambiente oxidante, tal como agua saturada con oxígeno u otro oxidante químico, tal como hidrógeno peróxido.

20

En referencia nuevamente a las figuras 9 y 10, en algunas realizaciones, se usa radiación ionizante para ayudar en la oxidación de materiales de materia prima. Generalmente, para efectuar la oxidación, los materiales son irradiados en un ambiente oxidante, tal como aire u oxígeno. Por ejemplo, se puede usar radiación gamma y/o de haz de electrones para irradiar los materiales.

25

Otros procesos

La explosión de vapor se puede usar sola o con cualquiera de los procesos descritos en la presente memoria, o en combinación con cualquiera de los procesos descritos en la misma.

30

La figura 23 muestra una vista general del proceso entero de conversión de una fuente de fibra o materia prima (400) en un producto (450), tal como etanol, por un proceso que incluye corte y explosión de vapor para producir un material fibroso (401), que luego es hidrolizado y, por ejemplo, fermentado, para generar el producto. La fuente de fibra puede ser transformada en el material fibroso (401) por medio de un número de métodos posibles, que incluyen al menos un proceso de corte y al menos un proceso de explosión de vapor.

35

Por ejemplo, una opción incluye cortar la fuente de fibra, seguido de paso(s) opcional(es) de tamizado y paso(s) opcional(es) de corte adicional(es) para producir una fuente de fibra cortada (402), que entonces se puede hacer explotar con vapor para producir el material fibroso (401). El proceso de explosión de vapor es opcionalmente seguido por un proceso de recuperación de fibra para eliminar líquidos o el "licor" (404), resultante del proceso de explosión de vapor. El material resultante de la explosión de vapor de la fuente de fibra cortada puede ser cortado adicionalmente por medio de un paso o pasos opcionales de corte adicional y/o paso o pasos opcionales de tamizado.

45

En otro método, el material fibroso (401) primero es explotado con vapor para producir una fuente de fibra explotada con vapor 410. La fuente de fibra explotada con vapor es sometida posteriormente a un proceso opcional de recuperación de fibra para eliminar líquidos, o el licor. La fuente de fibra explotada con vapor resultante puede luego ser cortada para producir el material fibroso. La fuente de fibra explotada con vapor también puede ser sometida a uno o más pasos opcionales de tamizado y/o uno o más pasos opcionales de corte adicionales. El proceso de corte y explosión de vapor de la fuente de fibra para producir el material fibroso cortado y explotado con vapor será expuesto adicionalmente más adelante.

50

La fuente de fibra puede ser cortada en pedazos o tiras de material tipo papel picado antes del corte o explosión de vapor. Los procesos de corte pueden llevarse a cabo con el material en estado seco (por ejemplo, que tiene menos de 0,25 por ciento en peso de agua absorbida), estado hidratado, o incluso cuando está parcialmente o completamente sumergido en un líquido, tal como agua o isopropanol. El proceso también puede incluir opcionalmente pasos de secado de la salida después de la explosión de vapor o corte para permitir los pasos adicionales de corte en seco o explosión de vapor. Los pasos de corte, tamizado, y explosión de vapor pueden tener lugar con o sin la presencia de diferentes soluciones químicas.

60

En un proceso de explosión de vapor, la fuente de fibra o la fuente de fibra cortada se pone en contacto con vapor bajo alta presión, y el vapor difunde por dentro de las estructuras de la fuente de fibra (por ejemplo, las estructuras lignocelulósicas). El vapor luego se condensa bajo alta presión "mojando" de este modo la fuente de fibra. La humedad en la fuente de fibra puede hidrolizar cualquier grupo acetilo en la fuente de fibra (por ejemplo, los grupos acetilo en las fracciones de hemicelulosa), formando ácidos orgánicos tales como ácidos acético y urónico. Los ácidos, por otro lado, pueden catalizar la despolimerización de la hemicelulosa, liberando xilano y cantidades limitadas de glucano. La fuente de fibra "mojada" (o fuente de fibra cortada, etc.) es luego "explotada" cuando se libera la presión. La humedad condensada instantáneamente se evapora debido a la disminución súbita en la presión y la expansión del vapor de agua ejerce una fuerza de corte (o fuente de fibra cortada, etc.). Una fuerza de corte suficiente causará la ruptura mecánica de las estructuras internas (por ejemplo, las estructuras lignocelulósicas) de la fuente de fibra.

El material fibroso cortado y explotado con vapor es luego convertido en un producto útil, tal como etanol. En algunas realizaciones, el material fibroso es convertido en un combustible. Un método para convertir el material fibroso en un combustible es por hidrólisis para producir azúcares fermentables (412), que posteriormente se fermentan para producir el producto.

También pueden usarse otros métodos conocidos y desconocidos para convertir los materiales fibrosos en combustibles.

En algunas realizaciones, antes de la combinación con el microorganismo, el material fibroso cortado y explotado con vapor (401) se esteriliza para matar cualquier microorganismo competitivo que pudiese estar en el material fibroso. Por ejemplo, el material fibroso se puede esterilizar por exposición del material fibroso a radiación, tal como radiación infrarroja, radiación ultravioleta, o una radiación ionizante, tal como radiación gamma. Los microorganismos también pueden ser matados usando esterilizantes químicos, tales como lejía (por ejemplo, hipoclorito de sodio), clorhexidina, u óxido de etileno.

Un método para hidrolizar el material fibroso cortado y explotado con vapor es por el uso de celulasas. Las celulasas son un grupo de enzimas que actúan sinérgicamente para hidrolizar celulosa. También se puede usar el complejo de enzimas Accellerase® 1000 disponible comercialmente, el cual contiene un complejo de enzimas que reduce el material de biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables.

Según el entendimiento actual, los componentes de celulasa incluyen endoglucanasas, exoglucanasas (celobiohidrolasas), y b-glucosidasas (celobiasas). El sinergismo entre los componentes de celulasa existe cuando la hidrólisis por una combinación de dos o más componentes excede la suma de las actividades expresadas por los componentes individuales. El mecanismo de acción generalmente aceptado de un sistema celulasa (particularmente de *T. longibrachiatum*) sobre celulosa cristalina es: que la endoglucanasa hidroliza los enlaces internos β -1,4-glicosídicos de las regiones amorfas, aumentando de este modo el número de extremos no reductores expuestos. Las exoglucanasas luego cortan las unidades de celobiosa de los extremos no reductores, que por otra lado son hidrolizados a unidades de glucosa individuales por b-glucosidasas. Hay varias configuraciones de endo y exoglucanasas que difieren en las estereoespecificidades. En general, la acción sinérgica de los componentes en diferentes configuraciones se requiere para la óptima hidrólisis de la celulosa. Las celulasas, sin embargo, son más propensas a hidrolizar las regiones amorfas de celulosa. Existe una relación lineal entre la cristalinidad y la velocidad de hidrólisis en donde un mayor índice de cristalinidad se corresponde con menores velocidades de hidrólisis enzimática. Las regiones amorfas de la celulosa se hidrolizan al doble de velocidad que las regiones cristalinas. La hidrólisis del material fibroso cortado y explotado con vapor se puede llevar a cabo por cualquier proceso de hidrólisis de biomasa.

La explosión de vapor de biomasa algunas veces causa la formación de subproductos, por ejemplo, tóxicos, que son inhibitorios para las actividades microbianas y enzimáticas. El proceso de convertir el material fibroso cortado y explotado con vapor en un combustible puede por lo tanto incluir opcionalmente un paso de tratamiento con hidróxido de calcio antes de la fermentación para precipitar parte de los tóxicos. Por ejemplo, el pH del material fibroso cortado y explotado con vapor se puede aumentar para exceder el pH de 10 por agregado de hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) seguido por un paso de disminución de pH y aproximadamente 5 por agregado de H_2SO_4 . El material fibroso tratado puede luego ser usado como si no tuviese la eliminación de precipitados. Como se muestra en la figura 23, el paso opcional de tratamiento con hidróxido de calcio ocurre justo antes del paso de hidrólisis del material fibroso cortado y explotado con vapor, pero también se contempla la realización del paso de tratamiento con hidróxido de calcio luego del paso de hidrólisis y antes del paso de fermentación.

La figura 24 describe un ejemplo de un aparato de explosión de vapor (460). El aparato de explosión de vapor (460) incluye una cámara de reacción (462), en la cual la fuente de fibra y/o el material fibroso colocado a través de una entrada de fuente de fibra (464). La cámara de reacción se sella por cerrado de la válvula de entrada de la fuente de fibra (465). La cámara de reacción además incluye una entrada de vapor presurizada (466) que incluye una válvula de vapor (467). La cámara de reacción además incluye una salida de despresurización explosiva (468) que incluye una válvula de salida (469) en comunicación con el ciclón (470) a través de la tubería de conexión (472). Una vez que la cámara de reacción contiene la fuente de fibra y/o la fuente de fibra cortada y se sella por cerrado de las válvulas (465, 467 y 469), el vapor se envía dentro de la cámara de reacción (462) por apertura de la válvula de entrada de vapor (467) permitiendo que el vapor viaje a través de la salida de vapor (466). Una vez que la cámara de reacción alcanza la temperatura blanco, que puede tomar aproximadamente entre 20 y 60 segundos, comienza el tiempo de retención. La cámara de reacción se mantiene a la temperatura blanco durante el tiempo de retención deseado, que generalmente dura entre aproximadamente 10 segundos y 5 minutos. Al final del período de tiempo de retención, se abre la válvula de salida para permitir que ocurra la despresurización explosiva. El proceso de despresurización explosiva impulsa los contenidos de la cámara de reacción (462) hacia afuera de la salida de despresurización explosiva (468), a través de la tubería de conexión (472) y dentro del ciclón (470). La fuente de fibra explotada con vapor o material fibroso entonces sale del ciclón en una forma de sedimento fangoso hacia el depósito de recolección (474) tanto como el vapor remanente sale del ciclón hacia la atmósfera a través de la salida de ventilación (476). El aparato de explosión de vapor además incluye la salida de lavado (478) con una válvula de salida de lavado (479) en comunicación con la tubería de conexión (472). La válvula de salida de lavado (479) está cerrada durante el uso del aparato de explosión de vapor (460) para la explosión de vapor, pero abierta durante el lavado de la cámara de reacción (462).

El objetivo de temperatura de la cámara de reacción (462) está preferentemente entre 180 y 240 grados Celsius o entre 200 y 220 grados Celsius. El tiempo de retención está preferentemente entre 10 segundos y 30 minutos, o entre 30 segundos y 10 minutos, o entre 1 minuto y 5 minutos.

Debido a que el proceso de explosión de vapor da como resultado un sedimento fangoso de material fibroso explotado con vapor, el material fibroso explotado con vapor puede opcionalmente incluir un proceso de recuperación de fibra en donde se separa el "licor" del material fibroso explotado con vapor. Este paso de recuperación de fibra es útil ya que permite los procesos de corte y/o tamizado adicionales y puede permitir la conversión del material fibroso en un combustible. El proceso de recuperación de fibra ocurre por medio del uso de una tela de malla para separar las fibras del licor. También se pueden incluir otros procesos de secado para preparar el material fibroso o fuente de fibra explotada con vapor para el tratamiento posterior.

35 **Irradiación combinada, dispositivos de pirólisis, ultrasonidos y/u oxidación**

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

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

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

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

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

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

10

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

15

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

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

30

35

Procedimientos primarios

Fermentación

40 En general, varios microorganismos pueden producir una variedad de productos útiles, tales como un combustible, al operar sobre, por ejemplo, fermentar los materiales. Por ejemplo, alcoholes, ácidos orgánicos, hidrocarburos, hidrógeno, proteínas o mezclas de cualquiera de estos materiales pueden producirse mediante fermentación u otros procesos.

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

50 Para ayudar a la ruptura de los materiales que incluye la celulosa, se pueden utilizar una o más enzimas, por ejemplo, una enzima celulolítica. En algunas realizaciones, los materiales que incluyen la celulosa son tratados primero con la enzima, por ejemplo, por combinación del material y la enzima en una solución acuosa. Este material puede ser luego combinado con el microorganismo. En otras realizaciones, los materiales que incluyen la celulosa, se combinan con una o más enzimas y el microorganismo al mismo tiempo, por ejemplo, por combinación en una solución acuosa.

55

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

60

Durante la fermentación, los azúcares liberados por la hidrólisis celulolítica o la etapa de sacarificación se fermentan, p. ej., en etanol, mediante un microorganismo de fermentación tal como levadura. Los microorganismos de fermentación adecuados tienen la capacidad de convertir hidratos de carbono, tales como glucosa, xilosa, arabinosa, manosa, galactosa, oligosacáridos o polisacáridos, en productos de fermentación. Los microorganismos 5 fermentadores incluyen cepas del género *Saccharomyces* spp., por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* (levaduras de panadería), *Saccharomyces distaticus*, *Saccharomyces uvarum*, del género *Kluyveromyces*, por ejemplo, especies *Kluyveromyces marxianus*, y *Kluyveromyces fragilis* del género *Candida*, por ejemplo, *Candida pseudotropicalis*, y *Candida brassicae*, *Pichia stipitis* (relacionada con *Candida shehatae*), del género *Clavispora*, por ejemplo, especies *Clavispora lusitanae* y *Clavispora opuntiae* del género *Pachysolen*, por ejemplo, especies *Pachysolen tannophilus*, 10 del género *Bretanomyces*, por ejemplo, especies *Bretanomyces clausenii* (Philippidis, G.P. 1996, *Celulose Bioconversion Technology*, en *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C.E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212).

La levadura disponible en el comercio incluye, por ejemplo, Red Star®/Lesaffre Etanol Red (disponible en Red 15 Star/Lesaffre, EE. UU.) FALI® (disponible en Fleischmann's Yeast, una rama de Burns Philip Food Inc., EE. UU.), SUPERSTART® (disponible en Alltech), GERT STRAND® (disponible en Gert Strand AB, Suecia) y FERMOL® (disponible en DSM Specialties).

Las bacterias que pueden fermentar biomasa en etanol y otros productos incluyen, p. ej., *Zymomonas mobilis* y 20 *Clostridium thermocellum* (Philippidis, 1996, véase antes). Leschine et al. (*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002, **52**, 1155-1160) aisló una bacteria anaeróbica, mesofílica, celulolítica del suelo de bosques, *Clostridium phytofermentans* sp. nov., que convierte celulosa a etanol.

La fermentación de biomasa en etanol y otros productos, se puede llevar a cabo usando ciertos tipos de 25 microorganismos termófilos o genéticamente modificados, tal como especies de termoanaerobiobacterias, incluyendo *T. mathranii*, y especies de levaduras, tales como *Pichia* species. Un ejemplo de una cepa de *T. Mathranii* es A3M4 descrita en Sonne-Hansen et al. (*Applied Microbiology and Biotechnology* 1993, 38, 537-541) o Ahring et al. (*Arch. Microbiol.* 1997, 168, 114-119).

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

35 Las enzimas que degradan biomasa, tal como celulosa, a materiales de menor peso molecular que contienen hidratos de carbono, tal como glucosa, durante la sacarificación son referidas como enzimas celulolíticas o celulasas. Estas enzimas pueden ser un complejo de enzimas que actúan en forma sinérgica para degradar celulosa cristalina. Los ejemplos de enzimas celulolíticas incluyen: endoglucanasas, celobiohidrolasas y celobiasas (β-glucosidasas). Un sustrato celulósico es hidrolizado inicialmente por endoglucanasas en posiciones al azar 40 produciendo intermediarios oligoméricos. Estos intermediarios son entonces sustratos para glucanasas de exohidrólisis tal como celobiohidrolasa para producir celobiosa de los extremos del polímero de celulosa. La celobiosa es un dímero de glucosa soluble en agua con unión β-1,4. Finalmente la celobiasa rompe la celobiosa para producir glucosa.

45 Una celulasa tiene la capacidad de degradar biomasa y puede ser de origen fúngico o bacteriano. Las enzimas adecuadas incluyen celulasas del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, *Chrysosporium* y *Trichoderma*, e incluye 5 especies de *Humicola*, *Coprinus*, *Thielavia*, *Fusarium*, *Myceliophthora*, *Acremonium*, *Cephalosporium*, *Scytalidium*, *Penicillium* o *Aspergillus* (véase, por ejemplo, EP 458162), especialmente aquellas producidas por una cepa seleccionada de las especies *Humicola insolens* (reclasificada 50 como *Scytalidium thermophilum*, véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. n° 4.435.307), *Coprinus cinereus*, *Fusarium oxysporum*, *Myceliophthora thermophila*, *Meripilus giganteus*, *Thielavia terrestris*, *Acremonium* sp., *Acremonium persicinum*, *Acremonium acremonium*, *Acremonium brachypenum*, *Acremonium dichromosporum*, *Acremonium obclavatum*, *Acremonium pinkertoniae*, *Acremonium roseogriseum*, *Acremonium incoloratum*, y *Acremonium furatum*, preferentemente de las especies *Humicola insolens* DSM 1800, *Fusarium oxysporum* DSM 2672, *Myceliophthora thermophila* CBS 117,65, *Cephalosporium* sp. RYM-202, *Acremonium* sp. CBS 478,94, 55 *Acremonium* sp. CBS 265,95, *Acremonium persicinum* CBS 169,65, *Acremonium acremonium* AHU 9519, *Cephalosporium* sp. CBS 535,71, *Acremonium brachypenum* CBS 866,73, *Acremonium dichromosporum* CBS 683,73, *Acremonium obclavatum* CBS 311,74, *Acremonium pinkertoniae* CBS 157,70, *Acremonium roseogriseum* CBS 134,56, *Acremonium incoloratum* CBS 146,62, y *Acremonium furatum* CBS 299.70H. Las enzimas celulolíticas

también se pueden obtener de *Chrysosporium*, preferentemente una cepa de *Chrysosporium lucknowense*. Adicionalmente, también se puede usar *Trichoderma* (particularmente *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei* y *Trichoderma koningii*), *Bacillus* alcalofílicos (véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. n° 3.844.890 y EP 458162), y *Streptomyces* (véase, por ejemplo, EP 458162). La bacteria, *Saccharophagus degradans*, produce una mezcla de
5 enzimas con capacidad de degradar un rango de materiales celulósicos y se puede usar en este proceso.

Las bacterias celulolíticas anaeróbicas también han sido aisladas del suelo, por ejemplo, una especie celulolíticas nueva de *Clostridium*, *Clostridium phytofermentans* sp. nov. (véase Leschine et. al, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2002), 52, 1155-1160).

10 También se pueden usar las enzimas celulolíticas usando tecnología recombinante (véase, por ejemplo, WO 2007/071818 y WO 2006/110891).

Las enzimas celulolíticas usadas pueden ser producidas por fermentación de las cepas microbianas mencionadas
15 anteriormente en un medio de nutrición que contiene fuentes adecuadas de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos en la técnica (véase, por ejemplo, Bennett y LaSure, L. (eds.), *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press, CA 1991). Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar de acuerdo con composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Los rangos de temperatura y otras condiciones adecuadas para el crecimiento y producción de celulasa
20 son conocidos en la técnica (véase Bailey, J.E. y Ollis, D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill Book Company, NY, 1986).

El tratamiento de celulosa con celulasa generalmente se lleva a cabo a temperaturas entre 30 °C y 65 °C. Las
25 celulasas son activas en un rango de pH de aproximadamente entre 3 y 7. Un paso de sacarificación puede durar por ejemplo, hasta 120 horas. La dosificación de enzima celulasa alcanza un nivel suficientemente alto de conversión de celulosa. Por ejemplo, una dosificación de celulasa apropiada es generalmente entre 5,0 y 50 Unidades de Papel de Filtro (FPU o IU) por gramo de celulosa. La FPU es una medida estándar y se define y se mide de acuerdo a Ghose (1987, *Pure and Appl. Chem.* 59:257-268).

30 Se pueden usar fermentadores móviles, como se describe en la solicitud de patente provisional de EE. UU. n° de serie 60/832.735, ahora solicitud internacional publicada n° WO 2008/011598.

Gasificación

35 Adicionalmente al uso de pirólisis para el pretratamiento de materia prima, también se puede usar la pirólisis para procesar la materia prima pretratada para extraer materiales útiles. En particular, se puede emplear una forma de pirólisis conocida como gasificación para generar gases combustibles junto con otros productos gases, líquidos y sólidos. Para realizar la gasificación, la materia prima pre tratada se introduce en la cámara de pirólisis y se calienta a alta temperatura, generalmente 700 °C o más. La temperatura usada depende de un número de factores,
40 incluyendo la naturaleza de la materia prima y de los productos deseados.

También se agregan cantidades de oxígeno (por ejemplo, como gas oxígeno puro y/o como aire) y vapor (por ejemplo, vapor supercalentado) a la cámara de pirólisis para facilitar la gasificación. Estos compuestos reaccionan con el material de materia prima que contiene carbono en una reacción de múltiples pasos para generar una mezcla
45 de gases llamada gas de síntesis (o "singas"). Esencialmente, durante la gasificación, se introduce una cantidad limitada de oxígeno en la cámara de pirólisis para permitir que parte del material de materia prima entre en combustión para formar monóxido de carbono y generar calor de proceso. El calor de proceso puede ser luego usado para promover una segunda reacción que convierte material de materia prima adicional a hidrógeno y monóxido de carbono.

50 En un primer paso de la reacción total, el calentamiento del material de materia prima produce un carbón que puede incluir una gran variedad de diferentes especies basadas en hidrocarburos. Ciertos materiales volátiles pueden ser producidos (por ejemplo, ciertos materiales hidrocarburos gaseosos), dando como resultado una reducción del peso total del material de materia prima. Luego, en un segundo paso de la reacción, parte del material volátil que se
55 produjo en el primer paso reacciona con oxígeno en una reacción de combustión para producir monóxido de carbono y dióxido de carbono. La reacción de combustión libera calor, el cual promueve el tercer paso de la reacción. En el tercer paso, el dióxido de carbono y el vapor (por ejemplo, agua) reaccionan con el carbón generado en el primer paso para formar monóxido de carbono y gas hidrógeno. El monóxido de carbono también puede reaccionar con el vapor, en una reacción de desplazamiento de agua, para formar dióxido de carbono y gas hidrógeno adicional.

60

La gasificación se puede usar como un proceso principal para generar productos directamente a partir de materia prima pre-tratada para el posterior transporte y/o venta, por ejemplo. Como alternativa, o adicionalmente, la gasificación se puede usar como un proceso auxiliar para la generación de combustible para un sistema de tratamiento completo. El singas rico en hidrógeno que es generado por medio del proceso de gasificación se puede quemar, por ejemplo, para generar electricidad y/o calor de proceso que se puede dirigir para usar en otros puntos del sistema de tratamiento. Como resultado, el sistema de tratamiento total puede ser al menos parcialmente autosustentable. También se puede obtener una variedad de otros productos, incluyendo aceites de pirólisis y sustancias gaseosas en base a hidrocarburos, durante y/o luego de la gasificación; estos pueden ser separados y almacenados o transportados como se desee.

Una variedad de diferentes cámaras de pirólisis son adecuadas para la gasificación de la materia prima pre-tratada, incluyendo las cámaras de pirólisis descritas en la presente memoria. En particular, los sistemas reactores de lecho fluidizado, en los cuales la materia prima pretratada es fluidizada en vapor y oxígeno/aire, proveen un rendimiento relativamente alto y una recuperación sencilla de productos. El carbón sólido que permanece tras la gasificación en un sistema de lecho fluidizado (o en otras cámaras de pirólisis) puede ser quemado para generar calor de proceso adicional para promover las reacciones de gasificación posteriores.

POSTPROCESAMIENTO

20 Destilación

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

35 Tratamiento de aguas de desecho

El tratamiento de aguas de desecho se usa para minimizar los requerimientos agua de compensación de la planta por tratamiento del agua de proceso para el reuso en la planta. El tratamiento de agua de desecho también puede producir combustible (por ejemplo, sedimento fangoso y biogás) que se puede usar para mejorar la eficacia total del proceso de producción de etanol. Por ejemplo, como se describe con mayor detalle más adelante, el sedimento fangoso y el biogás se pueden usar para crear vapor y electricidad que se pueden usar en diferentes procesos de la planta.

El agua de desecho es inicialmente bombeada a través de una rejilla (por ejemplo, una rejilla de barras) para eliminar partículas grandes, que son recolectadas en una tolva. En algunas realizaciones, las partículas grandes se envían a un área de residuos. Adicionalmente o como alternativa, las partículas grandes se queman para crear vapor y/o electricidad como se describe con en detalle más adelante. En general, el espacio en la rejilla de barras es entre 1/4 de pulgada y 1 pulgada de separación (por ejemplo, 1/2 pulgada de separación).

El agua de desecho luego fluye hasta un tanque de estabilización, donde la concentración orgánica del agua de desecho se equilibra durante un tiempo de retención. En general, el tiempo de retención es entre 8 horas y 36 horas (por ejemplo, 24 horas). Se dispone un mezclador en el tanque para agitar los contenidos del tanque. En algunas realizaciones, se usan mezcladores dispuestos a lo largo del tanque para agitar los contenidos del tanque. En algunas realizaciones, el mezclador sustancialmente mezcla los contenidos del tanque de estabilización de modo que las condiciones (por ejemplo, concentración y temperatura del agua de desecho) a través del tanque sean uniformes.

Una primera bomba mueve el agua del tanque de estabilización a través de un intercambiador de calor líquido a líquido. El intercambio de calor es controlado (por ejemplo, por control de la velocidad de flujo del fluido a través del intercambio de calor) de modo que el agua de desecho que sale del intercambiador de calor sea a una temperatura

deseada para el tratamiento anaeróbico. Por ejemplo, la temperatura deseada para el tratamiento anaeróbico puede ser entre 40 °C y 60°C.

- Luego de salir del intercambiador de calor intercambiador de calor, el agua de desecho entra a uno o más reactores anaeróbicos. En algunas realizaciones, la concentración de sedimento fangoso en cada reactor anaeróbico es la misma que la concentración total de sedimento fangoso en el agua de desecho. En otras realizaciones, el reactor anaeróbico tiene una concentración más alta de sedimento fangoso que la concentración total de sedimento fangoso en el agua de desecho.
- 10 Se mide y agrega una solución nutriente que contiene nitrógeno y fósforo dentro de cada reactor anaeróbico que contiene agua de desecho. La solución nutriente reacciona con el sedimento fangoso en el reactor anaeróbico para producir biogás el cual puede contener 50% de metano y tiene un valor térmico de aproximadamente 12.000 unidades térmicas británica, o Btu, por libra). El biogás sale de cada reactor anaeróbico a través de una salida de ventilación y fluye en un colector, donde varias corrientes de biogás se combinan en una única corriente. Un
- 15 compresor mueve la corriente de biogás a una caldera o un motor de combustión como se describe en detalle más adelante. En algunas realizaciones, el compresor también mueve la única corriente de biogás a través de un catalizador de desulfurización. Adicionalmente o como alternativa, el compresor puede mover la única corriente de biogás a través de un colector de sedimentos.
- 20 Una segunda bomba mueve el efluente anaeróbico de los reactores anaeróbicos a uno o más reactores aeróbicos (por ejemplo, reactores de sedimento fangoso activado). Un aireador se dispone en cada reactor aeróbico para mezclar el efluente anaeróbico, sedimento fangoso, y oxígeno (por ejemplo, oxígeno contenido en aire). En cada reactor aeróbico, la oxidación de material celular en el efluente anaeróbico produce dióxido de carbono, agua, y amoníaco.
- 25 El efluente aeróbico se mueve (por ejemplo, por gravedad) a un separador, donde se separa el sedimento fangoso del agua tratada. Parte del sedimento fangoso se hace regresar a uno o más reactores aeróbicos para crear un sedimento fangoso de concentración elevada en los reactores aeróbicos, facilitando de este modo la ruptura aeróbica del material celular en el agua de desecho. Una cinta transportadora elimina el exceso de sedimento
- 30 fangoso del separador. Como se describe en detalle más adelante, el sedimento fangoso exceso se usa como combustible para crear vapor y/o electricidad.
- El agua tratada se bombea del separador a un depósito de deposición. Los sólidos disperses en el agua tratada se deposita en el fondo del depósito de deposición y son eliminados posteriormente. Tras el período de deposición, el
- 35 agua tratada se bombea del tanque de deposición a través de un filtro fino para eliminar cualquier sólido adicional remanente en el agua. En algunas realizaciones, se agrega cloro al agua tratada para matar las bacterias patógenas. En algunas realizaciones, se usan una o más técnicas de separación físico-químicas para purificar el agua tratada. Por ejemplo, el agua tratada puede ser bombeada a través de un reactor de adsorción a carbono. Como otro ejemplo, el agua tratada se puede bombear a través de un reactor de osmosis reversa.
- 40 En los procesos descritos en la presente memoria, siempre que se use agua en cualquier proceso, puede ser agua residuales domésticas, por ejemplo, aguas residuales municipales, aguas negras. En algunas realizaciones, las aguas residuales o negras se esterilizan antes del uso. La esterilización puede realizarse por cualquier técnica deseada, por ejemplo por irradiación, vapor, o esterilización química.

45 **Combustión de residuos**

- La producción de alcohol a partir de biomasa puede dar como resultado la producción de diferentes corrientes subproductos útiles para la generación de vapor y electricidad para ser usado en otras partes de la planta. Por
- 50 ejemplo, el vapor generado del quemado de la corriente de subproductos se puede usar en el proceso de destilación. Como otro ejemplo, la electricidad generada del quemado de las corrientes de subproductos se puede usar para alimentar los generadores de haz de electrones y transductores ultrasónicos usados en pre-tratamiento.

- Los subproductos usados para generar vapor y electricidad son derivados de un número de fuentes a través del
- 55 proceso. Por ejemplo, la digestión anaeróbica del agua de desecho produce un biogás con alto contenido de metano y una pequeña cantidad de biomasa de desecho (sedimento fangoso). Como otro ejemplo, los sólidos postdestilado (por ejemplo, lignina no convertida, celulosa, y hemicelulosa remanentes del pretratamiento y procesos principales) se pueden usar como combustible.

- 60 El biogás se desvía a un motor de combustión conectado a un generador eléctrico para producir electricidad. Por

ejemplo, el biogás se puede usar como fuente de combustible para un motor de gas natural encendido por chispa. Como otro ejemplo, el biogás se puede usar como fuente de combustible para un motor de gas natural de inyección directa. Como otro ejemplo, el biogás se puede usar como fuente de combustible para una turbina de combustión. Adicionalmente o como alternativa, el motor de combustión se puede configurar con una configuración de
 5 cogeneración. Por ejemplo, el calor de desecho del motor de combustión se puede usar para proveer agua caliente o vapor a través de la planta.

El sedimento fangoso y los sólidos post-destilado se queman para calentar agua que fluye a través de un intercambiador de calor. En algunas realizaciones, el agua que fluye a través del intercambiador de calor se evapora
 10 y se supercalienta hasta vapor. En algunas realizaciones, el vapor se usa en el reactor de pre-tratamiento y en el intercambio de calor en los procesos de destilación y evaporación. Adicionalmente o como alternativa, el vapor se expande para alimentar una turbina de vapor de etapas múltiples conectada a un generador eléctrico. El vapor que sale de la turbina de vapor se condensa con agua refrigerante y regresa al intercambiador de calor para el recalentamiento del vapor. En algunas realizaciones, la velocidad de flujo de agua a través del intercambiador de
 15 calor se controla para obtener una salida de electricidad blanco de la turbina de vapor conectada a un generador eléctrico. Por ejemplo, el agua se puede agregar al intercambiador de calor para asegurar que la turbina de vapor está trabajando por encima de las condiciones umbrales (por ejemplo, la turbina gira lo suficientemente rápido para girar el generador eléctrico).

20 Aunque se han descrito determinadas realizaciones, son posibles otras realizaciones.

Como un ejemplo, aunque el biogás se describe como siendo desviado hacia una turbina de combustión conectada a un generador eléctrico, en algunas realizaciones, puede pasar a través de un mejorador de combustible para producir hidrógeno. A continuación, el hidrógeno es convertido a electricidad por medio de una celda de combustible.

25 Como otro ejemplo, aunque el biogás se describe como siendo quemado aparte del sedimento fangoso y de los sólidos postdestilado, en algunas realizaciones, todos los subproductos de desecho pueden ser quemados juntos para producir vapor.

30 **PRODUCTOS / COPRODUCTOS**

Alcoholes

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

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

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

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

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

60

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

Las estrategias del bioetanol se describen, p. ej., por DiPardo en *Journal of Outlook for Biomass Ethanol Production and Demand (EIA Forecasts)*, 2002; Sheehan en *Biotechnology Progress*, 15:8179, 1999; Martin en *Enzyme Microbes Technology*, 31:274, 2002; Greer en *BioCycle*, 61-65, Abril 2005; Lynd en *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66:3, 506-577, 2002; Ljungdahl et al. en la patente de EE. UU. n° 4.292.406; y Bellamy en la patente de EE. UU. n° 4.094.742.

Ácidos orgánicos

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

Productos alimenticios

En algunas realizaciones, toda o una porción del proceso de fermentación puede ser interrumpido antes de que el material celulósico es completamente convertido a etanol. Los productos intermediarios de la fermentación incluyen altas concentraciones de azúcar e hidratos de carbono. Los productos intermediarios de la fermentación pueden ser usados en la preparación de alimentos para consumo humano o animal. En algunas realizaciones, el pretratamiento de irradiación del material celulósico dará productos intermedios estériles de la fermentación (por ejemplo, adecuado para consumo humano). En algunas realizaciones, los productos de intermedios de fermentación requerirán procesamiento posterior previo a su uso como alimento. Por ejemplo, un secador puede ser usado para remover humedad de los productos intermedios de la fermentación para facilitar su almacenamiento, manejo y vida útil de almacenamiento. Adicionalmente o alternativamente, los productos intermedios de la fermentación pueden molerse a un tamaño de partícula en un molino de laboratorio de acero inoxidable para producir una sustancia similar a harina.

Alimentación animal

Los granos de destilación y los solubles pueden convertirse en subproductos valiosos del proceso de destilación-deshidratación. Después del proceso de destilación-deshidratación, los granos de destilación y los solubles pueden secarse para mejorar la capacidad de almacenar y manejar el material. Los granos de destilador secos resultantes y solubles (DDGS) son bajos en almidón, altos en grasa, altos en proteína, altos en fibra y altos en fósforo. Así, por ejemplo, los DDGS pueden ser valiosos como fuente de alimentación animal (por ejemplo, como fuente de alimentación de ganado diaria). Los DDGS pueden ser subsecuentemente combinados con aditivos nutritivos para alcanzar los requerimientos específicos de categorías de animales (por ejemplo, para equilibrar lisina y fósforo digerible para dietas porcinas).

Productos farmacéuticos

Los procesos de pretratamiento discutidos anteriormente pueden ser aplicados a plantas con propiedades medicinales. En algunas realizaciones, los ultrasonidos pueden estimular la bioactividad y/o biodisponibilidad de los componentes medicinales de las plantas con propiedades medicinales. Adicional o alternativamente, la irradiación estimula la bioactividad y/o la biodisponibilidad de los componentes medicinales de las plantas con propiedades medicinales. Por ejemplo, el tratamiento con ultrasonidos y la irradiación pueden combinarse en el pretratamiento de la corteza de sauce para estimular la producción de salicina.

Nutricéuticos

En algunas realizaciones, los productos intermedios de la fermentación (por ejemplo, productos que incluyen altas concentraciones de azúcar e hidratos de carbono) pueden ser suplementados para crear un nutricéutico. Por ejemplo, los productos intermedios de la fermentación pueden ser suplementados con calcio para crear un nutricéutico que provee energía y ayuda a mejorar o mantener la fortaleza de los huesos.

Coproductos***Residuo de lignina***

- 5 Tal como se describe anteriormente, los residuos que contienen lignina de los procesos primarios y de pretratamiento tienen un valor como un combustible de energía alta/media y se pueden usar para generar potencia y vapor para el uso en procesos de la planta. Sin embargo, dichos residuos de lignina son un nuevo tipo de combustibles sólidos y hay poca demanda por ellos fuera de los límites de la planta, y los costes de secarlos para el
- 10 transporte solo restan su valor potencial. En algunos casos, la gasificación de los residuos de lignina puede convertirlo a un producto con mayor valor con menores costes.

Otros subproductos

- 15 La materia celular, furfural y ácido acético han sido identificados como subproductos potenciales de las instalaciones de tratamiento de biomasa a combustible. La materia celular intersticial podría ser valiosa, pero podría requerir una purificación significativa. Los mercados para furfural y ácido acético existen, a pesar que es improbable que sean lo suficientemente grandes para consumir la producción de una industria de lignocelulosa a etanol completamente comercializada.

20 **EJEMPLOS**

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

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

- Se obtuvo una carga de 1500 libras de cartones de zumo de 0,5 galones hechos de cartón Kraft blanco polirrevestido no impreso que tenía una densidad aparente de 20 lb/ft³, de International Paper. Cada cartón se dobló plano, y después se alimentó a una desmenuzadora 3 hp Flinch Baugh a una velocidad de aproximadamente 15 a
- 30 20 libras por hora. La desmenuzadora estaba equipada con dos palas rotatorias de 12 pulgadas, dos palas fijas y un tamiz de descarga de 0,30 pulgadas. El hueco entre las palas rotatorias y las fijas se ajustó a 0,10 pulgadas. El resultado de la desmenuzadora parecía confeti que tenía una anchura entre 0,1 pulgadas y 0,5 pulgadas, una longitud de entre 0,25 pulgadas y 1 pulgada y un espesor equivalente al del material de partida (aproximadamente 0,075 pulgadas).

- 35 El material de tipo confeti se alimentó a una cortadora de cuchillas rotativas Munson, modelo SC30. El modelo SC30 está equipado con 4 palas rotatorias, 4 palas fijas y un tamiz de descarga que tenía aberturas de 1/8 pulgadas. El hueco entre las palas rotatorias y las fijas se estableció en 0,020 pulgadas. La cortadora de cuchillas rotativas desmenuzó los trozos de tipo confeti por los bordes de las cuchillas, desgarrando y liberando un material fibroso a
- 40 una velocidad de aproximadamente 1 libra por hora. El material fibroso tenía una superficie específica BET de 0,9748 m²/g +/- 0,0167 m²/g, una porosidad de 89,0437 por ciento y una densidad aparente (@0,53 psia) de 0,1260 g/ml. Una longitud media de las fibras era 1,141 mm y una anchura media de las fibras era 0,027 mm, dando una relación L/D media de 42:1. Se muestra una micrografía electrónica de barrido del material fibroso en la figura 26 con 25 X aumentos.

45 **Ejemplo 2 - Preparación de material fibroso a partir de cartón Kraft blanqueado**

- Se obtuvo una carga de 1500 libras de cartón Kraft blanco blanqueado virgen que tenía una densidad aparente de 30 lb/ft³, de International Paper. El material se dobló plano, y después se alimentó a una desmenuzadora 3 hp Flinch Baugh a una velocidad de aproximadamente 15 a 20 libras por hora. La desmenuzadora estaba equipada con dos
- 50 palas rotatorias de 12 pulgadas, dos palas fijas y un tamiz de descarga de 0,30 pulgadas. El hueco entre las palas rotatorias y las fijas se ajustó a 0,10 pulgadas. El resultado de la desmenuzadora parecía confeti que tenía una anchura entre 0,1 pulgadas y 0,5 pulgadas, una longitud de entre 0,25 pulgadas y 1 pulgada y un espesor equivalente al del material de partida (aproximadamente 0,075 pulgadas). El material de tipo confeti se alimentó a
- 55 una cortadora de cuchillas rotativas Munson, modelo SC30. El tamiz de descarga tenía aberturas de 1/8 pulgadas. El hueco entre las palas rotatorias y las fijas se estableció en 0,020 pulgadas. La cortadora de cuchillas rotativas desmenuzó los trozos de tipo confeti, liberando un material fibroso a una velocidad de aproximadamente 1 libra por hora. El material fibroso tenía una superficie específica BET de 1,1346 m²/g +/- 0,0103 m²/g, una porosidad de 88,3285 por ciento y una densidad aparente (@ 0,53 psia) de 0,1497 g/ml. Una longitud media de las fibras era
- 60 1,063 mm y una anchura media de las fibras era 0,0245 mm, dando una relación L/D media de 43:1. Se muestra una

micrografía electrónica de barrido del material fibroso en la figura 27 con 25 X aumentos.

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

- 5 Se obtuvo una carga de 1500 libras de cartón Kraft blanco blanqueado virgen que tenía una densidad aparente de 30 lb/ft³, de International Paper. El material se dobló plano, y después se alimentó a una desmenuzadora 3 hp Flinch Baugh a una velocidad de aproximadamente 15 a 20 libras por hora. La desmenuzadora estaba equipada con dos palas rotatorias de 12 pulgadas, dos palas fijas y un tamiz de descarga de 0,30 pulgadas. El hueco entre las palas rotatorias y las fijas se ajustó a 0,10 pulgadas. El resultado de la desmenuzadora parecía confeti (como antes). El
- 10 material de tipo confeti se alimentó a una cortadora de cuchillas rotativas Munson, modelo SC30. El tamiz de descarga tenía aberturas de 1/16 pulgadas. El hueco entre las palas rotatorias y las fijas se estableció en 0,020 pulgadas. La cortadora de cuchillas rotativas desmenuzó los trozos de tipo confeti, liberando un material fibroso a una velocidad de aproximadamente 1 libra por hora. El material resultante de la primera cizalladura se volvió a alimentar al mismo inicio descrito antes y se desmenuzó de nuevo. El material fibroso resultante tenía una superficie
- 15 específica BET de 1,4408 m²/g +/- 0,0156 m²/g, una porosidad de 90,8997 por ciento y una densidad aparente (@ 0,53 psia) de 0,1298 g/ml. Una longitud media de las fibras era 0,891 mm y una anchura media de las fibras era 0,026 mm, dando una relación L/D media de 34:1. Se muestra una micrografía electrónica de barrido del material fibroso en la figura 28 con 25 X aumentos.

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

- Se obtuvo una carga de 1500 libras de cartón Kraft blanco blanqueado virgen que tenía una densidad aparente de 30 lb/ft³, de International Paper. El material se dobló plano, y después se alimentó a una desmenuzadora 3 hp Flinch Baugh a una velocidad de aproximadamente 15 a 20 libras por hora. La desmenuzadora estaba equipada con dos
- 25 palas rotatorias de 12 pulgadas, dos palas fijas y un tamiz de descarga de 0,30 pulgadas. El hueco entre las palas rotatorias y las fijas se ajustó a 0,10 pulgadas. El resultado de la desmenuzadora parecía confeti (como antes). El material de tipo confeti se alimentó a una cortadora de cuchillas rotativas Munson, modelo SC30. El tamiz de descarga tenía aberturas de 1/8 pulgadas. El hueco entre las palas rotatorias y las fijas se estableció en 0,020 pulgadas. La cortadora de cuchillas rotativas desmenuzó los trozos de tipo confeti por los bordes de las cuchillas. El
- 30 material resultante de la primera cizalladura se volvió a alimentar a la misma disposición y el tamiz se sustituyó con un tamiz de 1/16 pulgadas. Este material se desmenuzó. El material resultante de la segunda cizalladura se volvió a alimentar en la misma disposición y el tamiz se sustituyó por un tamiz de 1/32 pulgadas. Este material se desmenuzó. El material fibroso resultante tenía una superficie específica BET de 1,6897 m²/g +/- 0,0155 m²/g, una porosidad de 87,7163 por ciento y una densidad aparente (@ 0,53 psia) de 0,1448 g/ml. Una longitud media de las
- 35 fibras era 0,824 mm y una anchura media de las fibras era 0,0262 mm, dando una relación L/D media de 32:1. Se muestra una micrografía electrónica de barrido del material fibroso en la figura 29 con 25 X aumentos.

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

- 40 Se preparó material fibroso de acuerdo con el ejemplo 2. Se pulverizaron aproximadamente 0,454 kg (1 libra) de agua sobre cada uno de 4,54 kg (10 libras) de material fibroso. Se densificó el material fibroso usando un molino para pelet California 1100 que operaba a 75 °C. Se obtuvo pelet con una densidad en masa en el rango entre aproximadamente 7 lb/ft³ y aproximadamente 15 lb/ft³.

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

Se preparó material fibroso de acuerdo con el ejemplo 2.

- 50 Se preparó una solución madre al 2 por ciento en peso de POLYOX™ WSRN10 (óxido de polietileno) en agua.

Se pulverizó aproximadamente 1 lb de solución madre sobre cada 10 libras de material fibroso. Se densificó el material fibroso usando un molino para pelet California 1100 que operaba a 75 °C. Se obtuvo un pelet con una densidad en masa en el rango entre aproximadamente 15 lb/ft³ y aproximadamente 40 lb/ft³

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 9 - Procesamiento con haz de electrones

20 Las muestras se trataron con haz de electrones usando un acelerador de ondas continuas Rhodotron® TT200 en cámara aislada que suministra electrones a 5 MeV a 80 kW de potencia de salida. La tabla 1 describe los parámetros usados. La tabla 2 describe la dosis nominal usada para el ID de muestra (en Mrad) y la correspondiente dosis suministrada a la muestra (en kgy).

25 **Tabla 1. Parámetros Rhodotron® TT200**

Haz	
Haz producido:	Electrones acelerados
Energía de haz:	Nominal (fija): 10 MeV (+0 keV-250 keV)
Dispersión de energía a 10 MeV:	Mitad de máximo de ancho completo (FWHM) 300 keV
Potencia de haz a 10 MeV:	Rango de operación garantizado 1 a 80 kW
Consumo de potencia	
Condición en reposo (vacío y enfriamiento encendido):	<15 kW
A 50 kW de potencia de haz:	<210 kW
A 80 kW de potencia de haz:	<260 kW
Sistema de RF	
Frecuencia:	107,5 ± 1 MHz
Tipo de tetrodo:	Thomson TH781
Resonador de barrido	
Longitud de barrido nominal (medida a 25-35 cm de la ventana):	120 cm
Rango de barrido:	De 30% a 100% de longitud de barrido nominal
Frecuencia de barrido nominal (a longitud de barrido máxima):	100 Hz ± 5%
Uniformidad de barrido (a través de 90% de longitud de barrido nominal)	±5%

Tabla 2. Dosis entregadas a muestras

30

Dosis total (Mrad) (número asociado a la dosis entregada a	ID de muestra (kgy)¹
1	9,9
3	29,0
5	50,4
7	69,2
10	100,0
15	150,3

20	198,3
30	330,9
50	529,0
70	695,9
100	993,6

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

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

Los materiales celulósicos y lignocelulósicos para analizar se trataron de acuerdo con el ejemplo 4. Los materiales de muestra presentados en las siguientes tablas incluyen papel Kraft (P), paja de trigo (WS), alfalfa (A), celulosa (C), mijo (SG), hierbas (G) y almidón (ST) y sacarosa (S). El número "132" del ID de muestra se refiere al tamaño de partículas del material después de cizalladura a través de un tamiz de 1/32 pulgadas. El número después del guion se refiere a la dosis de radiación (MRad) y "US" se refiere al tratamiento con ultrasonidos. Por ejemplo, un ID de muestra "P132-10" se refiere a papel Kraft que se ha cizallado a un tamaño de partículas de malla 132 y se ha irradiado con 10 Mrad.

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

20 Tabla 3. Peso molecular promedio pico de papel Kraft irradiado

Fuente de muestra	ID de muestra	Dosis ¹ (Mrad)	Ultrasonido ²	MW promedio $\pm$ desv. est.
Papel Kraft	P132	0	No	32853 $\pm$ 10006
	P132-10	10	"	61398 $\pm$ 2468**
	P132-100	100	"	8444 $\pm$ 580
	P132-181	181	"	6668 $\pm$ 77
	P132-US	0	Sí	3095 $\pm$ 1013

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

¹Dosis por unidad de tiempo = 1 Mrad/h

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

Tabla 4. Peso molecular promedio pico de papel Kraft irradiado con haz E

Fuente de muestra	ID de muestra	Dosis (Mrad)	MW promedio $\pm$ desv. est.
Papel Kraft	P-1e	1	63489 $\pm$ 595
	P-5e	5	56587 $\pm$ 536
	P-10e	10	53610 $\pm$ 327
	P-30e	30	38231 $\pm$ 124
	P-70e	70	12011 $\pm$ 158
	P-100e	100	9770 $\pm$ 2

Tabla 5. Peso molecular promedio pico de materiales irradiados gamma

5

ID de muestra	Pico n°	Dosis ¹ (Mrad)	Ultrasonido ²	MW promedio $\pm$ desv. est.
WS132	1	0	No	1407411 $\pm$ 175191
	2	"	"	39145 $\pm$ 3425
	3	"	"	2886 $\pm$ 177
WS132-10*	1	10	"	26040 $\pm$ 3240
WS132-100*	1	100	"	23620 $\pm$ 453
A132	1	0	"	1604886 $\pm$ 151701
	2	"	"	37525 $\pm$ 3751
	3	u	"	2853 $\pm$ 490
A132-10*	1	10	"	50853 $\pm$ 1665
	2	"	"	2461 $\pm$ 17
A132-100*	1	100	"	38291 $\pm$ 2235
	2	"	"	2487 $\pm$ 15
SG132	1	0	"	1557360 $\pm$ 83693
	2	"	"	42594 $\pm$ 4414
	3	"	"	3268 $\pm$ 249
SG132-10*	1	10	"	60888 $\pm$ 9131
SG132-100*	1	100	"	22345 $\pm$ 3797
SG132-10-US	1	10	Sí	86086 $\pm$ 43518
	2	"	"	2247 $\pm$ 468
SG132-100-US	1	100	"	4696 $\pm$ 1465

*Coalescencia de picos después de tratamiento

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

¹Dosis por unidad de tiempo = 1 Mrad/h10 ²Tratamiento durante 30 minutos con ultrasonidos a 20 kHz usando un sonotrodo de 1000 W en condiciones de recirculación con el material disperso en agua.

Tabla 6. Peso molecular promedio pico de material irradiado con haz E

ID de muestra	Pico n°	Dosis	MW promedio $\pm$ desv. est.
	1		1004783 $\pm$ 97518
A-1e	2	1	34499 $\pm$ 482
	3		2235 $\pm$ 1
A-5e	1	5	38245 $\pm$ 346
	2		2286 $\pm$ 35
A-10e	1	10	44326 $\pm$ 33
	2		2333 $\pm$ 18
A-30e	1	30	47366 $\pm$ 583
	2		2377 $\pm$ 7
A-50e	1	50	32761 $\pm$ 168
	2		2435 $\pm$ 6
	1		447362 $\pm$ 38817

G-1e	2	1	32165 ± 779
	3		3004 ± 25
G-5e	1	5	62167 ± 6418
	3		2444 ± 33
G-10e	1	10	72636 ± 4075
	2		3065 ± 34
G-30e	1	30	17159 ± 390
G-50e	1	50	18960 ± 142
ST	1	0	923336 ± 1883
	2		150265 ± 4033
ST-1e	1	1	846081 ± 5180
	2		131222 ± 1687
ST-5e	1	5	90664 ± 1370
ST-10e	1	10	98050 ± 255
ST-30e	1	30	41884 ± 223
ST-70e	1	70	9699 ± 31
ST-100e	1	100	8705 ± 38

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

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

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

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

20

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

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

25

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

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

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

15 Las muestras lignocelulósicas requerían preparación de la muestra antes del análisis por GPC. Primero, se preparó una solución saturada (8,4% en peso) de cloruro de litio (LiCl) en dimetilacetamida (DMAc). Se añadieron aproximadamente 100 mg de la muestra a aproximadamente 10 g de solución de LiCl/DMAc saturada recién preparada, y la muestra se calentó a aproximadamente 150 °C-170 °C con agitación durante 1 hora. Las soluciones resultantes en general eran de color amarillo de claro a oscuro. La temperatura de las soluciones se disminuyó a aproximadamente 100 °C y se calentó durante 2 horas adicionales. Las temperaturas de las soluciones después se disminuyeron a aproximadamente 50 °C y la solución de muestra se calentó durante aproximadamente 48 a 60 horas. Hay que indicar que las muestras irradiadas a 100 MRad eran solubilizadas más fácilmente comparadas con sus homólogas no tratadas. Adicionalmente, las muestras cizalladas (indicadas por el número 132) tenían pesos 5
25 moleculares medios ligeramente inferiores comparadas con las muestras no cortadas.

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

35 Tabla 7. Condiciones de Análisis por GPC

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

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

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

Tabla 8. Intensidades promedio normalizadas de varios iones positivos de interés (normalizados en relación a cuentas de iones totales x 1000)

		P132		P132-10		P132-100	
m/z	especie	Media	σ	Media	σ	Media	σ
23	Na	257	28	276	54	193	36
27	Al	647	43	821	399	297	44
28	Si	76	45,9	197	89	81,7	10,7
15	CH ₃	77,9	7,8	161	26	133	12
27	C ₂ H ₃	448	28	720	65	718	82
39	C ₃ H ₃	333	10	463	37	474	26
41	C ₃ H ₅	703	19	820	127	900	63
43	C ₃ H ₇	657	11	757	162	924	118
115	C ₉ H ₇	73	13,4	40,3	4,5	42,5	15,7
128	C ₁₀ H ₈	55,5	11,6	26,8	4,8	27,7	6,9
73	C ₃ H ₉ Si*	181	77	65,1	18,4	81,7	7,5
147	C ₅ H ₁₅ OSi ₂ *	72,2	33,1	24,9	10,9	38,5	4
207	C ₅ H ₁₅ O ₃ Si ₃ *	17,2	7,8	6,26	3,05	7,49	1,77
647	C ₄₂ H ₆₄ PO ₃	3,63	1,05	1,43	1,41	10,7	7,2

5 Tabla 9. Intensidades promedio normalizadas de varios iones negativos de interés (normalizados en relación a cuentas de iones totales x 1000)

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

10 Tabla 10. Intensidades promedio normalizadas de varios iones positivos de interés (normalizados en relación a cuentas de iones totales x 1000)

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

15 Tabla 11. Intensidades promedio normalizadas de varios iones negativos de interés (normalizados en relación a cuentas de iones totales x 1000)

		P-1e		P-5e		P-10e		P-30e		P-70e		P-	
--	--	------	--	------	--	-------	--	-------	--	-------	--	----	--

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

Tabla 12. Parámetros ToF-SIMS

Condiciones del instrumento:	
Instrumento:	PHI TRIFT II
Fuente de iones primarios:	⁶⁹ Ga
Potencial de haz de iones primarios:	12 kV + iones
	18 kV + iones
Corriente de iones primarios (DC):	2 na para muestras P#E
	600 pA para muestras P132
Filtro de energía/CD:	Fuera/fuera
Masas con manto:	Ninguna
Compensación de carga:	Activada

- 5 ToF-SIMS usa un haz de partículas pulsadas, enfocadas (típicamente Cs o Ga) para desalojar especies químicas sobre la superficie de materiales. Las partículas producidas más cerca del sitio de impacto tienden a ser iones disociados (positivos o negativos). Las partículas secundarias generadas más lejos del sitio de impacto tienden a ser compuestos moleculares, típicamente fragmentos de macromoléculas orgánicas mucho mayores. Después, las partículas son aceleradas en una ruta de vuelo en su camino hacia un detector. Debido a que se puede medir el
- 10 “tiempo de vuelo” de las partículas desde el momento del impacto al detector en una escala de nanosegundos, se puede producir una resolución de masa tan fina como 0,00X unidades de masa atómica (es decir, una parte en mil en la masa de un protón). En condiciones de operación típicas, los resultados del análisis de ToF-SIMS incluyen: un espectro de masas que explora todas las masas atómicas a lo largo de un intervalo de 0-10.000 uma, los rastros de los haces producen mapas de cualquier masa de interés en una escala de submicrómetros, y se producen perfiles
- 15 de profundidad por eliminación de las capas de superficie por pulverización catódica bajo el haz de iones. El análisis de iones negativos mostraba que el polímero tenía cantidades crecientes de grupos CNO, CN y NO₂.

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

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

30 **Tabla 13. Concentraciones atómicas (en %) ^{a,b}**

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

^a Normalizadas a 100% de los elementos detectados. Los XPS no detectan H o He.

Tabla 14. Tabla de estado químico de carbono (en % C)

5

ID de muestra	C-C, C-H	C-O	C=O	O-C=O
P132 (Área 1)	22	49	21	7
P132 (Área 2)	25	49	20	6
P132-10 (Área 1)	34	42	15	9
P132-10 (Área 2)	43	38	14	5
P132-100 (Área 1)	27	45	15	9
P132-100 (Área 2)	25	44	23	9

Tabla 15. Concentraciones atómicas (en %) ^{a,b}

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

10 ^a Normalizadas a 100% de los elementos detectados. Los XPS no detectan H o He.

^b Menos del símbolo "<" indica que no puede hacerse una cuantificación precisa debido a intensidad de señal débil.

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

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

15

Tabla 17. Parámetros analíticos

Instrumento:	PHI Quantum 2000
Fuente de rayos X:	Alka monocromado 1486,6 eV
Angulo de aceptación:	±23°
Angulo de despegue:	45°
Area de análisis:	1400x300 pm

Corrección de carga:	C1s 284,8 eV
----------------------	--------------

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

Ejemplo 13. Análisis Raman

Los espectros de Raman se adquirieron de la superficie de fibras de las muestras: P132, PI32-100, P-1e y P-100e. Las mediciones se realizaron usando un espectrómetro "LabRam" J-Y. Se usaron para las mediciones un láser HeNe (longitud de onda 632,8 nm) y rejilla de 600 gr/mm. Las mediciones se realizaron de forma confocal usando geometría de retrodispersión (180°) bajo un microscopio Olympus BX40. Las muestras tenían un espectro Raman típico de celulosa.

Ejemplo 14. Análisis de superficie por microscopía de sonda de barrido (SPM) usando un microscopio de fuerza atómica (AFM)

El propósito de este análisis era obtener imágenes de microscopio de fuerza atómica (AFM) de las muestras en las tablas 18 y 19 para medir la rugosidad.

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

Tabla 18. Resultados de aspereza para muestras gamma irradiadas

ID de muestra	RMS (Å)	R _a (Å)	R _{max} (Å)
P132	927,2	716,3	8347,6
P132-10	825,7	576,8	11500
P132-100	1008	813,5	7250,7

Tabla 19. Resultados de aspereza para muestras irradiadas con haz E

ID de muestra	RMS (Å)	R _a (Å)	R _{max} (Å)
P-1e	1441,2	1147,1	8955,4
P-5e	917,3	727,5	6753,4
P-10e	805,6	612,1	7906,5
P-30e	919,2	733,7	6900
P-70e	505,8	388,1	5974,2

P-100e	458,2	367,9	3196,9
--------	-------	-------	--------

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

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

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

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

Tabla 20. Datos de XRD incluyendo tamaño de dominio y % de cristalinidad

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

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

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

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

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

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

donde,

5

A_c = Área de la fase cristalina

A_a = Área de la fase amorfa

X_c = porcentaje de cristalinidad

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

Se usó un procedimiento sistemático para minimizar el error en estos cálculos debido a los picos cristalinos anchos así como a la intensidad base alta. Primero, se aplicó una base lineal y después se eliminó. Segundo, dos picos Gaussianos centrados a 22° y 38° con anchuras de 10-12° se ajustó cada uno a los hombros debajo de los picos cristalinos. Tercero, se determinaron el área bajo los dos picos Gaussianos anchos y el resto del patrón. Finalmente, se calculó el porcentaje de cristalinidad dividiendo el área bajo el pico cristalino entre la intensidad total (después de restar la base). El tamaño del dominio y el % de cristalinidad de las muestras determinados por difracción de rayos X (XRD) se presentan en la tabla 20.

20

Ejemplo 16 - Análisis de porosimetría de materiales irradiados

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

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

ID de muestra	Volumen de intrusión total (ml/g)	Área de poro total (m ² /g)	Diámetro de poro de mediana (volumen) (μm)	Diámetro de poro de mediana (área) (μm)	Diámetro de poro promedio (4V/A) (μm)	Densidad volumétrica @ 0,50 psia (g/ml)	Densidad aparente (esquelética) (g/ml)	Porosidad (%)
P132	6,0594	1,228	36,2250	13,7278	19,7415	0,1448	1,1785	87,7163
P132-10	5,5436	1,211	46,3463	4,5646	18,3106	0,1614	1,5355	89,4875
P132-100	5,3985	0,998	34,5235	18,2005	21,6422	0,1612	1,2413	87,0151
P132-181	3,2866	0,868	25,3448	12,2410	15,1509	0,2497	1,3916	82,0577
P132-US	6,0005	14,787	98,3459	0,0055	1,6231	0,1404	0,8894	84,2199
A132	2,0037	11,759	64,6308	0,0113	0,6816	0,3683	1,4058	73,7990
A132-10	1,9514	10,326	53,2706	0,0105	0,7560	0,3768	1,4231	73,5241
A132-100	1,9394	10,205	43,8966	0,0118	0,7602	0,3760	1,3889	72,9264
SG132	2,5267	8,265	57,6958	0,0141	1,2229	0,3119	1,4708	78,7961
SG132-10	2,1414	8,643	26,4666	0,0103	0,9910	0,3457	1,3315	74,0340
SG132-100	2,5142	10,766	32,7118	0,0098	0,9342	0,3077	1,3590	77,3593
SG132-10-US	4,4043	1,722	71,5734	1,1016	10,2319	0,1930	1,2883	85,0169
SG132-	4,9665	7,358	24,8462	0,0089	2,6998	0,1695	1,0731	84,2010

100-US								
WS132	2,9920	5,447	76,3675	0,0516	2,1971	0,2773	1,6279	82,9664
WS132-10	3,1138	2,901	57,4727	0,3630	4,2940	0,2763	1,9808	86,0484
WS132-100	3,2077	3,114	52,3284	0,2876	4,1199	0,2599	1,5611	83,3538
A-1e	1,9535	3,698	25,3411	0,0810	2,1130	0,3896	1,6299	76,0992
A-5e	1,9697	6,503	29,5954	0,0336	1,2117	0,3748	1,4317	73,8225
A-10e	2,0897	12,030	45,5493	0,0101	0,6948	0,3587	1,4321	74,9545
A-50e	2,1141	7,291	37,0760	0,0304	1,1599	0,3577	1,4677	75,6264
G-1e	2,4382	7,582	58,5521	0,0201	1,2863	0,3144	1,3472	76,6610
G-5e	2,4268	6,436	44,4848	0,0225	1,5082	0,3172	1,3782	76,9831
G-10e	2,6708	6,865	62,8605	0,0404	1,5562	0,2960	1,4140	79,0638
G-50e	2,8197	6,798	56,5048	0,0315	1,6591	0,2794	1,3179	78,7959
P-1e	7,7692	1,052	49,8844	22,9315	29,5348	0,1188	1,5443	92,3065
P-5e	7,1261	1,212	46,6400	12,3252	23,5166	0,1268	1,3160	90,3644
P-10e	6,6096	1,113	41,4252	17,4375	23,7513	0,1374	1,4906	90,7850
P-50e	6,5911	1,156	40,7837	15,9823	22,7974	0,1362	1,3302	89,7616
P-100e	5,3507	1,195	35,3622	10,7400	17,9063	0,1648	1,3948	88,1840
S	0,4362	0,030	102,8411	42,5047	57,8208	0,9334	1,5745	40,7160
S-1e	0,3900	0,632	90,6808	0,0041	2,4680	0,9772	1,5790	38,1140
S-5e	0,3914	0,337	97,1991	0,0070	4,6406	0,9858	1,6052	38,5847
S-10e	0,4179	0,349	113,4360	0,0042	4,7873	0,9469	1,5669	39,5678
S-30e	0,4616	5,329	102,0559	0,0042	0,3464	0,9065	1,5585	41,8388
S-50e	0,5217	7,162	137,2124	0,0051	0,2914	0,8521	1,5342	44,4582
S-100e	0,8817	15,217	76,4577	0,0053	0,2318	0,6478	1,5105	57,1131
St	0,6593	17,631	4,2402	0,0053	0,1496	0,7757	1,5877	51,1438
St-1e	0,6720	18,078	4,3360	0,0052	0,1487	0,7651	1,5750	51,4206
St-5e	0,6334	19,495	4,2848	0,0051	0,1300	0,7794	1,5395	49,3706
St-10e	0,6208	16,980	4,3362	0,0056	0,1462	0,7952	1,5703	49,3630
St-30e	0,6892	18,066	4,4152	0,0050	0,1526	0,7475	1,5417	51,5165
St-50e	0,6662	18,338	4,3759	0,0054	0,1453	0,7637	1,5548	50,8778
St-100e	0,6471	23,154	5,4032	0,0048	0,1118	0,7229	1,3582	46,7761

El AutoPore 9520 puede alcanzar una presión máxima de 414 MPa o 60.000 psia. Hay cuatro estaciones de presión baja para la preparación de muestra y recolección de datos de macroporos de 0,2 psia a 50 psia. Hay dos cámaras de alta presión, que recogen datos de 25 psia a 60.000 psia. La muestra se pone en un aparato de tipo copa llamado 5 un penetrómetro, que está unido a un vástago capilar de vidrio recubierto de metal. Cuando el mercurio invade los huecos en y alrededor de la muestra, se mueve hacia abajo del vástago capilar. La pérdida de mercurio del vástago capilar produce un cambio en la capacitancia eléctrica. El cambio en la capacitancia durante el experimento se convierte en el volumen de mercurio conociendo el volumen del vástago del penetrómetro que se usa. Están disponibles una variedad de penetrómetros con diferentes tamaños de copa (muestra) y capilares para acomodar la 10 mayor parte de los tamaños y configuraciones. La siguiente tabla 22 define algunos de los parámetros clave calculados para cada muestra.

Tabla 22. Definición de parámetros

Parámetro	Descripción
Volumen de intrusión total:	El volumen total de mercurio intrusionado durante un experimento. Puede incluir carga intersticial entre pequeñas partículas, porosidad de muestra y volumen de compresión de muestra.
Área de poro total:	El volumen de intrusión total convertido en un área que supone poros de forma cilíndrica.
Diámetro de poro de mediana (volumen):	El tamaño en el percentil 50 en el gráfico de volumen acumulativo.
Diámetro de poro de mediana (área):	El tamaño en el percentil 50 en el gráfico de área acumulativa.
Diámetro de poro	El volumen de poro total dividido por el área de poro total (4V/A).

promedio:	
Densidad volumétrica:	La masa de la muestra dividida por el volumen volumétrico. El volumen volumétrico se determina en la presión de carga, normalmente 0,5 psia.
Densidad aparente:	La masa de muestra dividida por el volumen de la muestra medida a la presión más alta, normalmente 60,000 psia.
Porosidad:	$(\text{Densidad volumétrica} / \text{densidad aparente}) \times 100\%$

Ejemplo 17 - Análisis del tamaño de partículas de materiales irradiados

La técnica de medición del tamaño de partículas por dispersión de luz estática se basa en la teoría de Mie (que también abarca la teoría de Fraunhofer). La teoría de Mie predice la relación de la intensidad frente al ángulo como una función del tamaño para partículas de dispersión esféricas con la condición de que se conozcan

otras variables del sistema y se mantengan constantes. Estas variables son la longitud de onda de la luz incidente y el índice de refracción relativo del material de muestra. La aplicación de la teoría de Mie proporciona la información detallada del tamaño de partículas. La tabla 23 resume el tamaño de partículas usando la mediana del diámetro, diámetro medio y diámetro modal como parámetro.

Tabla 23. Tamaño de partícula mediante dispersión de luz láser (dispersión de muestra seca)

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

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

Velocidad de alimentación: 35%
Presión de dispersión: 4 bar
Modelo Óptico: (2,610, 1,000i), 1,000

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

Ejemplo 18 - Análisis de la superficie específica de materiales irradiados

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

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

ID de muestra	Área de superficie de único punto (m ² /g)		Área de superficie BET (m ² /g)
P132	@ P/Po=0,250387771	1,5253	1,6897
P132-10	@ P/Po=0,239496722	1,0212	1,2782
P132-100	@ P/Po=0,240538100	1,0338	1,2622
P132-181	@ P/Po=0,239166091	0,5102	0,6448
P132-US	@ P/Po=0,217359072	1,0983	1,6793
A132	@ P/Po=0,240040610	0,5400	0,7614
A132-10	@ P/Po=0,211218936	0,5383	0,7212
A132-100	@ P/Po=0,238791097	0,4258	0,5538
SG132	@ P/Po=0,237989353	0,6359	0,8350
SG132-10	@ P/Po=0,238576905	0,6794	0,8689
SG132-100	@ P/Po=0,241960361	0,5518	0,7034
SG132-10-US	@ P/Po=0,225692889	0,5693	0,7510
SG132-100-US	@ P/Po=0,225935246	1,0983	1,4963
G-10-US			0,751
G100-US			1,496
G132-US			1,679
WS132	@ P/Po=0,237823664	0,6582	0,8663
WS132-10	@ P/Po=0,238612476	0,6191	0,7912
WS132-100	@ P/Po=0,238398832	0,6255	0,8143
A-1e	@ P/Po=0,238098138	0,6518	0,8368
A-5e	@ P/Po=0,243184477	0,6263	0,7865
A-10e	@ P/Po=0,243163236	0,4899	0,6170
A-50e	@ P/Po=0,243225512	0,4489	0,5730
G-1e	@ P/Po=0,238496102	0,5489	0,7038
G-5e	@ P/Po=0,242792602	0,5621	0,7086
G-10e	@ P/Po=0,243066031	0,5021	0,6363
G-50e	@ P/Po=0,238291132	0,4913	0,6333
P-1e	@ P/Po=0,240842223	1,1413	1,4442
P-5e	@ P/Po=0,240789274	1,0187	1,3288
P-10e	@ P/Po=0,240116967	1,1015	1,3657
P-50e	@ P/Po=0,240072114	1,0089	1,2593
P-100e	@ P/Po=0,236541386	0,9116	1,1677
S	@ P/Po=0,225335038	0,0147	0,0279
S-1e	@ P/Po=0,217142291	0,0193	0,0372
S-5e	@ P/Po=0,133107838	0,0201	0,0485
S-10e	@ P/Po=0,244886517	0,0236	0,0317
S-30e	@ P/Po=0,237929400	0,0309	0,0428
S-50e	@ P/Po=0,245494494	0,0262	0,0365
S-100e	@ P/Po=0,224698551	0,0368	0,0506
St	@ P/Po=0,238324949	0,3126	0,4013
St-1e	@ P/Po=0,238432726	0,3254	0,4223
St-5e	@ P/Po=0,238363587	0,3106	0,4071
St-10e	@ P/Po=0,238341099	0,3205	0,4268
St-30e	@ P/Po=0,238629889	0,3118	0,4189
St-50e	@ P/Po=0,244630980	0,3119	0,3969
St-100e	@ P/Po=0,238421621	0,2932	0,3677

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

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

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

5

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

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

Ejemplo 20 - Tratamiento ultrasónico de mijo irradiado y no irradiado

10

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

15

Las figuras 30 y 31 muestran el aparato usado para los ultrasonidos. El aparato 500 incluye un convertidor 502 conectado a un impulsor 504 que comunica con un sonotrodo 506 fabricado de titanio o una aleación de titanio. El sonotrodo, que tiene una junta 510 hecha por VITON® de aproximadamente su perímetro en su lado de procesamiento, forma un cierre hermético a líquidos con una celda de procesamiento 508. El lado de procesamiento del sonotrodo está sumergido en un líquido, tal como agua, que tiene dispersa en la misma la muestra que se va a tratar con ultrasonidos. La presión en la celda se controla con un manómetro 512. Cuando está en funcionamiento, cada muestra es movida mediante la bomba 517 desde el depósito 516 a través de la celda de procesamiento y recibe los ultrasonidos. Después de sonicación, la muestra es capturada en el depósito 520. El procedimiento se puede invertir en cuanto que el contenido del depósito 520 se puede mandar a través de la celda de procesamiento y capturar en el depósito 516. Este procedimiento se puede repetir una serie de veces hasta que se suministra a la muestra el nivel deseado de procesamiento.

20

25

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

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

35

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

40

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

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

45

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

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

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

10

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

15

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

20

Preparación de las muestras

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

25

30 *Análisis*

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

35

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

40

45

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

50

55 *Valoración*

Las muestras P-100e y P132-100 (1 g) se suspendieron en agua desionizada (25 ml). Se añadió el indicador amarillo de alizarina a cada muestra con agitación. P-100e era más difícil de mojar. Ambas muestras se valoraron con una solución de NaOH 0,2 M. El punto final era muy sutil y se confirmó usando un papel de pH. El pH inicial de las muestras era ~ 4 para ambas muestras. P132-100 necesitó 0,4 miliequivalentes de hidróxido, lo que da un peso

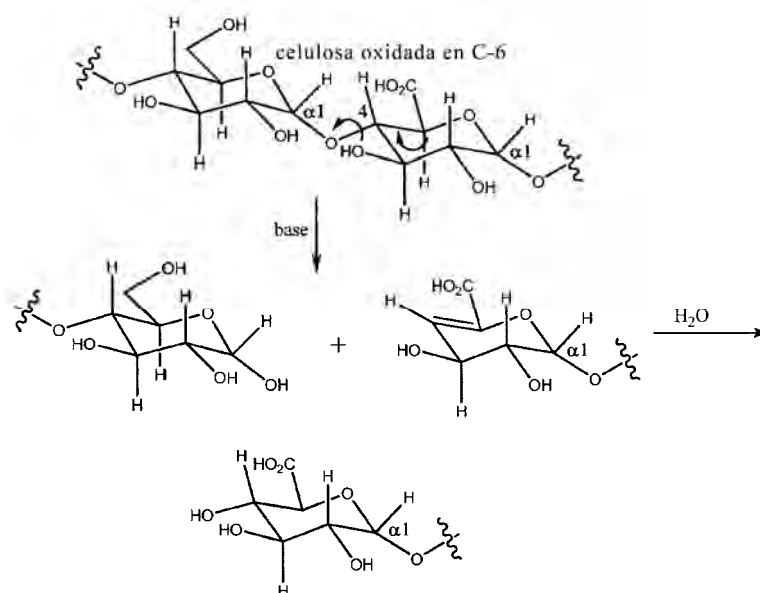
60

molecular para el ácido carboxílico de 2500 uma. Si se usa 180 uma para un monómero, esto sugiere que hay un grupo ácido carboxílico para 13,9 unidades de monómero. Igualmente, P-100e necesitaba 3,2 miliequivalentes de hidróxido, que se calcula que es un grupo ácido carboxílico por cada 17,4 unidades de monómero.

5 Conclusiones

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

Esquema 1



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

Se usa mijo como materia prima y se cizalla con una cortadora de cuchillas rotativas Munson en un material fibroso. El material fibroso después se distribuye uniformemente sobre una bandeja abierta compuesta de estaño con un área mayor de aproximadamente 500 pulgadas². El material fibroso se distribuye de modo que tenga una profundidad de aproximadamente 1-2 pulgadas en la bandeja abierta. El material fibroso se puede distribuir en bolsas de plástico con dosis más bajas de irradiación (por debajo de 10 Mrad), y dejar sin cubrir en la bandeja metálica con dosis de radiación más altas.

Después, muestras separadas del material fibroso se exponen a dosis sucesivas de radiación de haz de electrones para lograr una dosis total de 1 Mrad, 2 Mrad, 3, 5 Mrad, 10 Mrad, 50 Mrad, y 100 Mrad. Algunas muestras se mantienen en las mismas condiciones que las muestras restantes, pero no se irradian, para servir de control.

Después de enfriar, el material fibroso irradiado se manda adelante para el posterior procesamiento a través de un dispositivo de ultrasonidos.

El dispositivo de ultrasonidos incluye un convertidor conectado a un impulsor que comunica con un sonotrodo fabricado de titanio o una aleación de titanio. El sonotrodo, que tiene una junta hecha por VITON® de aproximadamente su perímetro en su lado de procesamiento, forma un cierre hermético a líquidos con una celda de procesamiento. El lado de procesamiento del sonotrodo está sumergido en un líquido, tal como agua, en el que se sumerge el material fibroso que se va a irradiar. La presión en la celda se controla con un manómetro de presión. Cuando está en funcionamiento, cada muestra es movida mediante la bomba a través de la celda de procesamiento

y recibe los ultrasonidos.

Para preparar el material fibroso irradiado para los ultrasonidos, el material fibroso irradiado se retira de cualquier recipiente (p. ej., bolsas de plástico) y se dispersa en agua en una concentración de aproximadamente 0,10 g/ml. Se lleva a cabo el tratamiento con ultrasonidos en cada muestra durante 30 min usando ultrasonidos de 20 kHz desde un sonotrodo a 1000 W en condiciones de recirculación. Después del tratamiento con ultrasonidos, el material fibroso irradiado se captura en un depósito. Este procedimiento se puede repetir una serie de veces hasta alcanzar un nivel de procesamiento deseado, basándose en el control de los cambios estructurales en el mijo. De nuevo, algunas muestras irradiadas se mantienen en las mismas condiciones que el resto de las muestras, pero no se tratan con ultrasonidos, de nuevo para servir como controles. Además, algunas muestras que no se irradiaron se sonicen, otra vez para servir como controles. Por lo tanto, algunos controles no son procesados, algunos son solo irradiados, y algunos son solo tratados con ultrasonidos.

Ejemplo 25 - Ensayo microbiano de biomasa pretratada

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

Fase 1: Toxicidad y contenido de azúcar

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

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

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

Fase 2: Compatibilidad de celulasa

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

Ejemplo 26 - Análisis de la concentración de azúcar usando HPLC

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

Tabla 26. Equipo utilizado en experimentos

Equipo	Fabricante, nombre
Medidor de pH	Orion
Agitadores (2)	B. Braun Biotech, Certomat BS-1
HPLC	Waters, 2690 HPLC Module
Espectrofotómetro	Unicam, UV300
YSI Biochem Analyzer	Interscience, YSI

Tabla 27. Azúcares usados en el análisis de HPLC

5

Azúcar	Fabricante	Nº referencia	Nº lote
glucosa		49140	1284892
xilosa		95731	1304473 51707231
celobiosa	BioChemika	22150	1303157 14806191
arabinosa		10840	1188979 24105272
manosa		63582	363063/1 22097
galactosa		48259	46032/1 33197

Tabla 28. Preparación de estándares de HPLC

Conc. deseada (mg/ml)	Volumen de solución de azúcar	Vol. de agua nanopura (ml)	Volumen total (ml)
4	50 ml de 4 mg/ml	0	50
2	25 ml de 4 mg/ml	25	50
1	25 ml de 2 mg/ml	25	50
0,5	25 ml de 1 mg/ml	25	50
0,1	5 ml de 1 mg/ml	20	25
Estándar verificación 1,5 mg/ml	18,75 ml de 4 mg/ml	31,25	50

10 *Análisis*

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

15 preparación de las muestras se presentan en la tabla 29.

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

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

SG132-100-US	0,3	5	4,97	
WS132	1	15	5,63	
WS132-10	1	15	5,43	
WS132-100	1	15	5,02	

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

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

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

Tabla 30. Parámetros de HPLC

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

*Pruebas iniciales indicaron que se observó la mejor separación cuando se utiliza agua nanopura que 15/85 acetoniitrilo:agua en la fase móvil (el fabricante no recomienda usar más de 20% de acetoniitrilo con esta columna).

Resultados

Los resultados del análisis de HPLC se muestran en las tablas 31. 32 y 33.

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

ID de muestra	Xilosa mW ~150 $C_5H_{10}O_5$ Mono		Arabinosa mW ~150 $C_5H_{10}O_5$ Mono		Glucosa mW ~180 $C_6H_{12}O_6$ Mono		Galactosa (véase gluc.) mg/ml:mg/g		Manosa(véase gluc.) mg/ml:mg/g		Glucosa mW ~342 $C_{12}H_{22}O_{11}$ Disacc	
	mg/ml	mg/g	mg/ml	mg/g	mg/ml	mg/g	mg/ml	mg/g	mg/ml	mg/g	mg/ml	mg/g
P												
P-132	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
P-132-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34	6,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	
P-132-100	0,35	7,04	0,00	0,00	0,34	6,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36	
P-132-BR	0,35	5,80	0,43	7,17	0,34	5,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
G												
G-132	0,39	5,88	0,38	5,73	0,84	12,66	0,34	5,04	0,92	13,76	0,00	
G-132-10	0,50	7,50	0,41	6,18	1,07	16,04	0,35	5,19	0,98	14,66	0,00	
G-132-100	0,00	0,00	0,37	5,54	0,41	6,14	0,00	0,00	0,55	8,28	0,45	
G-132-	0,34	5,73	0,39	6,45	0,33	5,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

10-US												
G-132-100-US	0,00	0,00	0,37	622	0,35	5,90	0,33	5,43	0,40	6,70	0,39	
A												
A-132	1,36	20,39	0,00	0,00	1,08	16,22	0,39	5,84	1,07	16,02	0,00	
A-132-10	1,19	17,87	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	5,52	0,00	
A-132-100	1,07	16,11	0,00	0,00	0,35	5,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,81	
WS												
WS-132	0,49	7,41	0,41	6,15	0,39	5,90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
WS-132-10	0,57	8,49	0,40	5,99	0,73	10,95	0,34	5,07	0,50	7,55	0,00	
WS-132-100	0,43	6,39	0,37	5,51	0,36	5,36	0,00	0,00	0,36	5,33	0,35	

Tabla 32. Concentración de azúcar expresada en % de papel

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

Tabla 33. Concentración de azúcar expresada en % de muestra total

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

Ejemplo 27 - Estudio de toxicidad

5

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

10 ensayo de toxicidad.

Tabla 34. Condiciones para análisis de toxicidad

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

15 Tabla 35. Reactivos usados para prueba de toxicidad

Componente de medio	Fabricante	Nº referencia	Nº lote
Urea	ScholAR Chemistry	9472706	AD-7284-43
Base de nitrógeno de levadura	Becton Dickinson	291940	7128171
Peptona	Becton Dickinson	211677	4303198
Xilosa	Fluka	95731	1304473 51707231
Glucosa	Sigma	G-5400	107H0245
Extracto de levadura (usado para <i>S. cerevisiae</i>)	Becton Dickinson	288620	4026828
Extracto de levadura (usado para <i>P. stipitis</i> y <i>Z. mobilis</i>)	Becton Dickinson	212750	7165593

MgSO ₄ 7H ₂ O	Sigma	M5921	034K0066
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma	A4418	117K5421
KH ₂ PO ₄	Sigma	P5379	074K0160
Caldo YM	Becton Dickinson	271120	6278265

Tabla 36. Componentes de YSI usados en el estudio de matraz de agitación

Componente	Nº catálogo	Nº lote
Membrana de etanol YSI	2786	07L100153
Estándar de etanol YSI (3,2 g/l)	2790	012711040
Tampón de etanol YSI	2787	07M1000053, 07100215

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

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

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

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

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

- Se preparó un cultivo inclinado de *P. stipitis* a partir de cultivo liofilizado rehidratado de ARS Culture Collection. Una parte del material inclinado se sembró en estrías sobre un caldo YM + agar 20 g/l (pH 5,0) y se incubó a 30 °C durante 2 días. Un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 100 ml de medio (glucosa 40 g/l, base nitrogenada de
- 30 levadura 1,7 g/l, urea 2,27 g/l, peptona 6,56 g/l, xilosa 40 g/l, pH 5,0) se inoculó con una pequeña cantidad de material inclinado y se incubó durante 24 horas a 25 °C y 125 rpm. Después de 23 horas de crecimiento, se tomó una muestra y se analizó la densidad óptica (600 nm en un espectrofotómetro de UV) y pureza (tinción de Gram). Basándose en estos resultados, se escogió un matraz (llamado el matraz de siembra) con una DO de 5,23 y tinción 5 de Gram transparente para inocular todos los matraces de ensayo.

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

45 *Zymomonas mobilis* ATCC 31821 (American Type Culture)

- Se preparó un cultivo inclinado de *Z. mobilis* a partir de un cultivo liofilizado rehidratado obtenido de la ATCC. Una parte del material inclinado se sembró en estrías en placas DYE (glucosa 20 g/l, extracto de levadura 10 g/l, agar 20 g/l, pH 5,4) y se incubó a 30 °C y 5% de CO₂ durante 2 días. Un tubo de ensayo con tapón de rosca de 20 ml que
- 50 contenía 15 ml de medio (glucosa 25 g/l, extracto de levadura 10 g/l, MgSO₄ 7H₂O 1 g/l, (NH₄)₂SO₄ 1 g/l, KH₂PO₄ 2 g/l, pH 5,4) se inoculó con una colonia y se incubó durante 24 horas a 30 °C sin agitación. Después de 23 horas de

crecimiento, se tomó una muestra y se analizó la densidad óptica (600 nm en un espectrofotómetro de UV) y pureza (tinción de Gram). Basándose en estos resultados, se escogió un tubo (DO 1,96) para inocular el segundo matraz de siembra. El segundo matraz de siembra era un matraz de 125 ml que contenía 70 ml de medio descrito antes y se inoculó con 700 µl (1% en v/v) y se incubó durante 24 horas a 30 °C sin agitación. Después de 23 horas de crecimiento, se tomó una muestra y se analizó la densidad óptica (600 nm en un espectrofotómetro de UV) y pureza (tinción de Gram). Basándose en estos resultados, se escogió un matraz (llamado el matraz de siembra) con una DO de 3,72 para inocular todos los matraces de ensayo.

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

Análisis

- Se analizaron dos muestras para determinar concentración celular (usando extensión en placa para *Z. mobilis* y recuentos directos (hemocitómetro y microscopio para *S. cerevisiae* y *P. stipitis*). Muestras adecuadamente diluidas de *Z. mobilis* se extendieron en placas de dextrosa-extracto de levadura (glucosa 20 g/l, extracto de levadura 10 g/l, agar 20 g/l, pH 5,4) y se incubaron a 30 °C y 5% de CO₂ durante 2 días, y se contó el número de colonias. Muestras adecuadamente diluidas de *S. cerevisiae* y *P. stipitis* se mezclaron con azul de Trypan al 0,05%, se cargaron en un hemocitómetro Neubauer. Las células se contaron bajo 40 X aumentos.

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

35 Resultados del análisis de etanol

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

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

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

	24 horas		30 horas		36 horas	
Nº de muestra	Concentración de etanol (g/l)	% de rendimiento	Concentración de etanol (g/l)	% de rendimiento	Concentración de etanol (g/l)	% de rendimiento
P132	4,0	140	5,2	127	3,26	176
P132-10	4,2	147	5,1	125	3,86	209
P132-100	4,3	149	5,6	136	3,47	187
A132	5,5	191	6,5	160	5,24	283
A132-10	1,9	67	6,3	153	5,54	299
A132-100	4,4	154	5,6	137	4,04	218
G132	5,3	186	6,0	146	3,99	215
G132-10	5,2	180	6,4	156	4,63	250
G132-100	5,5	191	6,3	155	4,60	248

WS132	4,8	168	6,3	155	4,51	244
WS132-10	4,9	172	6,0	146	4,55	246
WS132-100	4,9	170	5,7	140	4,71	254
Control	2,9	100	4,1	100	1,85	100

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

	24 horas		36 horas		48 horas	
Nº de muestra	Concentración de etanol (g/l)	% de rendimiento	Concentración de etanol (g/l)	% de rendimiento	Concentración de etanol (g/l)	% de rendimiento
P132	2,8	130	3,4	188	8,1	176
P132-10	7,3	344	11,9	655	15,8	342
P132-100	5,2	247	8,6	472	13,3	288
A132	12,2	575	14,7	812	14,9	324
A132-10	15,1	710	18,7	1033	26,0	565
A132-100	10,9	514	16,7	923	22,2	483
G132	8,0	375	12,9	713	13,3	288
G132-10	10,1	476	16,0	884	22,3	485
G132-100	8,6	406	15,2	837	21,6	470
WS132	9,8	460	14,9	820	17,9	389
WS132-10	7,8	370	16,1	890	19,3	418
NS132-100	9,1	429	15,0	829	15,1	328
Muestra A*	13,2	156	19,0	166	20,6	160
Control	2,1	100	1,8	100	4,6	100

5

Las muestras en negrita fueron los más altos productores de etanol, sobre 20 g/l y similares a las concentraciones en hidrolizados de madera (H.K. Sreenath and T.W. Jeffries Bioresource Technology 72 (2000) 253-260).

* Analizadas en el experimento de matraz de agitación posterior.

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

	24 horas		30 horas		36 horas	
Nº de muestra	Concentración de etanol (g/l)	% de rendimiento	Concentración de etanol (g/l)	% de rendimiento	Concentración de etanol (g/l)	% de rendimiento
P132	7,5	85	6,8	84	7,5	93
P132-10	7,5	85	4,8	59	6,8	84
P132-100	7,3	83	6,2	77	7,1	88
A132	9,6	109	8,3	103	9,1	112
A132-10	9,2	105	8,4	105	8,8	109
A132-100	8,2	93	7,6	94	7,6	93
WS132	7,9	89	7,1	88	7,7	94
WS132-10	8,2	93	6,8	85	7,3	90
NS132-100	8,7	98	6,9	86	8,3	102
G132	8,7	99	7,1	88	8,1	99
G132-10	7,8	88	7,0	88	7,3	90
G132-100	8,6	98	7,8	98	8,3	102
Control	8,8	100	8,0	100	8,1	100

Resultados del análisis de concentración de células

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

20

% células = (número de células en la muestra/número de células de control) x 100

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

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

5

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

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

10

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

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

WS132-100	5,15	62	2,89	65
Control	8,27	100	4,47	100

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

5 Resumen

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

10

Tabla 43. Equipamiento y frecuencia de mantenimiento

Equipo	Fabricante	Frecuencia de mantenimiento
Agitadores (2)	B. Braun Biotech, Certomat BS-1	Trimestral
Espectrofotómetro	Unicam, UV300	Semestral
YSI Biochem Analyzer	Interscience, YSI	Mensual

Tabla 44. Componentes de YSI usados en el estudio de matraz de agitación

15

Componente	Nº catálogo	Nº lote
Membrana de etanol YSI	2786	07L100153
Estándar de etanol YSI (3,2 g/l)	2790	012711040
Tampón de etanol YSI	2787	07M1000053, 07100215

Tabla 45. Productos químicos usados para la fermentación en matraz de agitación

Componente de medio	Fabricante	Nº referencia	Nº lote
Urea	ScholAR Chemistry	9472706	AD-7284-43
Base de nitrógeno de levadura	Becton Dickinson	291940	7128171
Peptona	Becton Dickinson	211677	4303198
Caldo YM	Becton Dickinson	271120	6278265
Complejo enzimático Accellerase®	Genencor	Accellerase® 1000	1600794133
Xilosa	BioChemika	95731	1304473 51707231
Glucosa	Sigma	G-5400	107H0245

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

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

Un conjunto de matraces duplicados por materia prima contenían el complejo enzimático Accellerase® (1,25 ml por matraz, la dosis más alta recomendada es 0,25 ml por gramo de biomasa, Genencor) para intentar la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF).

- 5 El otro conjunto de matraces duplicados no contenía el complejo enzimático Accellerase®. Se analizó un total de 52 matraces.

- 10 También se analizaron 6 matraces de control. Los matraces de control positivo contenían celulosa en polvo SolkaFloc 200 NF (lote nº UA158072, International Fiber Corporation) en una concentración de 2,5 gramos por matraz de 100 ml (25 gramos por litro) con o sin adición del complejo enzimático Accellerase®. Además, también se usó un control que contenía solo azúcares (glucosa y xilosa).

Tabla 46. La cantidad de cada carga de alimentación agregada a cada 15 matraz

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

15

Análisis

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

20

Resultados

25

Tabla 47. Resultados de los matraces de control

Control	Concentración de etanol (g/l)			
	24 horas	36 horas	48 horas	96 horas
Que contiene glucosa, no celulosa, no enzima	13,20	19,00	20,60	21,60
Que contiene celulosa cristalina (Solka Floc), no azúcar, no enzima	0,00	0,00	0,00	0,00
Que contiene celulosa cristalina (Solka Floc) a 25 g/l, no azúcar, Accellerase® agregada	6,56	7,88	9,80	8,65

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

30

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

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

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

5 Ejemplo 29 - Ensayo de celulasa

Resumen

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

Protocolo

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

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

Lote n°: 107H0245) en agua destilada. Una vez disuelta, el volumen total se llevó a 1 litro con agua destilada en un matraz aforado. El patrón se preparó de nuevo cada semana y se almacenó a 4 °C.

Tabla 50. Cantidad de cada muestra agregada

5

Número de Xyleco	Cantidad agregada al tubo (g/20 ml)
P132	0,5
P132-10	0,5
P132-100	0,5
A132	0,75
A132-10	0,75
A132-100	0,75
G132	0,75
G132-10	0,75
G132-100	0,75
WS132	0,75
WS 132-10	0,75
WS132-100	0,75
Muestra A	0,75
SolkaFloc 200NF (Control)	0,2
Control negativo	0

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

Componente	N° catálogo	N° lote
Membrana de glucosa YSI	2365	07D100124
Tampón de glucosa YSI	2357	014614A

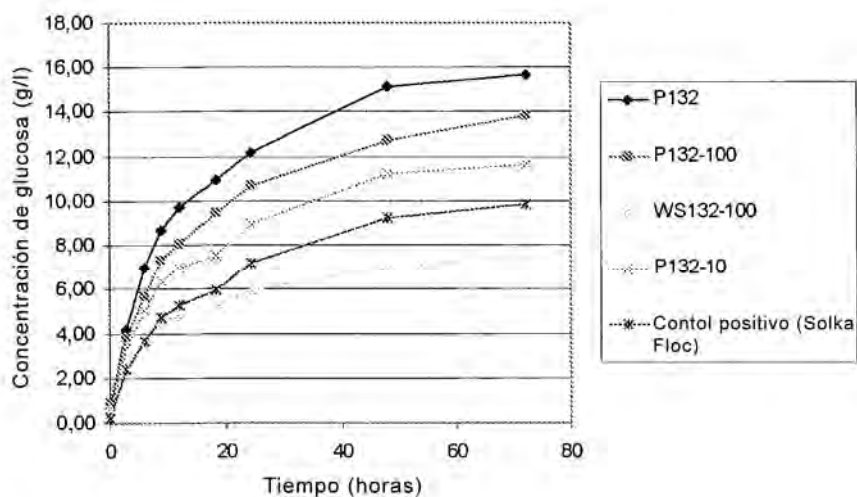
10 Resultados

Tabla 52. Resultados del ensayo de celulasa

Número de muestra	Concentración de glucosa (mg/ml) en el momento de la incubación (horas)								
	0	3	6	9	12	18	24	48	72
P132	0,59	4,19	7,00	8,72	9,70	10,95	12,19	15,10	15,65
P132-10	0,36	3,37	5,08	6,39	6,98	7,51	8,99	11,25	11,65
P132-100	0,91	3,86	5,67	7,31	8,08	9,47	10,70	12,70	13,80
A132	0,39	1,51	1,92	2,40	2,64	3,04	3,30	3,90	4,06
A132-10	0,42	1,80	2,27	2,63	2,86	3,16	3,43	4,02	4,14
A132-100	0,46	2,09	2,72	3,16	3,43	3,78	4,09	4,84	5,26
G132	0,40	1,16	1,35	1,52	1,60	1,67	1,85	2,10	2,21
G132-10	0,34	1,34	1,64	1,95	2,03	2,09	2,36	2,77	3,02
G132-100	0,61	1,84	2,32	2,89	3,14	3,52	3,97	4,81	5,44
WS132	0,35	1,48	1,81	2,14	2,26	2,50	2,70	3,18	3,26
WS132-10	0,44	1,77	2,22	2,60	2,76	2,61	3,15	3,62	3,82
WS132-100	0,70	2,76	3,63	4,59	4,78	5,29	5,96	6,99	7,43
Muestra A	0,42	1,09	1,34	1,55	1,69	1,66	2,17	2,96	3,71
Control negativo (no muestra)	0,03	0,03	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02
Control	0,17	2,38	3,65	4,71	5,25	5,98	7,19	9,26	9,86

positivo (SolkaFloc)									
-------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Gráfica 1- Concentración de glucosa (4 mejores productores)



5 La cantidad de celulosa digerida en el tubo se calculó de la siguiente manera:

g/mL de glucosa x 20 ml (volumen de muestra) x 0,9 (para corregir la molécula de agua agregada después de la hidrólisis de celulosa)

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

g de celulosa digerida/g de muestra agregada (véase la tabla 5 para detalles) * 100

Tabla 53. Resultados del ensayo de celulasa

15

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

Ejemplo 30- Fermentación en matraz de agitación usando *Pichia stipitis***Resumen**

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

Protocolo

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

Tabla 54. Equipamiento y frecuencia de mantenimiento

Equipo	Fabricante, nombre	Frecuencia de mantenimiento
Agitadores (2)	B. Braun Biotech, Certomat BS-1	Trimestral
Espectrofotómetro	Unicam, UV300	Semestral
YSI Biochem Analyzer	Interscience, YSI	Mensual

15 Tabla 55. Componentes de YSI usados en el estudio de matraz de agitación

Componente	Nº referencia	Nº lote
Membrana de etanol YSI	2786	07M100361
Estándar de etanol YSI (3,2 g/l)	2790	1271040
Tampón de etanol YSI	2787	07J100215

Tabla 56. Productos químicos usados para la fermentación en matraz de agitación

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

20

Desarrollo de la siembra

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

25

Se preparó un banco de células de trabajo de *P. stipitis* NRRL Y-7124 a partir de cultivo liofilizado rehidratado de ARS Culture Collection. Crioviales que contenían cultivo de *P. stipitis* en glicerol al 15% en v/v se almacenaron a -75 °C. Una parte del banco de células de trabajo congelado se sembró por estrías en caldo para hongos y levaduras (YM) + agar 20 g/l (pH 5,0) y se incubó a 30 °C durante 2 días. Las placas se mantuvieron durante 2 días a 4 °C

30

antes de usar. Un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 100 ml de medio (glucosa 40 g/l, base nitrogenada de levadura 1,7 g/l, urea 2,27 g/l, peptona 6,56 g/l, xilosa 40 g/l, pH 5,0) se inoculó con una colonia y se incubó durante 24 horas a 25 °C y 100 rpm. Después de 23 horas de crecimiento, se tomó una muestra y se analizó la densidad óptica (600 nm en un espectrofotómetro de UV) y pureza (tinción de Gram). Basándose en estos resultados, se escogió un matraz (llamado el matraz de siembra) con una DO entre 4 y 8 y con una tinción de Gram transparente

35

para inocular todos los matraces de ensayo.

Se llevaron a cabo tres experimentos usando las muestras A132-10, A132-100, G132-10 y G132-100. En el experimento nº 1 se ensayó la concentración de etanol en estas cuatro muestras en concentraciones variables de xilosa y con concentraciones constantes de glucosa. En el experimento nº 2 se ensayó la concentración de etanol en estas cuatro muestras con el doble de concentración de materia prima que la usada en los experimentos de la tabla 36. Finalmente, en el experimento nº 3 se ensayó la concentración de etanol en estas cuatro muestras mientras se variaba tanto la concentración de xilosa como la de glucosa, simultáneamente.

40

Experimento n° 1 - Variación de la concentración de xilosa

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

5

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

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

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

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

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

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

30

Análisis

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

Se analizó en un total de 292 muestras la concentración de etanol usando un analizador bioquímico YSI basado en el ensayo de la alcohol deshidrogenasa (YSI, Interscience). Las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante se conservó a -20 °C. Las muestras se diluyeron a entre 0-3,2 g/l de etanol antes del análisis. Se analizó un patrón de etanol 2,0 g/l aproximadamente cada 30 muestras para asegurar que se mantenía la integridad de la membrana.

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

Experimento n° 2 - Análisis de la concentración 2 X de la carga de alimentación

Los recipientes de ensayo (un total de 8 matraces Erlenmeyer de 250 ml) contenían 100 ml de medio. El medio contenía glucosa 40 g/l, xilosa 40 g/l, base nitrogenada de levadura 1,7 g/l (Becton Dickinson n° 291940), urea 2,27 g/l (Scholar Chemistry n° 9472706), y peptona 6,56 g/l (Becton Dickinson n° 211677). Los matraces se prepararon como en el experimento n° 1. Las muestras de ensayo (A132-10, A132-100, G132-10 y G132-100, con 10 g por 100 ml) se añadieron en el momento de la inoculación (en lugar de antes de) para reducir la posibilidad de contaminación. Además de las muestras de ensayo, se añadió a cada matraz 1 ml (1% en v/v) de material del matraz de siembra. Los matraces se incubaron a 30 °C y 150 rpm durante 72 horas.

Análisis

Las muestras eran de los 8 matraces de ensayo a un tiempo de incubación de 0, 6, 12, 24, 36, 48 y 72 horas. El análisis de etanol de las 56 muestras se llevó a cabo como para el experimento n° 1 y se dan en la tabla 59. Se llevó a cabo un recuento celular en la muestra de 72 horas como para el experimento n° 1 y se presenta en la tabla 60.

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

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

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

Muestra	Concentración de células (x 10 ⁸ /ml)
A132-10	4,06
A132-100	5,37
G132-10	5,18
G132-100	4,47

Experimento n° 3 - Concentraciones variadas de xilosa y glucosa

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

Tabla 61. Composición del medio de los matraces del experimento n° 3

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

Los recipientes de ensayo (un total de 32 matraces Erlenmeyer de 250 ml) contenían 100 ml de medio. Se prepararon 4 tipos diferentes de medio con la cantidad de xilosa y glucosa indicada en la tabla 61. Además, el medio contenía base nitrogenada de levadura 1,7 g/l (Becton Dickinson n° 291940), urea 2,27 g/l (Scholar Chemistry n° 9472706), y peptona 6,56 g/l (Becton Dickinson n° 211677). Los matraces se prepararon como en el experimento n° 1. Las muestras de ensayo (A132-10, A132-100, G132-10 y G132-100) se añadieron en el momento de la inoculación (en lugar de antes de) para reducir la posibilidad de contaminación. Además de las muestras de ensayo, se añadió a cada matraz 1 ml (1% en v/v) de material del matraz de siembra. Los matraces se incubaron a 30 °C y 150 rpm durante 72 horas.

Análisis

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

Tabla 62. Muestra resultados etanol A132-10

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

15 * Análisis del experimento nº 3

Tabla 63. Muestra resultados etanol A132-100

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

* Análisis del experimento nº 3

** Todos los resultados están basados en el análisis de un matraz.

Tabla 64. Muestra resultados etanol G132-10

5

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

* Análisis del experimento nº 3

Tabla 65. Muestra resultados etanol G132-100

10

Tiempo de muestra	Concentración de etanol (g/l)								
	0 % xilosa	10 % p/v xilosa	25 % p/v xilosa	50 % p/v xilosa	100 % p/v xilosa	0 % azúcares*	10 % azúcares*	25 % azúcares*	50 % azúcar*
0	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06
6	0,07	0,07	0,08	0,08	0,07	0,04	0,05	0,05	0,06
12	0,60	0,56	0,67	0,58	0,71	0,13	1,37	1,48	1,44
24	13,05	14,45	14,90	13,95	12,05	0,03	3,67	7,62	10,55
36	15,10	17,10	18,25	18,20	19,25	0,01	3,09	8,73	16,10
48	14,40	17,00	19,35	22,55	24,45	0,01	1,91	7,76	15,85
72	14,70	15,40	18,45	22,10	27,55	0,03	0,01	5,08	14,30
24 horas tras la adición	--	--	--	--	25,20	--	--	--	--
48 horas tras la adición	--	--	--	--	24,60	--	--	--	--

* Análisis del experimento nº 3

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

Resultados

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

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

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

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

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

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

Muestra	Concentración de células ($\times 10^8$ /ml)
A132-10	10,17
A132-100	3,38
G132-10	3,94
G132-100	6,53

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

Resumen

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

Tabla 68. Condiciones para análisis de toxicidad

Variable	Organismo	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 24858	<i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124
Volumen de inoculación (ml)	0,5-1 (objetivo $6-7 \times 10^5$ células/ml)	1 (objetivo $3-4 \times 10^6$ células/ml)
Repetición de prueba	Matraces simples	
Temperatura de incubación (± 1 °C)	25 °C	25 °C
Velocidad de agitador (rpm)	200	125
Tipo de recipiente	Matraz Erlenmeyer 500 ml	Matraz Erlenmeyer 250 ml
Volumen medio	100 ml	100 ml
Tiempo de incubación total (horas)	72	72
Análisis de etanol (horas)	0, 6, 12, 24, 36, 48, 72	0, 6, 12, 24, 36, 48, 72

Recuentos de células (horas)	24, 72	24, 72
pH	0 horas	0 horas

Protocolo

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

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

Tabla 69. Productos químicos y materiales usados para análisis de toxicidad

Componente de medio	Fabricante	Nº referencia	Nº lote
Urea	ScholAR Chemistry	9472706	AD-7284-43
Base de nitrógeno de levadura	Becton Dickinson	291940	7128171
Peptona	Becton Dickinson	211677	4303198
Xilosa	Alfa Aesar	A10643	10130919
Glucosa	Sigma	G-5400	107H0245
Extracto de levadura	Becton Dickinson	288620	4026828
Caldo YM	Becton Dickinson	271120	6278265

Tabla 70. Componentes de YSI usados en el estudio de toxicidad

Componente	Nº de catálogo
Membrana de etanol YSI	2786
Estándar de etanol YSI (3,2 g/l)	2790
Tampón de etanol YSI	2787

Muestras analíticas

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

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

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

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

Se preparó un banco de células de trabajo de *S. cerevisiae* ATCC 24858 a partir de un cultivo liofilizado rehidratado obtenido de la American Type Culture Collection. Crioviales que contienen cultivo de *S. cerevisiae* en glicerol al 15% en v/v se almacenan a -75 °C. Una parte del material del banco de trabajo congelado se sembrará en estrías sobre un caldo para hongos (YM) + agar 20 g/l (pH 5,0) y se incubará a 30 °C durante 2 días. Erlenmeyer de 250 ml que contenía 50 ml de medio (glucosa 20 g/l, extracto de levadura 3 g/l y peptona 5,0 g/l, pH 5,0) se inoculó con una colonia de la placa de YM y se incubó durante 24 horas a 25 °C y 200 rpm. Después de 23 horas de crecimiento, se tomó una muestra y se analizó la densidad óptica (600 nm en un espectrofotómetro de UV) y pureza (tinción de Gram). Basándose en estos resultados, se escogió un matraz (llamado el matraz de siembra) con una DO de 915 y tinción de Gram transparente para inocular todos los matraces de ensayo. Después de 23 horas de cultivo, el matraz de siembra tenía una DO baja (5,14) y recuento celular ($1,35 \times 10^8$ células/ml). Hay que

indicar que la colonia tomada de la placa de siembra era menor de la habitual. Por lo tanto, se añadieron 0,5 ml de material de siembra (contrariamente a lo planeado de 0,1 ml) a cada recipiente de ensayo.

Los recipientes de ensayo eran matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían 100 ml de medio estéril descrito antes. Todos los matraces se trataron en autoclave a 121 °C y 15 psi antes de la adición de los materiales de ensayo. Los materiales de ensayo no se esterilizaron, ya que el tratamiento en autoclave cambiará el contenido de las muestras. Las muestras de ensayo se añadieron en el momento de la inoculación (en lugar de antes de) para reducir la posibilidad de contaminación. Además de las muestras de ensayo, se añadieron a cada matraz 0,5-1,0 ml (0,5-1,0% en v/v) de material del matraz de siembra. Los matraces se incubaron como se ha descrito antes durante 72 horas.

***Pichia stipitis* (ARS Culture Collection)**

Se preparó un banco de células de trabajo de *P. stipitis* NRRL Y-7124 a partir de cultivo liofilizado rehidratado de ARS Culture Collection. Crioviales que contienen cultivo de *P. stipitis* en glicerol al 15% en v/v se almacenan a -75 °C. Una parte del banco de células de trabajo congelado se sembró por estrías en caldo para hongos y levaduras (YM) + agar 20 g/l (pH 5,0) y se incubó a 30 °C durante 2 días. Las placas se mantuvieron durante 5 días a 4 °C antes de usar. Un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 100 ml de medio (glucosa 40 g/l, base nitrogenada de levadura 1,7 g/l, urea 2,27 g/l, peptona 6,56 g/l, xilosa 40 g/l, pH 5,0) se inoculó con una colonia y se incubó durante 24 horas a 25 °C y 125 rpm. Después de 23 horas de crecimiento, se tomó una muestra y se analizó la densidad óptica (600 nm en un espectrofotómetro de UV) y pureza (tinción de Gram). Basándose en estos resultados, se escogió un matraz (llamado el matraz de siembra) con una DO de 5-9 y con una tinción de Gram transparente para inocular todos los matraces de ensayo.

Los recipientes de ensayo eran matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 100 ml de medio estéril descrito antes. Todos los matraces se trataron en autoclave vacíos a 121 °C y 15 psi y se añadió medio esterilizado por filtración (filtro de 0,22 µm) a los matraces antes de la adición de los materiales de ensayo. Los materiales de ensayo no se esterilizaron, ya que el tratamiento en autoclave cambiará el contenido de las muestras y la esterilización por filtración no es adecuada para la esterilización de sólidos. Las muestras de ensayo se añadieron en el momento de la inoculación (en lugar de antes de) para reducir la posibilidad de contaminación. Además de las muestras de ensayo, se añadió a cada matraz 1 ml (1% en v/v) de material del matraz de siembra. Los matraces se incubaron como se ha descrito antes durante 72 horas.

Análisis

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

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

Cálculos

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

$$\begin{aligned} \text{\% de rendimiento} &= (\text{concentración de etanol en el matraz de ensayo/etanol en el control}) * 100\% \\ \text{células} &= (\text{número de células en el matraz de ensayo/número de células en el matraz de control}) * 100 \end{aligned}$$

Resultados

El matraz de siembra de *S. cerevisiae* tenía una densidad óptica (600 nm) de 5,14 y una concentración celular de $1,35 \times 10^8$ células/ml. Una mitad del material del matraz de siembra se añadió a cada uno de los matraces de ensayo. Por lo tanto, la concentración celular de partida en cada matraz era $6,75 \times 10^5$ /ml. Durante la segunda semana de ensayo, el matraz de siembra de *S. cerevisiae* tenía una densidad óptica (600 nm) de 4,87 y una

concentración celular de $3,15 \times 10^7$ células/ml. Se añadió 1 ml del material del matraz de siembra a cada uno de los matraces de ensayo. Por lo tanto, la concentración celular de partida en cada matraz era $6,30 \times 10^5$ /ml. El pH de los matraces de *S. cerevisiae* en el tiempo de toma de muestra de 0 horas se presenta en la tabla 71. El pH del contenido de los matraces estaba dentro del pH óptimo para el crecimiento de *S. cerevisiae* (pH 4-6). No se requería ajuste del pH.

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

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

- 10 * "S" se refiere a sucrosa
 * "C" se refiere a maíz
 * "ST" se refiere a almidón

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

Tabla 72. Concentración de etanol de los matraces con *S. cerevisiae*

Número de muestra	Concentración de etanol (g/l) en los siguientes tiempos (horas)						
	0	6	12	24	36	48	72
P	0,02	0,04	0,38	5,87	7,86	5,41	1,04
P1E	0,03	0,03	0,28	5,10	8,03	5,46	0,58
P5E	0,03	0,04	0,57	8,84	6,38	3,40	0,04
P10E	0,06	0,05	0,65	6,63	7,66	5,57	1,40
P50E	0,04	0,03	0,26	2,80	5,85	8,59	5,68
P100E	0,04	0,02	0,12	3,64	8,26	7,51	3,03
G	0,04	0,04	0,57	10,20	8,24	6,66	2,84
G1E	0,04	0,05	0,46	10,20	9,24	6,94	2,84
G5E	0,11	0,11	0,44	10,00	8,7	6,36	0,88
G10E	0,05	0,04	0,40	9,97	8,41	5,79	0,11
G50E	0,05	0,05	0,48	9,72	8,33	6,13	2,38
A	0,29	0,38	0,48	8,43	8,76	7,09	4,66
A1E	0,34	0,44	0,79	9,66	8,9	7,18	2,64

A5E	0,55	0,45	0,99	9,44	8,96	7,56	3,80
A10E	0,55	0,55	0,93	9,58	8,33	6,28	1,40
A50E	0,22	0,08	0,38	9,38	8,01	5,99	0,98
S	0,03	0,03	0,39	5,73	7,06	10,10	15,90
S1E	0,05	0,06	0,31	7,24	9,52	12,10	14,90
S5E	0,02	0,05	0,34	5,87	7,68	11,90	19,00
S10E	0,03	0,04	0,35	5,88	7,72	11,50	19,30
S30E	0,03	0,05	0,09	5,94	7,97	11,20	20,40
S50E*	0,13	0,19	0,47	5,46	7,96	13,00	18,30
S100E	0,11	0,10	0,21	7,00	10,6	13,80	12,70
C	0,01	0,04	0,32	8,47	7,57	5,48	6,40
C1E	0,00	0,06	0,37	8,93	7,86	5,99	1,37
C5E	0,03	0,05	0,48	9,32	7,92	5,69	1,41
C10E	0,02	0,04	0,52	9,14	7,67	5,34	0,35
C30E	0,02	0,05	0,28	9,15	8,15	5,84	2,47
C50E	0,03	0,06	0,44	9,31	7,79	5,78	1,79
C100E	0,03	0,06	0,58	9,06	6,85	5,95	1,09
ST	0,02	0,05	0,99	8,54	6,69	5,09	0,42
ST1E	0,03	0,04	0,70	8,87	7,29	4,81	1,04
ST5E	0,02	0,04	0,52	8,61	7,16	4,97	0,85
ST10E	0,02	0,05	0,33	8,97	7,05	5,26	0,68
ST30E	0,03	0,04	0,71	8,47	6,96	4,89	0,21
ST50E	0,04	0,07	0,34	8,46	8,19	7,04	3,20
ST100E	0,03	0,10	0,30	9,30	8,62	7,29	4,23
control A	0,01	0,07	0,85	5,92	8,18	7,81	6,26
control B	0,01	0,04	0,27	4,86	6,43	8,01	6,75
control A*	0,04	0,21	1,36	5,19	7,31	7,55	5,16
control B*	0,03	0,20	1,18	5,16	5,96	7,62	5,32

*analizado la semana 2

Véase la tabla 72 para la clave de número de muestra

5

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

Número de muestra	Rendimiento (%) en los siguientes tiempos (horas)			
	24	36	48	72
P	108,9	107,6	68,4	16,0
P1E	94,6	109,9	69,0	8,9
P5E	164,0	87,3	43,0	0,6
P10E	123,0	104,9	70,4	21,5
P50E	51,9	80,1	108,6	87,3
P100E	67,5	113,1	94,9	46,5
G	189,2	112,8	84,2	43,6
G1E	189,2	126,5	87,7	43,6
G5E	185,5	119,1	80,4	13,5
G10E	185,0	115,1	73,2	1,7
G50E	180,3	114,0	77,5	36,6
A	156,4	119,9	89,6	71,6
A1E	179,2	121,8	90,8	40,6
A5E	175,1	122,7	95,6	58,4
A10E	177,7	114,0	79,4	21,5
A50E	174,0	109,7	75,7	15,1
S	106,3	96,6	127,7	244,2
S1E	134,3	130,3	153,0	228,9
S5E	108,9	105,1	150,4	291,9
S10E	109,1	105,7	145,4	296,5

S30E	110,2	109,1	141,6	313,4
S50E*	105,5	119,9	171,3	349,2
S100E	129,9	145,1	174,5	195,1
C	157,1	103,6	69,3	98,3
C1E	165,7	107,6	75,7	21,0
C5E	172,9	108,4	71,9	21,7
C10E	169,6	105,0	67,5	5,4
C30E	169,8	111,6	73,8	37,9
C50E	172,7	106,6	73,1	27,5
C100E	168,1	93,8	75,2	16,7
ST	158,4	91,6	64,3	6,5
ST1E	164,6	99,8	60,8	16,0
ST5E	159,7	98,0	62,8	13,1
ST10E	166,4	96,5	66,5	10,4
ST30E	157,1	95,3	61,8	3,2
ST50E	157,0	112,1	89,0	49,2
ST100E	172,5	118,0	92,2	65,0
control A	109,8	112,0	98,7	96,2
control B	90,2	88,0	101,3	103,7
control A*	100,3	110,1	99,5	98,5
control B*	99,7	89,8	100,4	101,5

*analizado la semana 2

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

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

Número de muestra	Concentración de células (células x 10 ⁹ /ml)		% de células (recuento / control de recuento) *100	
	24 horas	72 horas	24 horas	72 horas
P	0,62	0,96	97,7	139,0
P1E	0,35	1,18	54,1	170,9
P5E	1,13	1,93	177,3	279,5
P10E	0,59	1,42	91,8	205,6
P50E	0,32	1,40	49,4	202,8
P100E	0,45	1,94	70,6	281,0
G	0,74	3,48	116,5	504,0
G1E	0,68	3,65	107,1	528,6
G5E	0,62	3,87	96,5	560,5
G10E	0,70	2,73	109,5	395,4
G50E	0,46	2,10	71,8	304,1
A	0,55	3,53	86,0	511,2
A1E	0,83	3,45	130,7	499,6
A5E	0,67	3,53	104,8	511,2
A10E	0,53	1,95	83,6	282,4
A50E	0,66	1,62	103,5	234,6
S	0,44	1,11	69,5	160,8
S1E	0,44	1,10	68,2	159,3
S5E	0,23	0,99	36,5	143,4
S10E	0,39	0,73	61,2	105,4
S30E	0,31	0,71	48,3	102,1
S50E*	0,44	0,90	86,5	196,5
S100E	0,53	0,84	82,4	121,7
C	0,45	1,81	70,6	262,1

C1E	0,71	2,40	110,6	347,6
C5E	0,53	2,33	83,6	337,4
C10E	0,77	1,55	120,0	224,5
C30E	0,75	1,80	117,6	260,7
C50E	0,64	1,70	100,1	246,2
C100E	0,81	1,51	127,1	218,7
ST	0,75	1,75	117,6	253,4
ST1E	0,57	1,36	89,4	197,0
ST5E	0,58	1,49	90,7	215,8
ST10E	0,61	1,32	95,4	191,2
ST30E	0,59	0,60	91,8	86,9
ST50E	0,59	1,30	91,8	188,3
ST100E	0,41	1,24	63,5	179,6
control A	0,81	0,79	127,1	114,1
control B	0,47	0,59	72,9	85,9
control A*	0,66	0,42	131,2	91,7
control B*	0,35	0,50	69,0	108,1

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

Tabla 75. pH de los matraces de *P. stiptis* en el tiempo de muestra de 0 horas

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

La concentración de etanol y el rendimiento en los matraces de *P. stiptis* se presentan en las tablas 76 y 77. Las mayores concentraciones de etanol eran de las series G y A. Los matraces C-30e, C-50e y C-100e también contenían concentraciones altas de etanol. La concentración celular y el % de células en los matraces de *P. stiptis*

se presentan en la tabla 78. Se observaron concentraciones celulares bajas en los matraces con la designación S. También se observaron recuentos celulares bajos en los matraces que contenían las muestras C, C1E, C5E y C10E en el tiempo de toma de muestra de 24 horas.

5 **Tabla 76. Concentración de etanol en los matraces con *P. stipitis***

Número de muestra	Concentración de etanol (g/l) en los siguientes tiempos (horas)						
	0	6	12	24	36	48	72
P	0,01	0,05	0,26	4,98	8,57	14,10	17,00
P1E	0,02	0,03	0,04	4,24	9,03	12,40	17,30
P5E	0,02	0,03	0,42	6,72	12,40	15,60	18,60
P10E	0,02	0,02	0,01	1,38	8,69	13,00	17,00
P50E	0,01	0,02	0,02	0,03	3,77	10,50	16,90
P100E	0,02	0,03	0,02	3,75	10,50	15,60	18,80
G	0,02	0,08	0,20	10,80	17,70	19,40	25,40
G1E	0,04	0,12	0,50	12,20	19,60	23,80	28,60
G5E	0,07	0,14	0,73	12,50	19,10	24,50	27,50
G10E	0,04	0,19	0,42	10,20	19,10	22,90	28,20
G50E	0,05	0,22	0,25	8,73	18,40	22,20	28,00
A	0,13	0,28	0,82	16,10	19,40	19,30	18,60
A1E	0,22	0,59	1,08	16,10	22,40	27,60	27,70
A5E	0,32	0,43	0,43	10,60	22,10	27,10	28,10
A10E	0,33	0,61	1,15	14,90	22,00	27,10	27,90
A50E	0,30	0,10	0,47	13,40	20,20	24,80	27,10
S	0,01	0,01	0,26	3,68	7,50	10,20	13,30
S1E	0,02	0,02	0,22	4,98	9,22	11,60	14,20
S5E	0,02	0,02	0,19	4,25	8,50	11,70	14,70
S10E	0,03	0,02	0,17	2,98	8,87	11,90	14,70
S30E	0,08	0,05	0,03	2,96	8,73	12,60	16,50
S50E	0,08	0,05	0,04	2,24	6,13	7,95	12,50
S100E	0,11	0,10	0,08	3,36	7,82	10,50	13,90
C*	0,02	0,03	0,05	0,23	1,66	2,68	6,57
C1E*	0,03	0,03	0,03	0,07	0,95	1,85	10,20
C5E*	0,03	0,02	0,04	0,05	0,37	1,59	4,80
C10E*	0,03	0,04	0,04	0,05	3,91	15,20	28,30
C30E	0,01	0,03	0,60	12,30	21,20	26,00	27,20
C50E	0,02	0,02	0,45	12,30	19,50	23,80	29,20
C100E	0,05	0,04	0,38	11,40	18,70	22,90	27,70
ST	0,03	0,03	0,37	6,69	10,70	13,50	10,90
ST1E	0,01	0,00	0,48	5,24	9,37	12,50	15,70
ST5E	0,02	0,03	0,29	5,45	10,10	11,90	14,70
ST10E	0,02	0,02	0,42	5,60	9,44	12,20	14,90
ST30E	0,05	0,04	0,73	5,70	9,50	12,10	15,20
ST50E	0,02	0,05	0,19	5,16	9,47	12,70	15,20
ST100E*	0,07	0,15	0,11	4,98	10,70	15,40	18,80
control A	0,02	0,03	0,37	4,05	7,50	9,24	11,50
control B	0,02	0,02	0,30	4,22	7,44	9,44	11,50
control A*	0,02	0,05	0,69	4,86	8,69	11,10	16,40
control B*	0,02	0,05	0,74	5,96	10,80	13,00	14,00

*analizado la semana 2

10 **Tabla 77. Rendimiento en los matraces con *P. stipitis***

Número de muestra	Rendimiento (%) en los siguientes tiempos (horas)			
	24	36	48	72
P	120,3	114,7	151,0	147,8

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

*analizado en la semana 2

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

5

Número de muestra	Concentración de células (células x 10 ⁶ /ml)		% de células (recuento / control de recuento) *100	
	24 horas	72 horas	24 horas	72 horas
P	2,78	11,00	80,6	148,0
P1E	2,10	7,20	60,9	96,9
P5E	2,93	9,68	84,9	130,3
P10E	1,42	7,73	41,2	104,0
P50E	0,33	8,63	9,6	116,2
P100E	1,58	8,25	45,8	111,0
G	1,50	14,20	43,5	191,1
G1E	3,90	8,10	113,0	109,0
G5E	2,93	6,45	84,9	86,8

G10E	4,35	13,30	126,1	179,0
G50E	3,75	11,60	108,7	156,1
A	7,43	8,55	215,4	115,1
A1E	4,13	9,53	119,7	128,3
A5E	3,68	9,75	106,7	131,2
A10E	4,50	7,50	130,4	100,9
A50E	6,23	5,33	180,6	71,7
S	3,53	5,55	102,3	74,7
S1E	3,00	3,30	87,0	44,4
S5E	3,68	3,00	106,7	40,4
S10E	1,73	5,78	50,1	77,8
S30E	2,55	5,48	73,9	73,8
S50E	2,63	6,15	76,2	82,8
S100E	2,25	4,43	65,2	59,6
C*	0,00	0,26	0,00	7,2
C1E*	0,00	0,36	0,00	9,9
C5E*	0,00	0,08	0,00	2,1
C10E*	0,00	5,85	0,00	160,7
C30E	5,78	4,20	167,5	56,5
C50E	3,40	7,35	98,6	98,9
C100E	1,98	6,60	57,4	88,8
ST	2,55	7,65	73,9	103,0
ST1E	2,00	8,70	58,0	117,1
ST5E	1,85	6,75	53,6	90,8
ST10E	1,83	5,40	53,0	72,7
ST30E	2,78	6,15	80,6	82,8
ST50E	1,33	3,45	38,6	46,4
ST100E*	4,35	3,83	59,8	105,2
control A	3,60	7,13	104,3	96,0
control B	3,30	7,73	95,7	104,0
control A*	7,50	3,23	103,0	88,7
control B*	7,05	4,05	96,8	111,3

*analizado la semana 2

Resumen de los resultados de toxicidad celular

5

Zymomonas mobilis

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

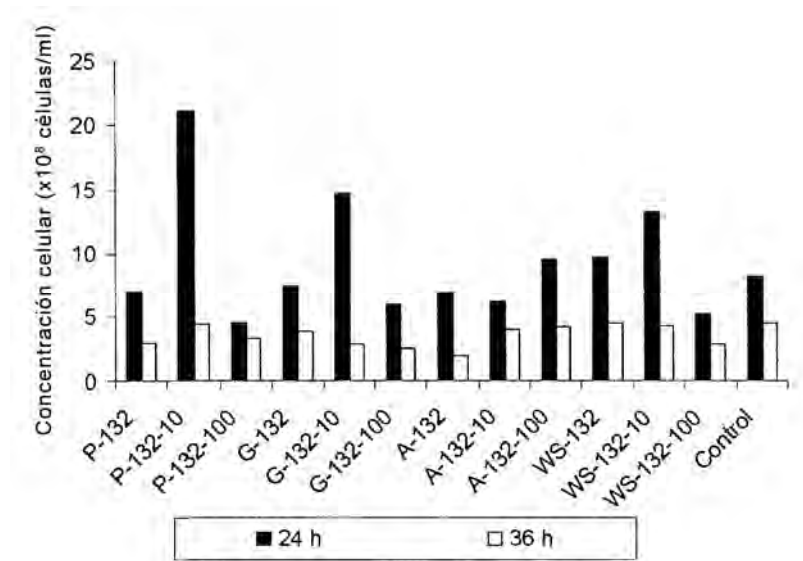
10

En el tiempo de medición de 36 horas, se observó una disminución en el número de células (p. ej., debido a una pérdida de células o muerte celular) para todas las muestras, incluyendo el control. La mayor disminución en el número de células se observó para aquellas muestras que contenían P-132-10, G-132-10. La causa probable de este efecto es común a todas las muestras, incluyendo el control. Por lo tanto, la causa de este efecto no son los sustratos de ensayo, puesto que estos varían en cada muestra, y no están presentes en el control. Las posibles explicaciones para esta observación incluyen las condiciones de cultivo inadecuadas (p. ej., temperatura, composiciones del medio) o concentraciones de etanol en la muestra.

15

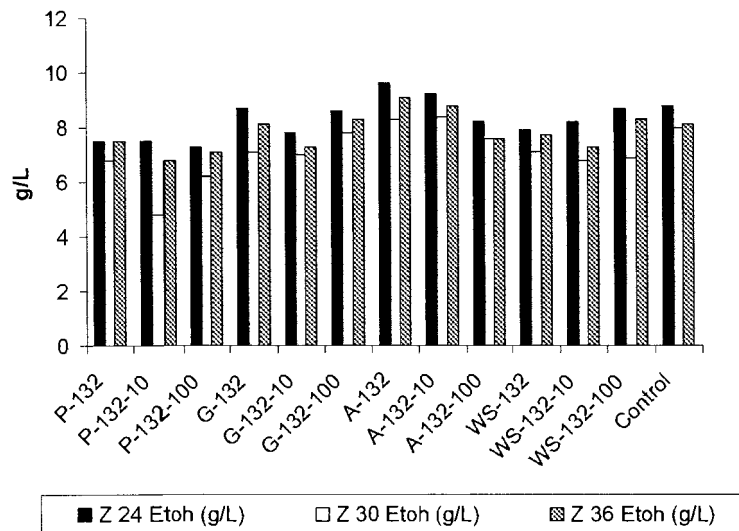
20

Gráfica 1A. Concentraciones de células para *Z. mobilis*



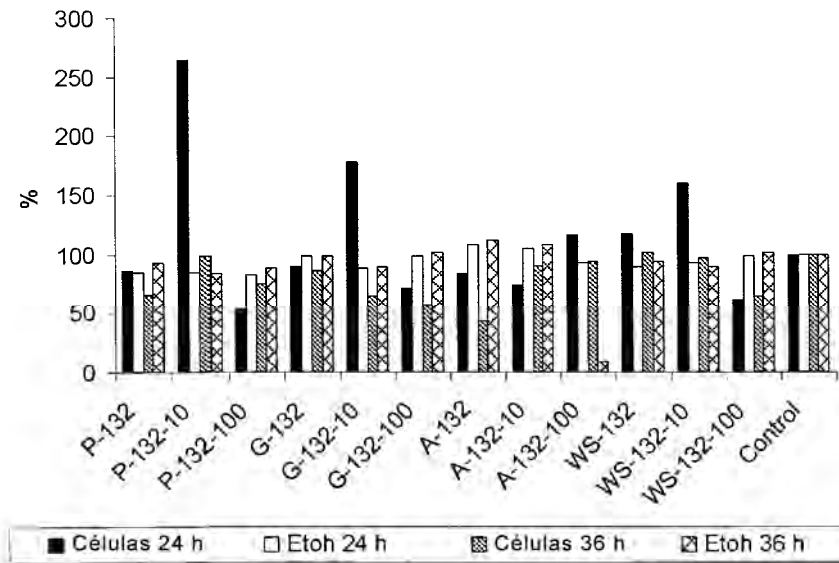
Como se muestra en la gráfica 1B, todas las células producían cantidades comparables de etanol (p. ej., 5-10 g/l) en cada tiempo de medición, independientemente del sustrato. De acuerdo con los datos del número de células presentados en la gráfica 1A, la concentración de etanol en cada muestra se hizo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

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



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

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

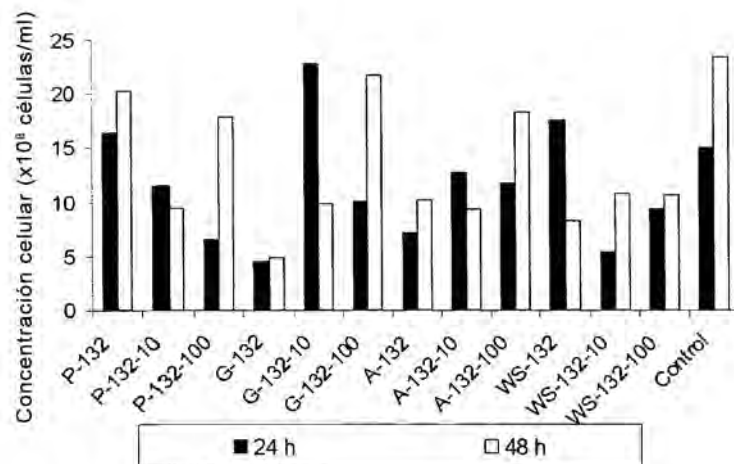


5 *Pichia stipitis*

Como se muestra en la gráfica 2A, los números de células eran comparables con el control.

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

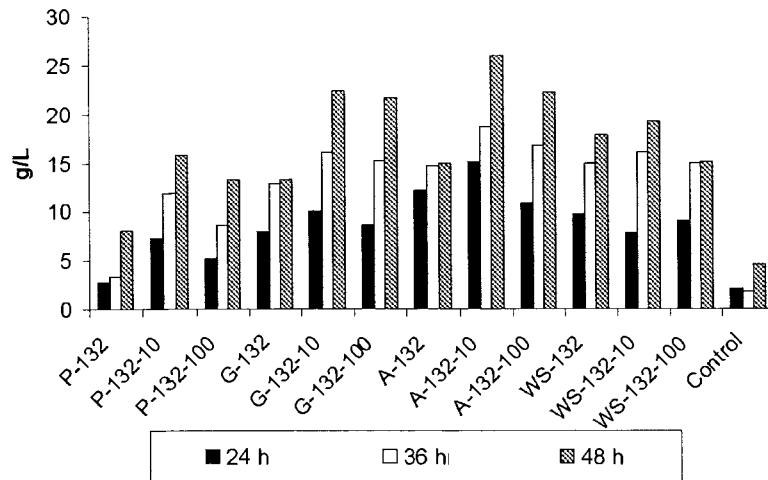
Gráfica 2A. Concentraciones de células para *P. stipitis*



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

10

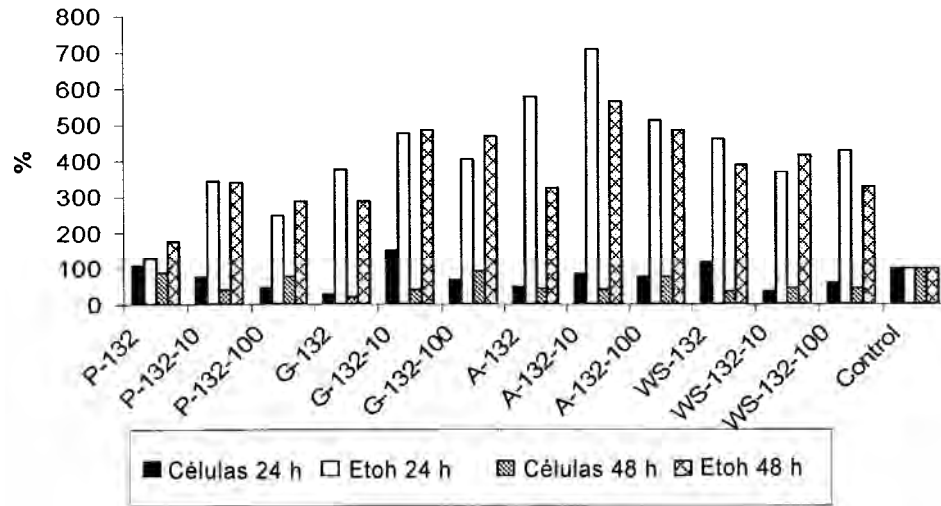
Gráfica 2B. Concentraciones de etanol para *P. stipitis*



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

20

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

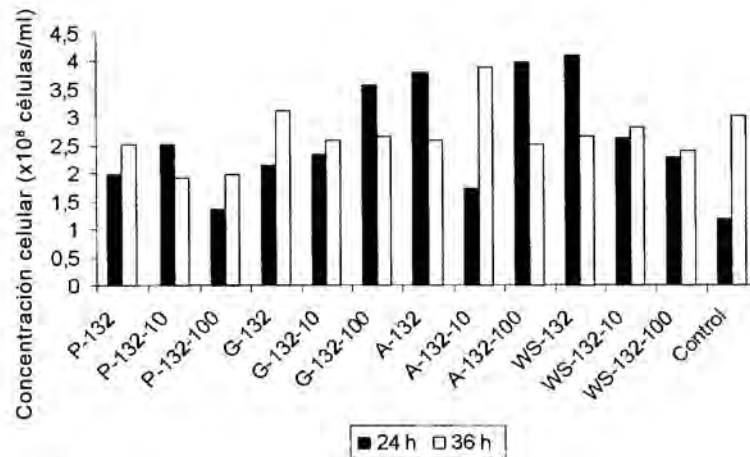


5 *Saccharomyces cerevisiae*

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

10

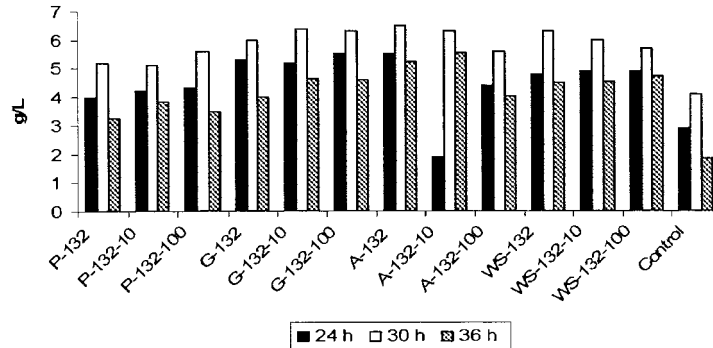
Gráfica 3A. Concentraciones de células para *S. cerevisiae*



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

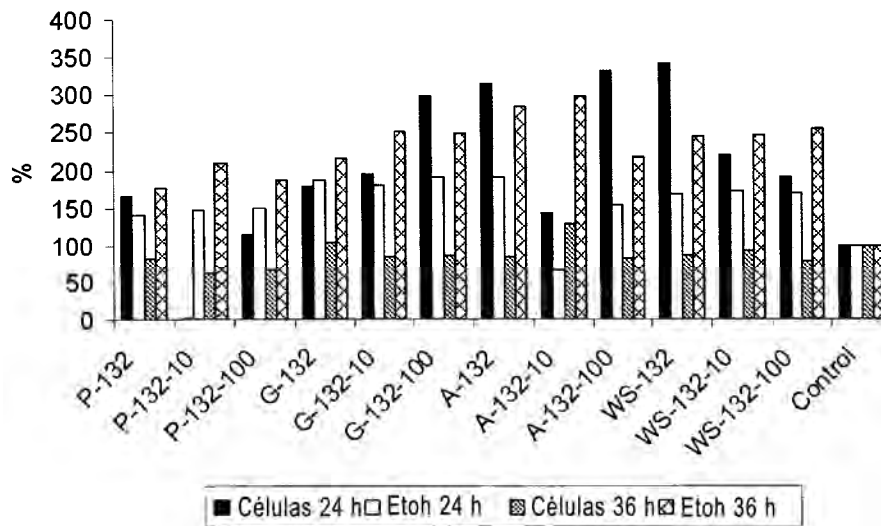
20

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



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

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



10

En conclusión, ninguna de las muestras analizadas pareció ser tóxica en *Z. mobilis*, *P. stipitis* y *S. cerevisiae*. Además, *P. stipitis* pareció ser el más eficiente de los tres tipos celulares para producir etanol a partir de los sustratos experimentales analizados.

15 **Ejemplo 32 - Producción de alcohol usando pretratamiento de irradiación-ultrasonidos**

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

25

La figura 39 muestra un procedimiento esquemática de un sistema de conversión de biomasa configurado para procesar mijo. El subsistema de preparación de la alimentación procesa materia prima de biomasa bruta para separar objetos extraños y proporcionar partículas de tamaño regular para el procesamiento posterior. El subsistema de pretratamiento cambia la estructura molecular (p. ej., reduce el peso molecular medio y la cristalinidad) de la

materia prima de biomasa por irradiación de la materia prima de biomasa, mezcla de la materia prima de biomasa irradiada con agua para formar una suspensión, y aplicación de energía ultrasónica a la suspensión. La irradiación y los ultrasonidos convierten los componentes celulósicos y lignocelulósicos de la materia prima de biomasa en materiales fermentables. El subsistema del procedimiento primario fermenta la glucosa y otros azúcares de bajo peso molecular presentes después del pretratamiento para formar alcoholes.

Preparación de la alimentación

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

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

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

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

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

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

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

Pretratamiento

Una cinta transportadora lleva la materia prima de biomasa desde el subsistema de preparación de la alimentación al subsistema de pretratamiento (114). Como se muestra en la figura 40, en el subsistema de pretratamiento

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

15 Irradiación con haz de electrones

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

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

35 Sonicación

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

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

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

Dentro de la celda de flujo (1224), el transductor ultrasónico (1226) transmite energía ultrasónica a la suspensión (1216) cuando la suspensión fluye a través de la celda de flujo (1224). El transductor ultrasónico (1226) convierte la energía eléctrica en energía mecánica de alta frecuencia (p. ej., energía ultrasónica), que después es suministrada a
 60 la suspensión a través del impulsor (48). Los transductores ultrasónicos están disponibles en el comercio (p. ej., de

Hielscher USA, Inc. of Ringwood, New Jersey), que son capaces de suministrar una potencia continua de 16 kW.

La energía ultrasónica que viaja a través del impulsor (1248) en el volumen del reactor (1244) crea una serie de compresiones y rarefacciones en la corriente del proceso (1216) con una intensidad suficiente para crear cavitación en la corriente del proceso (1216). La cavitación disgrega los componentes de la materia prima de biomasa incluyendo, por ejemplo, el material celulósico y lignocelulósico disperso en la corriente del proceso 1216 (p. ej., suspensión). La cavitación también produce radicales libres en el agua de la corriente del proceso 1216 (p. ej., suspensión). Estos radicales libres actúan para romper más el material celulósico en la corriente del proceso (1216). En general, se aplican aproximadamente 250 MJ/m³ de energía ultrasónica a la corriente del proceso (1216) que contiene fragmentos de virutas de álamo. Se pueden aplicar otros niveles de energía ultrasónica (entre aproximadamente 5 y aproximadamente 4000 MJ/m³, por ejemplo, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000, o 3000) sobre otras materias primas de biomasa. Después de la exposición a la energía ultrasónica en el volumen de reactor (1244), la corriente de proceso (1216) sale de las células del flujo (24) por la salida (1222).

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

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

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

Procedimientos primarios

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

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

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

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

Postprocesamiento

Destilación

Se usan la destilación y la adsorción en tamices moleculares para recuperar etanol de la cerveza de fermentación bruta y producir 99,5% de etanol. La destilación se lleva a cabo en dos columnas, la primera llamada la columna de

cerveza, separa el CO₂ disuelto y la mayor parte del agua, y la segunda concentra el etanol a una composición casi azeotrópica.

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

10 Las ventilaciones de la fermentación (que contienen principalmente CO₂, pero también algo de etanol) así como la ventilación de la columna de cerveza son depuradas en un depurador de agua, recuperando casi todo el etanol. El efluente del depurador se alimenta a la primera columna de destilación junto con la cerveza de fermentación.

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

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

Tratamiento de las aguas residuales

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

Cámara de combustión, caldera y turbogenerador

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

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

60 Se usan una turbina y generador de múltiples etapas para generar electricidad. El vapor se extrae de la turbina en tres condiciones diferentes para la inyección en el reactor de pretratamiento y el intercambio de calor en la destilación y evaporación. El vapor que queda se condensa con agua de enfriamiento y se devuelve al sistema de

agua alimentada a la caldera junto con el condensado de los diferentes intercambiadores de calor en el procedimiento. El agua bien tratada se usa como componente para sustituir el vapor usado en la inyección directa.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento que comprende:
 - 5 la fermentación de un azúcar de bajo peso molecular que utiliza un microorganismo fermentativo, en presencia de biomasa fibrosa oxidada, para un producto que no sea un azúcar, y donde el método comprende producir la biomasa fibrosa oxidada utilizando radiación ionizante en un entorno oxidante, sonicación en un entorno oxidante o pirólisis oxidativa antes de la mezcla con el azúcar de bajo peso molecular.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, donde la biomasa se ha sometido a radiación ionizante y se ha enfriado o inactivado.
3. El método de la reivindicación 1, en donde la biomasa fibrosa se ha oxidado por la radiación ionizante.
- 15 4. El método de la reivindicación 3, en el que la dosis total de radiación se encuentra entre 1,0 Mrad y 6,0 Mrad, o es al menos 5 Mrad, por ejemplo, donde la radiación proporciona una dosis de radiación de 10 Mrad a 150 Mrad.
5. El método de la reivindicación 1, donde la biomasa fibrosa comprende grupos de ácido carboxílico o
20 carboxilato para la fijación por el microorganismo y en el que los grupos se han introducido por anulación después de la radiación ionizante.
6. El método de la reivindicación 1, donde el producto es un ácido orgánico tal como un ácido orgánico seleccionado del grupo que consiste en ácido butírico, ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico y ácido
25 succínico, preferiblemente en el que el ácido orgánico es ácido butírico o en el que el ácido orgánico es ácido láctico.
7. El método de la reivindicación 1, donde el producto es un alcohol, tal como metanol, etanol, propanol, isopropanol o butanol.
- 30 8. El método de la reivindicación 1, donde el microorganismo es una bacteria o donde la biomasa fibrosa se ha oxidado mediante la irradiación con radiación ionizante.
9. El método de la reivindicación 8, donde la irradiación se lleva a cabo utilizando un haz de partículas.
- 35 10. El método de la reivindicación 1, donde la biomasa fibrosa comprende material celulósico o lignocelulósico o donde la biomasa fibrosa se selecciona del grupo que consiste en papel, productos de papel, residuos de papel, madera, tableros de partículas, serrín, residuos agrícolas, aguas residuales, ensilado, hierbas, cáscaras de arroz, bagazo, yute, cáñamo, lino, bambú, sisal, abacá, paja, mazorcas de maíz, rastrojo de maíz, mijos, alfalfa, heno, fibra de coco, algodón, algas marinas, algas, y mezclas de los mismos.
- 40 11. El método de la reivindicación 1, donde la biomasa deriva de una materia prima de biomasa que tiene fibras internas, y que ha sido cortada hasta el punto de que sus fibras internas están expuestas sustancialmente.
12. El método de la reivindicación 1, donde la biomasa fibrosa tiene una porosidad mayor que 70% o que
45 comprende además la recuperación del material de biomasa después de la fermentación y la reutilización del material.
13. El método de cualquiera de las anteriores reivindicaciones puede comprender además la preparación física de la biomasa, p.ej., por cizalladura, o reduciendo el tamaño de la biomasa con muela abrasiva, corte o
50 desgarrado mecánico, trituración por rectificadora, o molienda por abrasión con aire.
14. El método de la reivindicación 1, donde la irradiación ha sido realizada bajo un ambiente oxidante, donde el medio ambiente es una capa de aire o de oxígeno.
- 55 15. El método de la reivindicación 1, donde la biomasa comprende fibras que han sido combinadas con una resina para formar un compuesto.

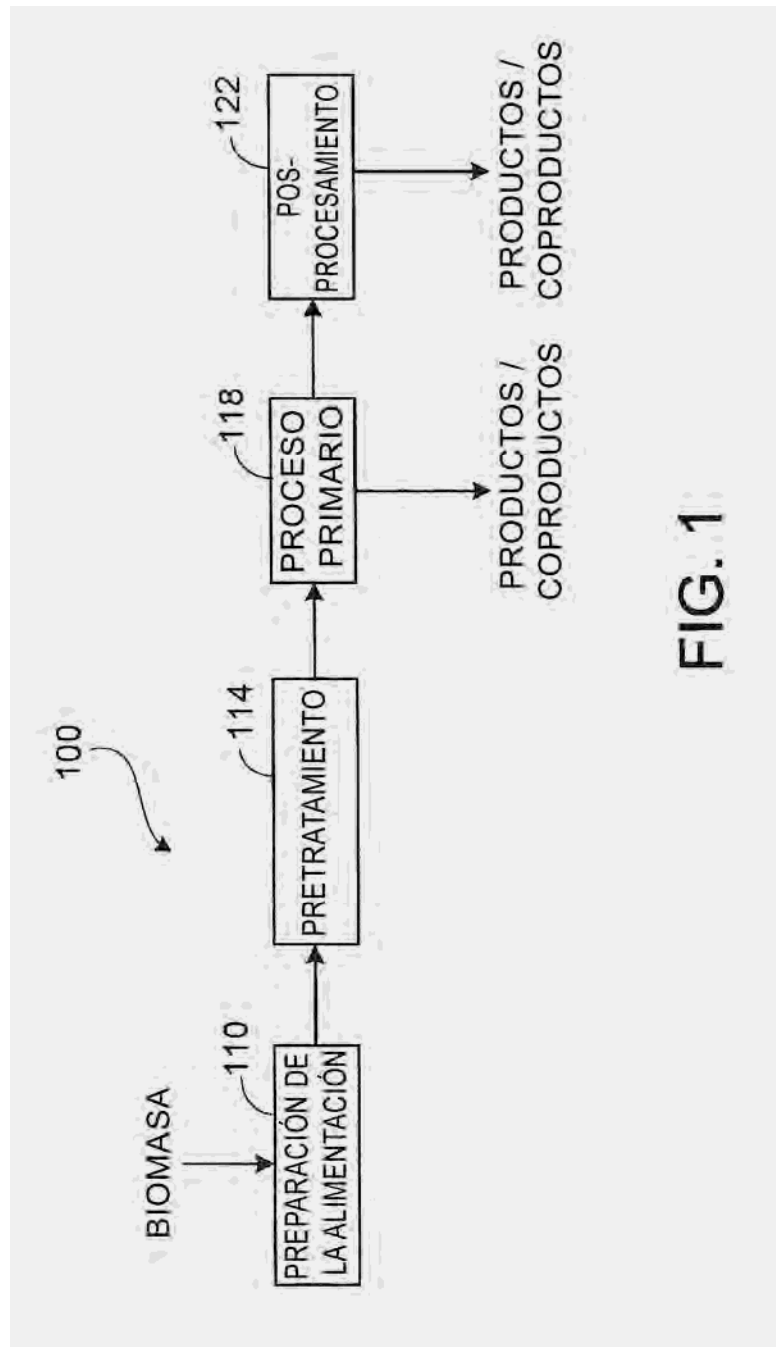


FIG. 1

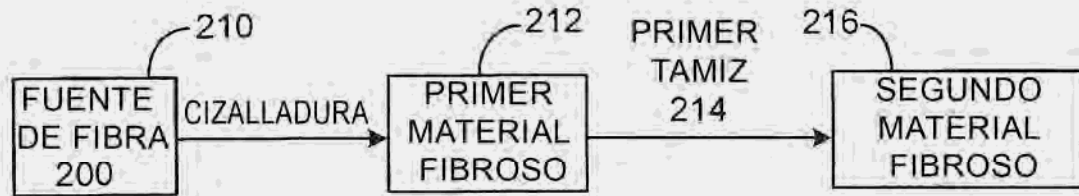
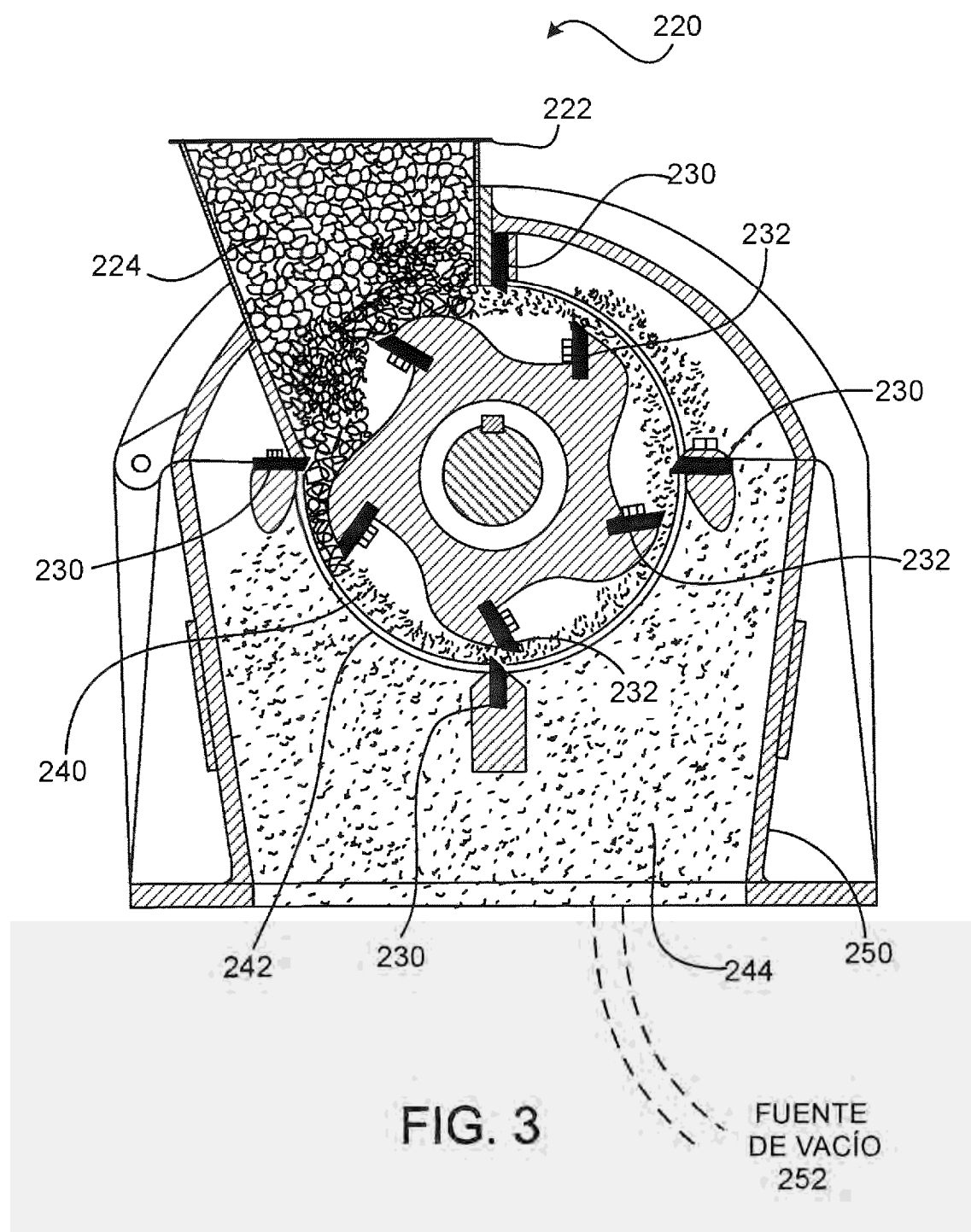


FIG. 2



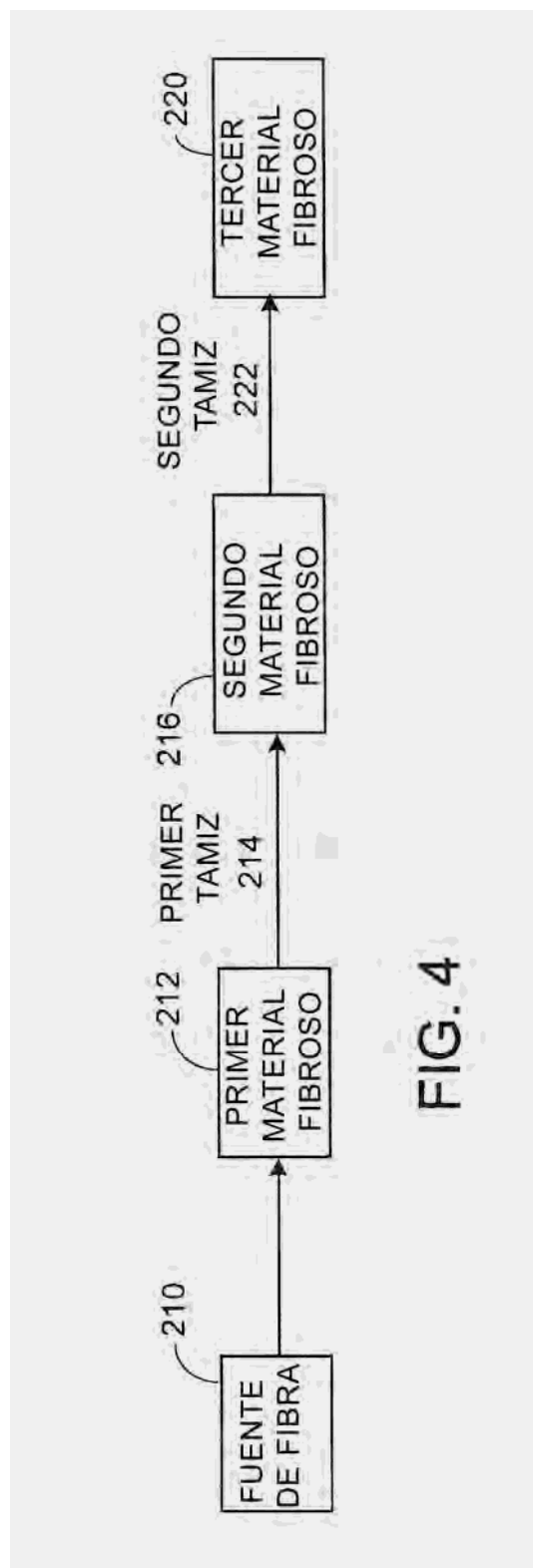




FIG. 5

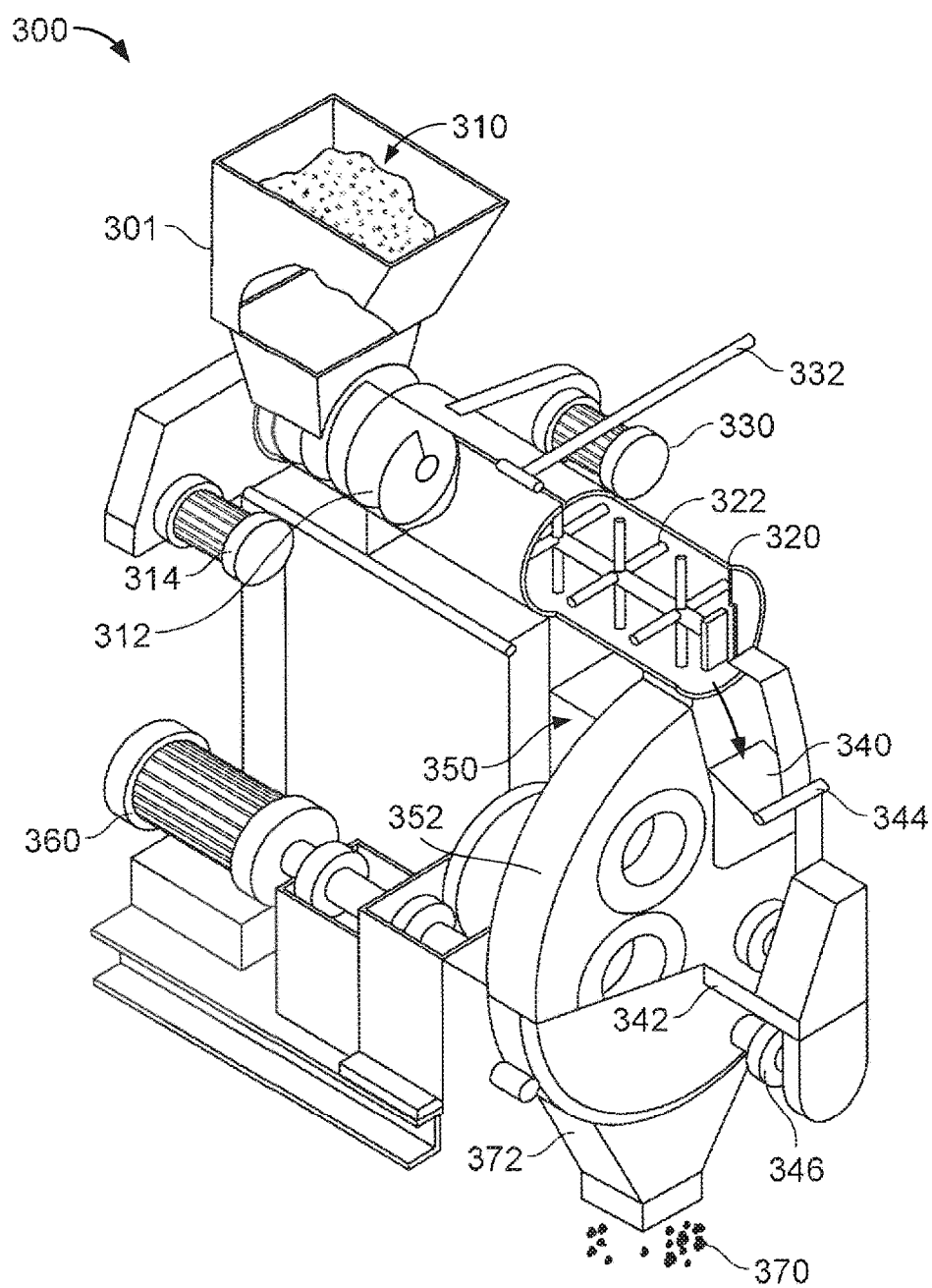


FIG. 6

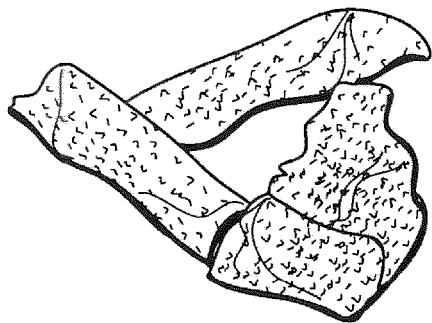


FIG. 7A

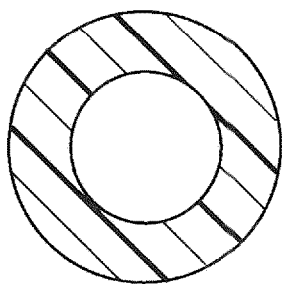


FIG. 7B

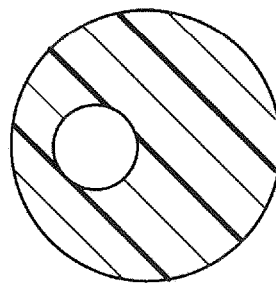


FIG. 7C

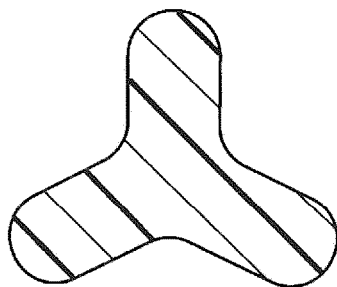


FIG. 7D

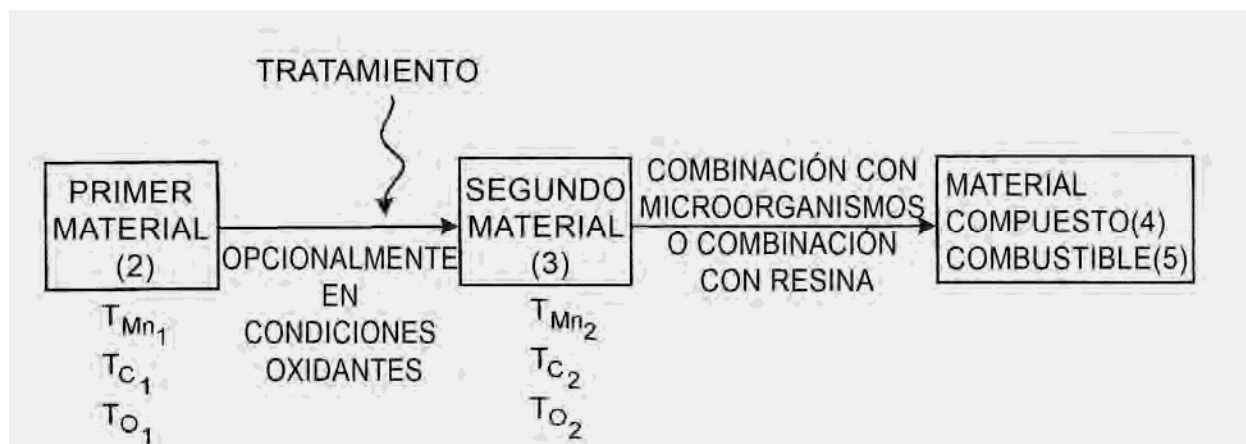


FIG. 8

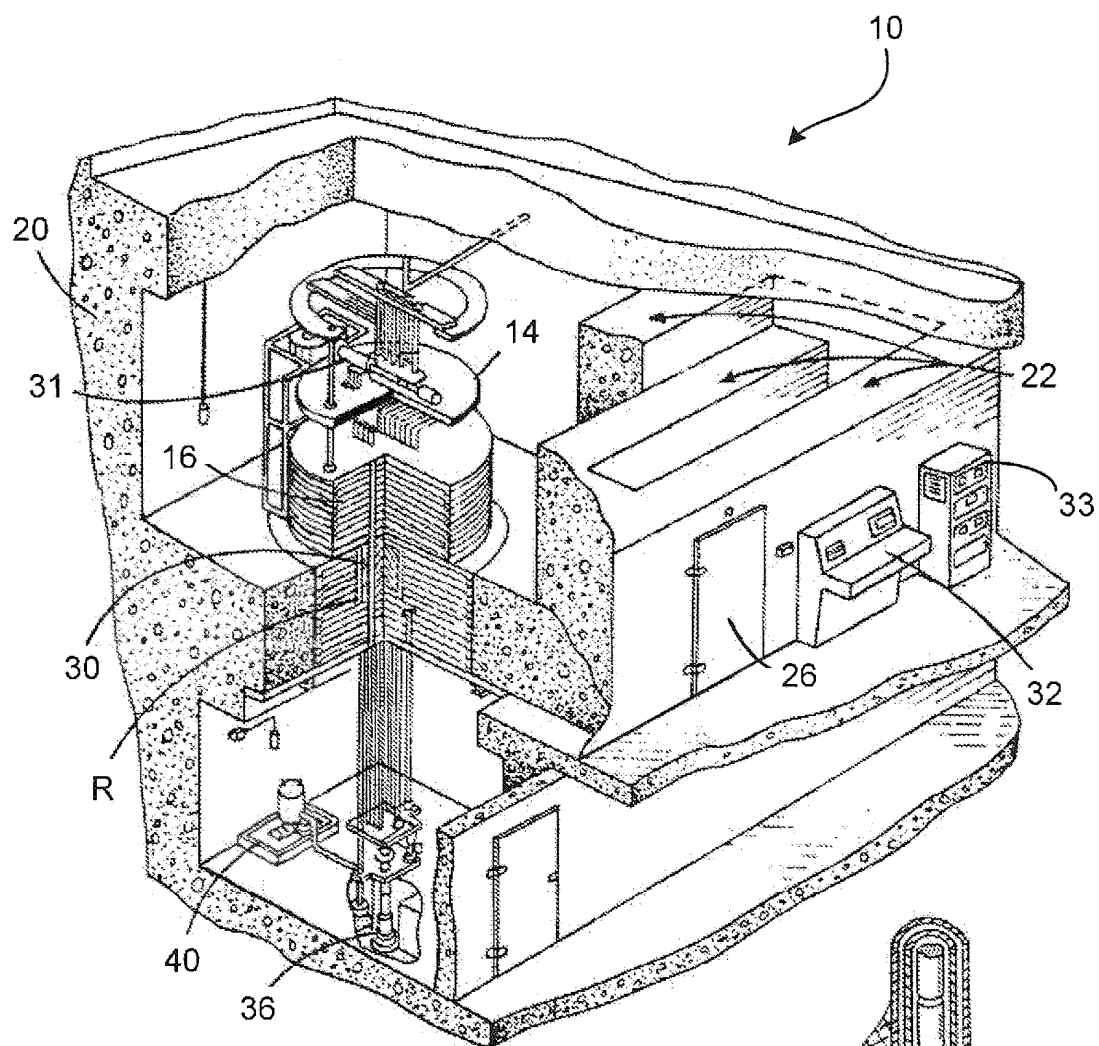


FIG. 9

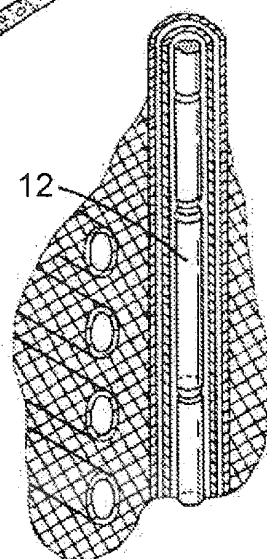
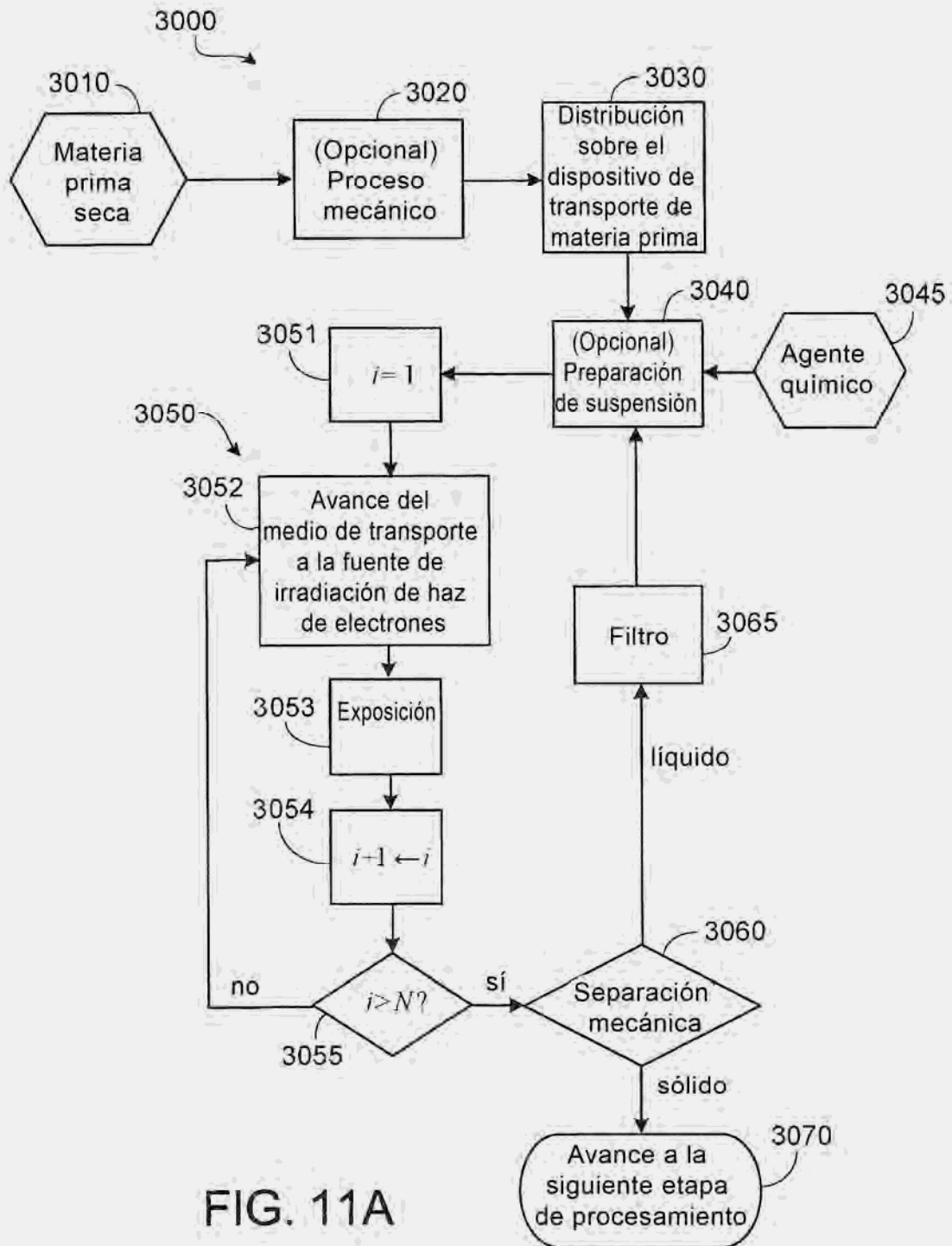
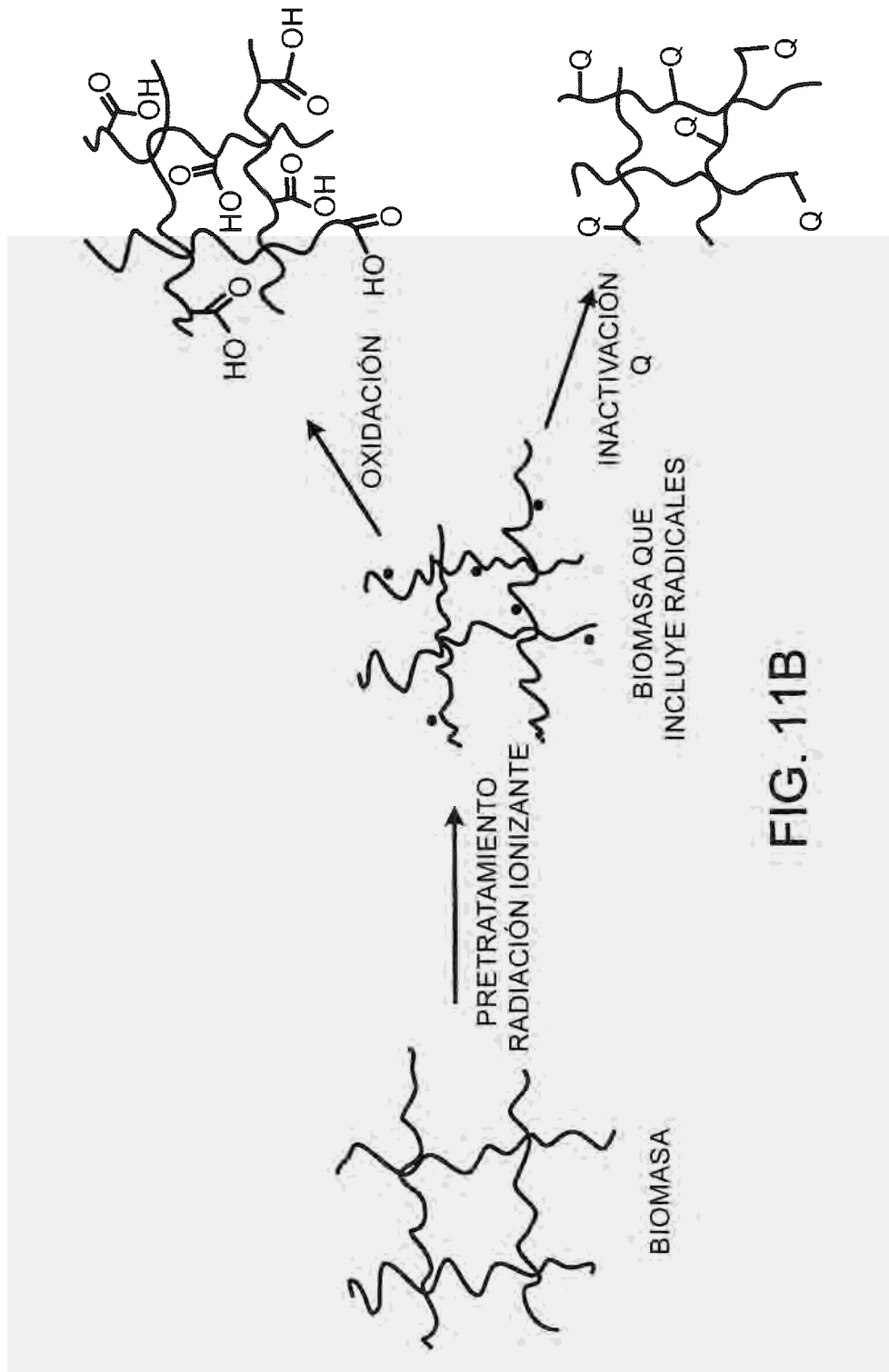


FIG. 10





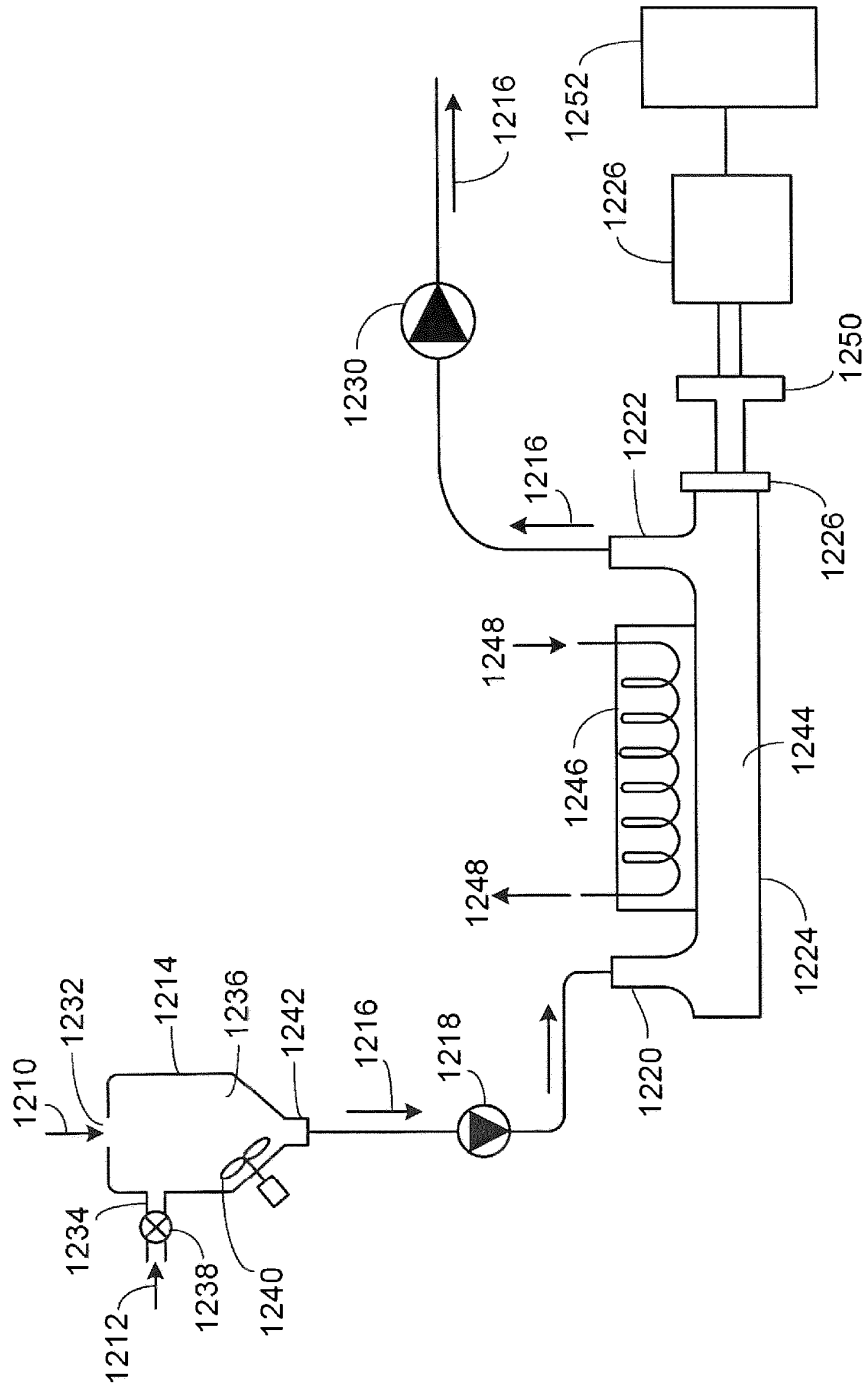
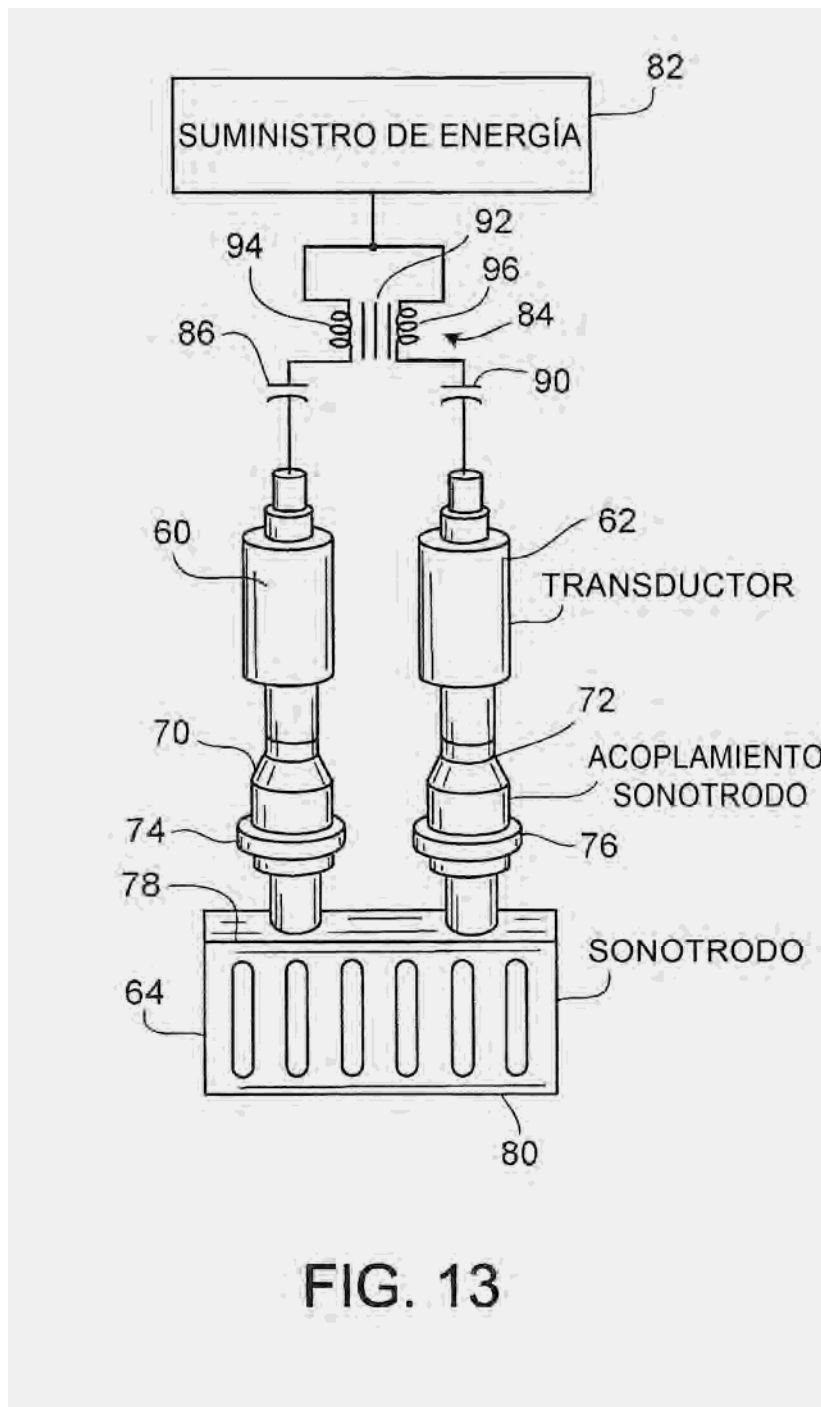
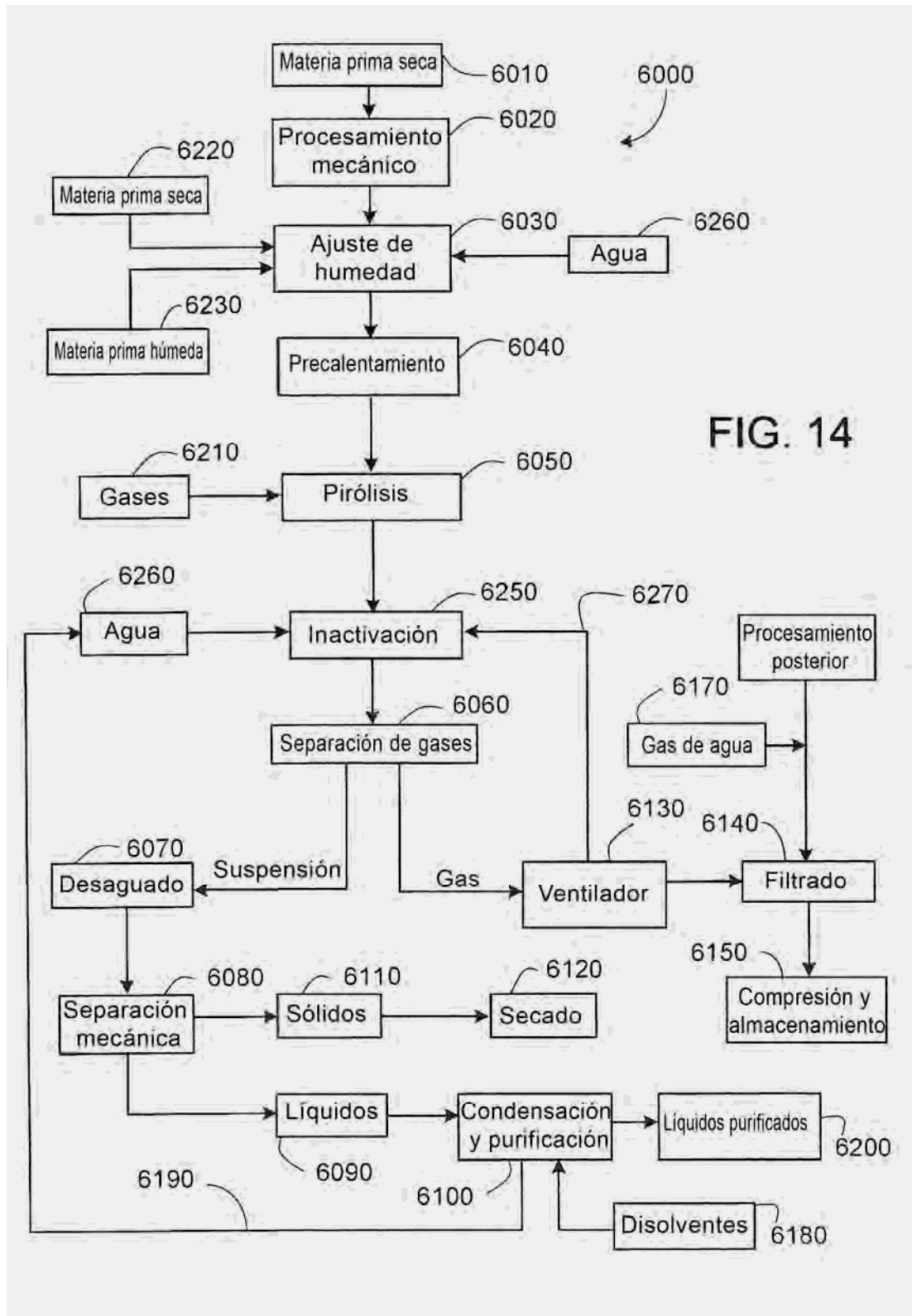
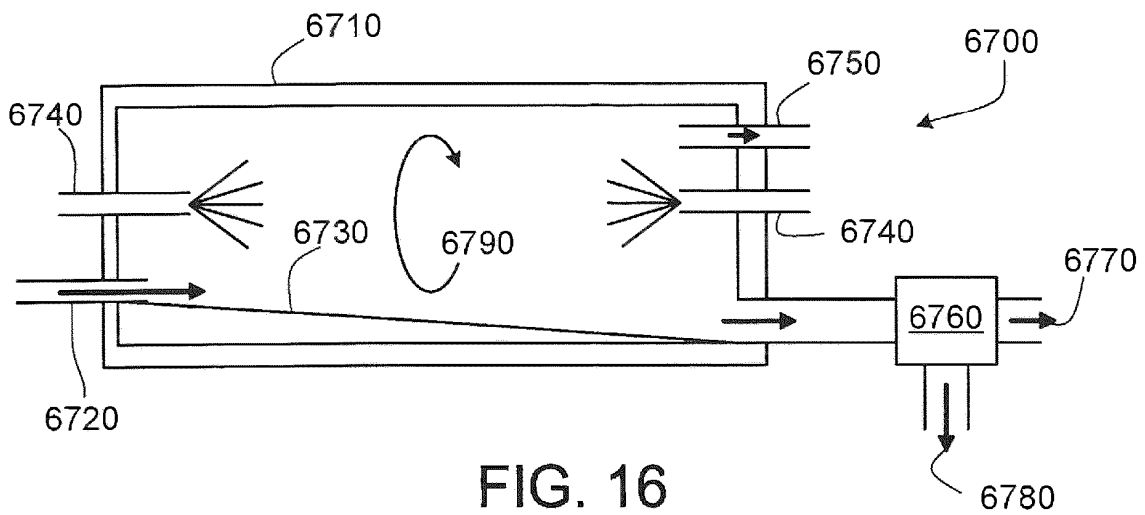
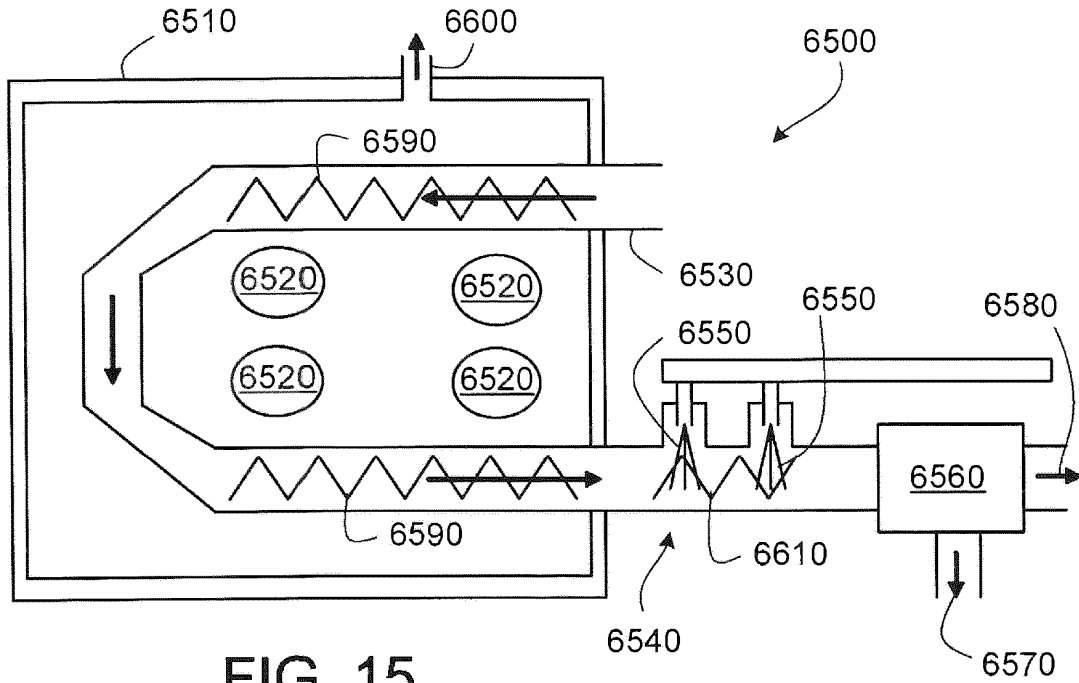


FIG. 12







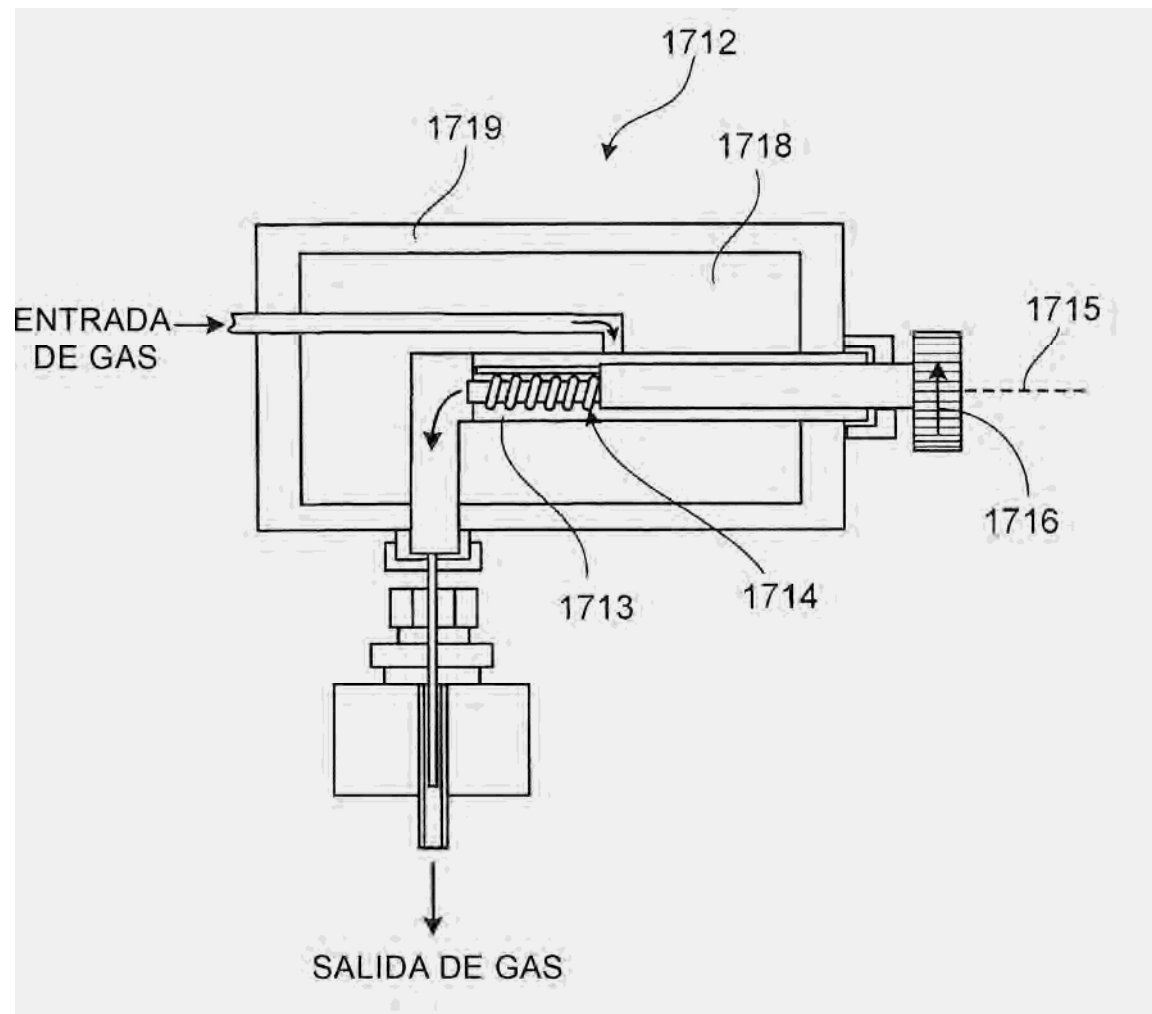
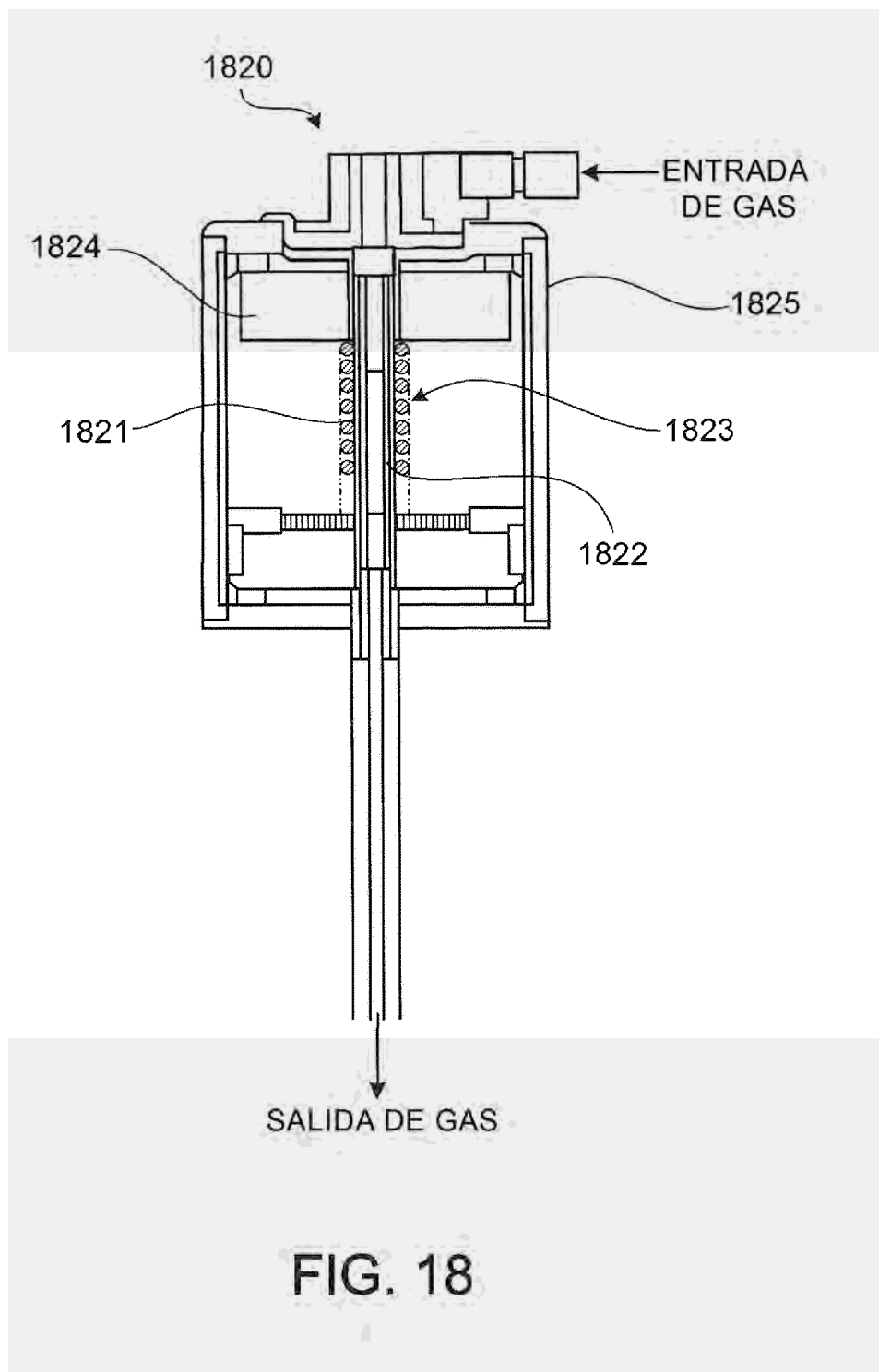
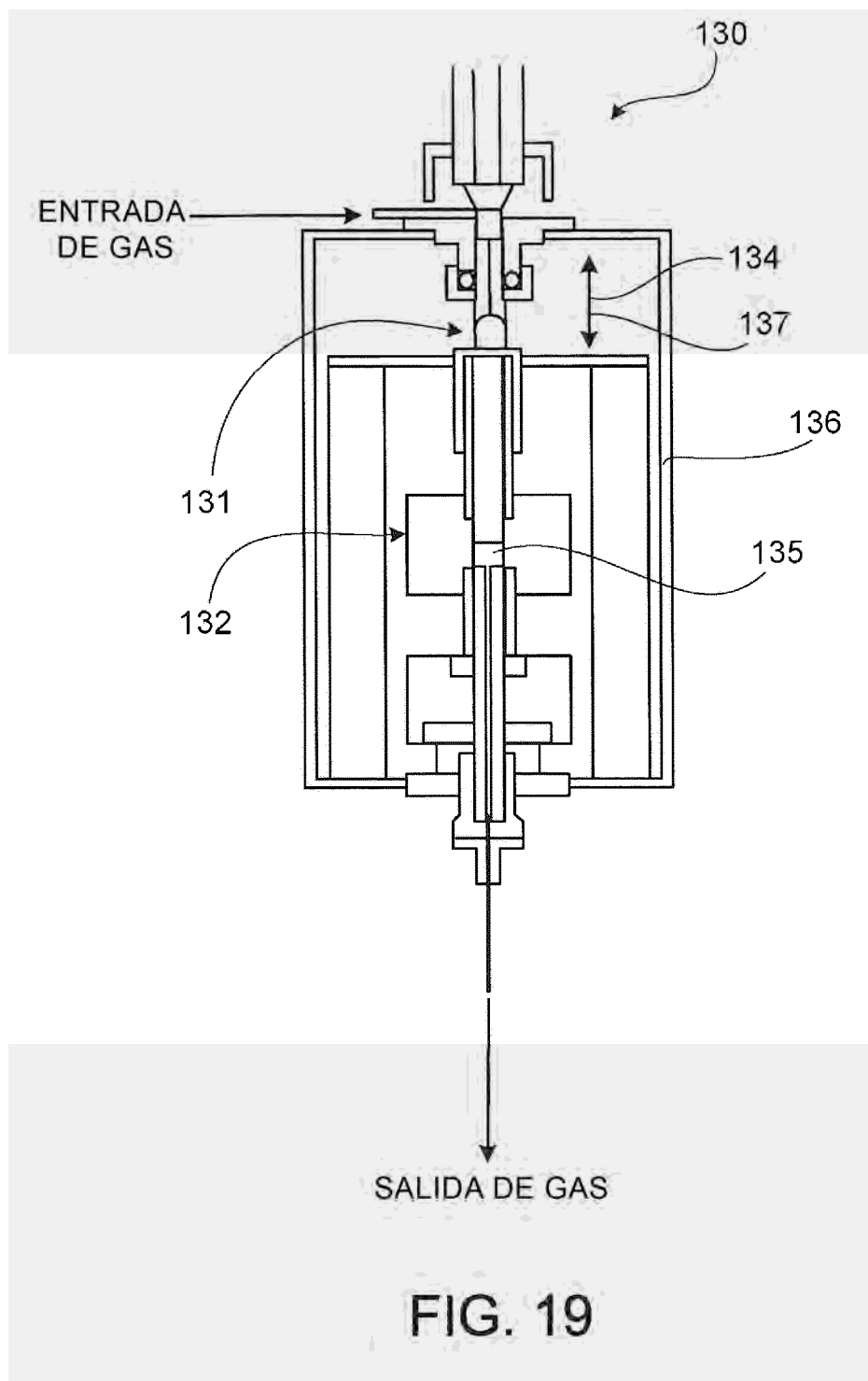


FIG. 17





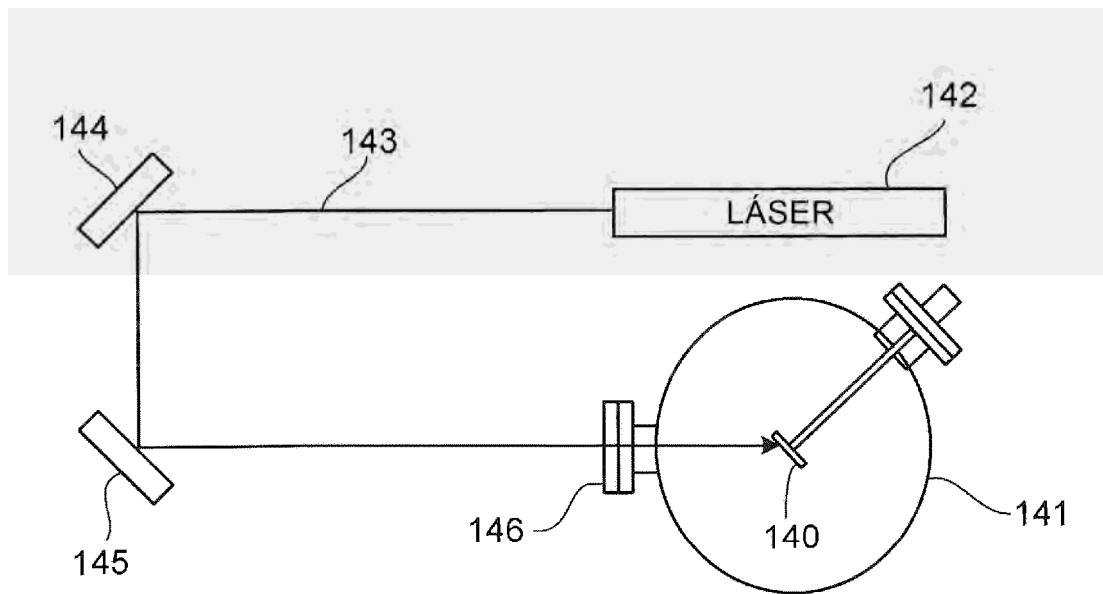


FIG. 20

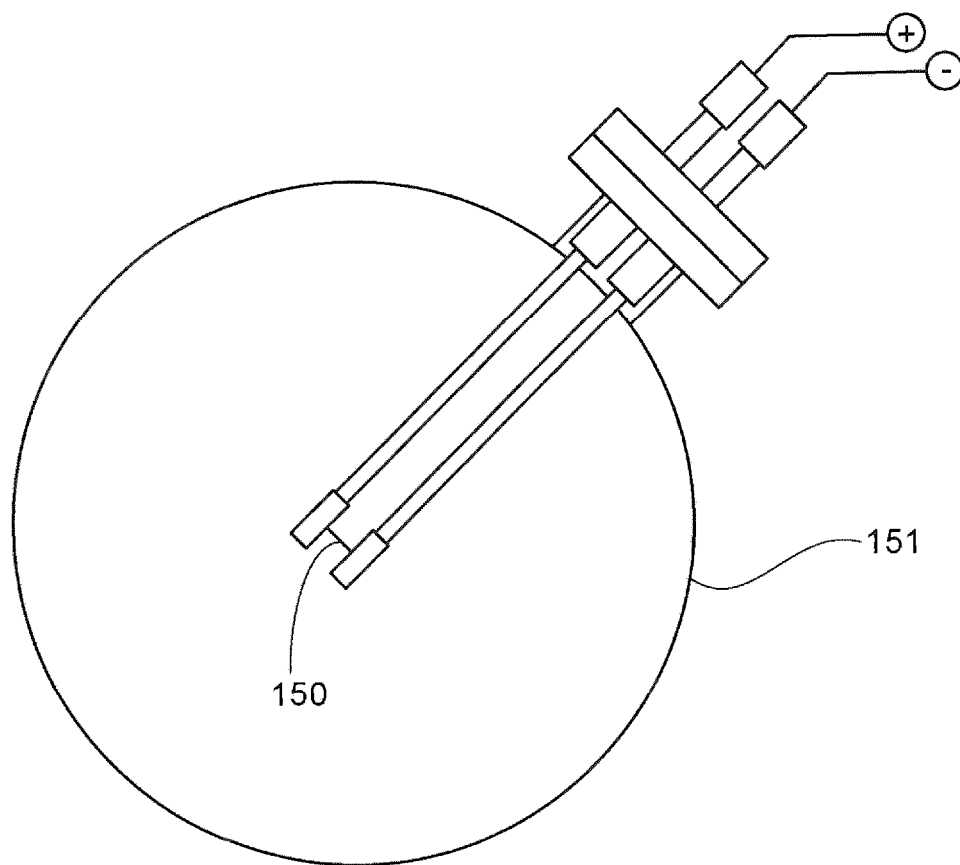
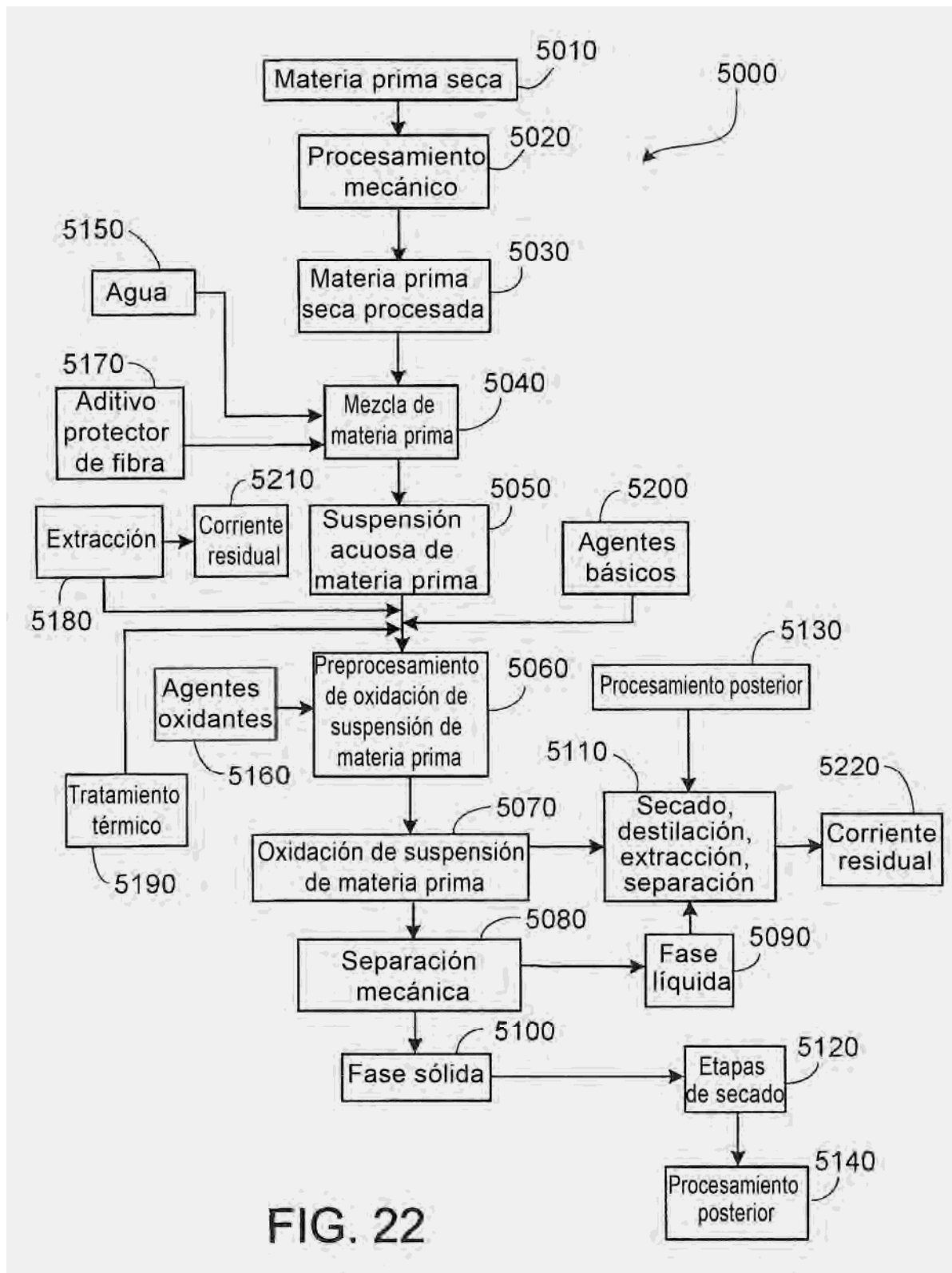
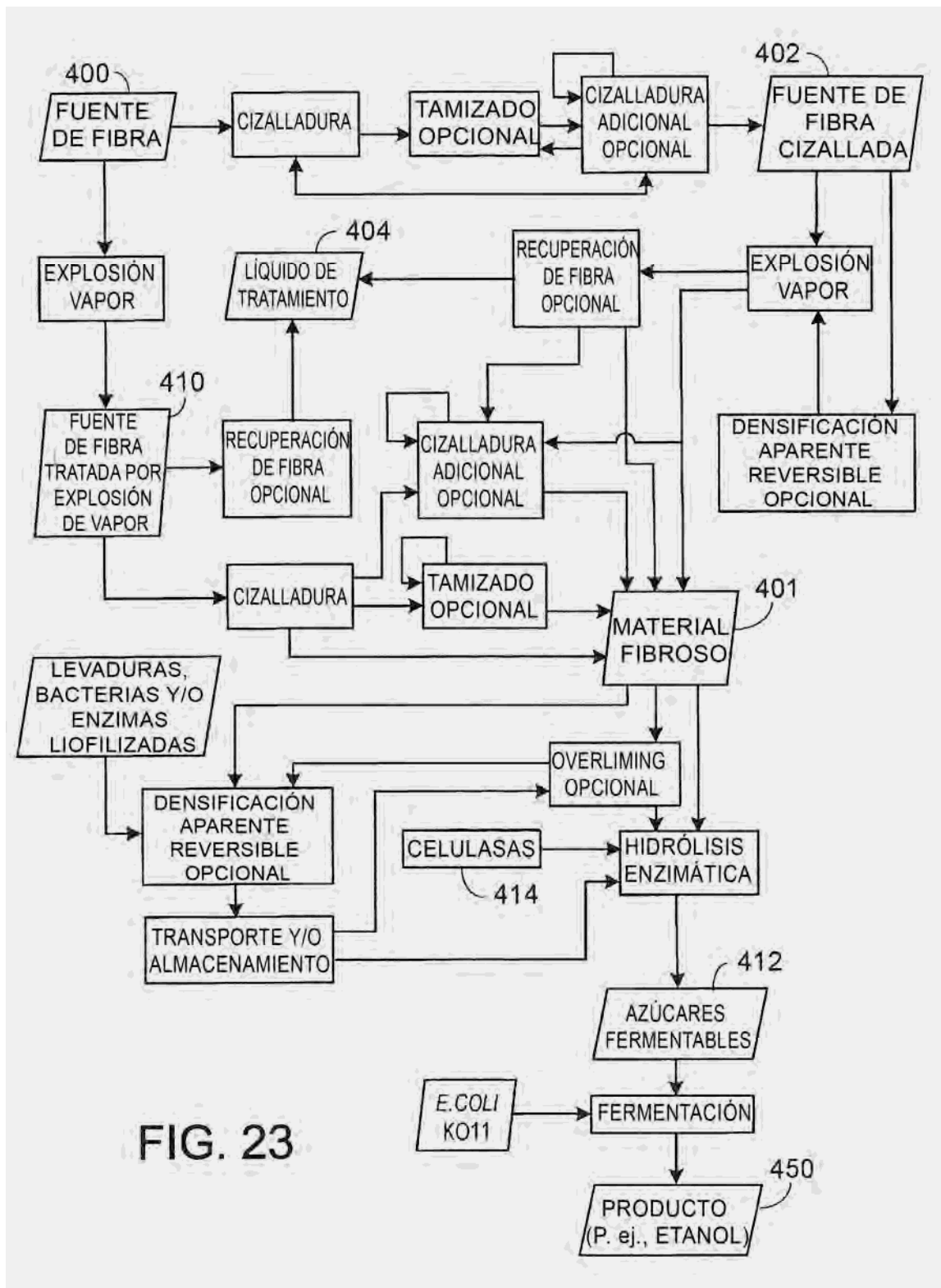


FIG. 21





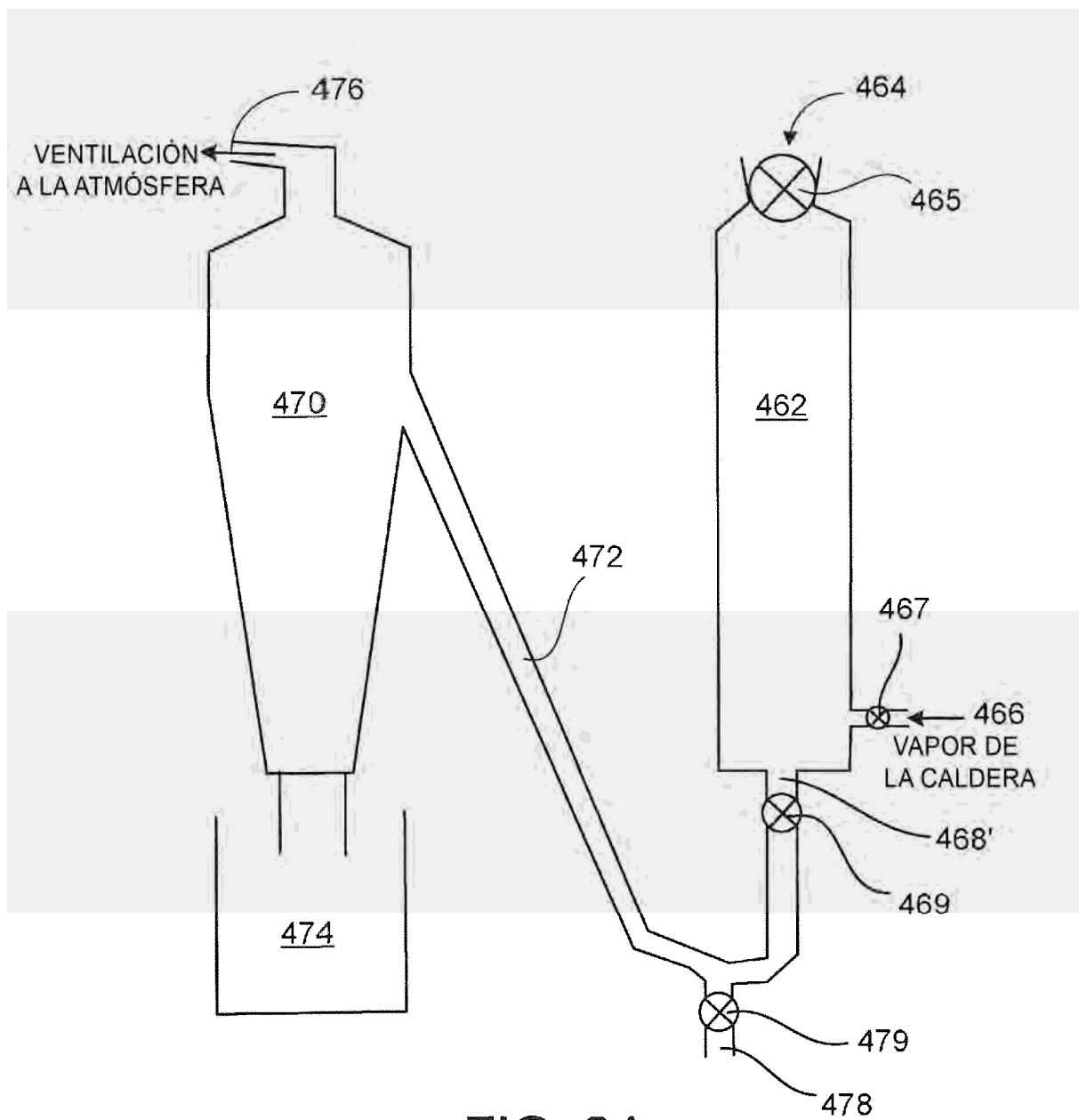


FIG. 24

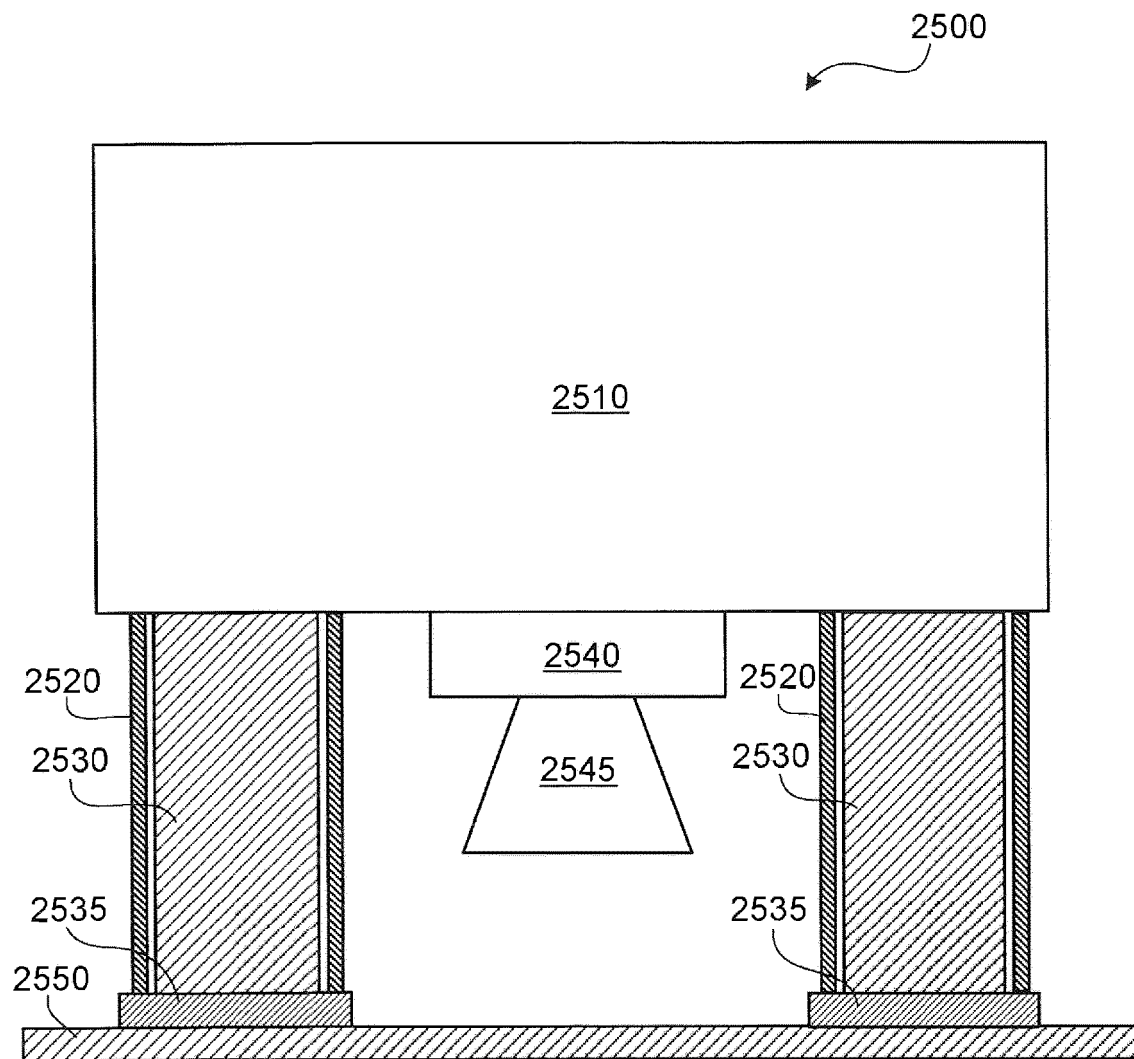
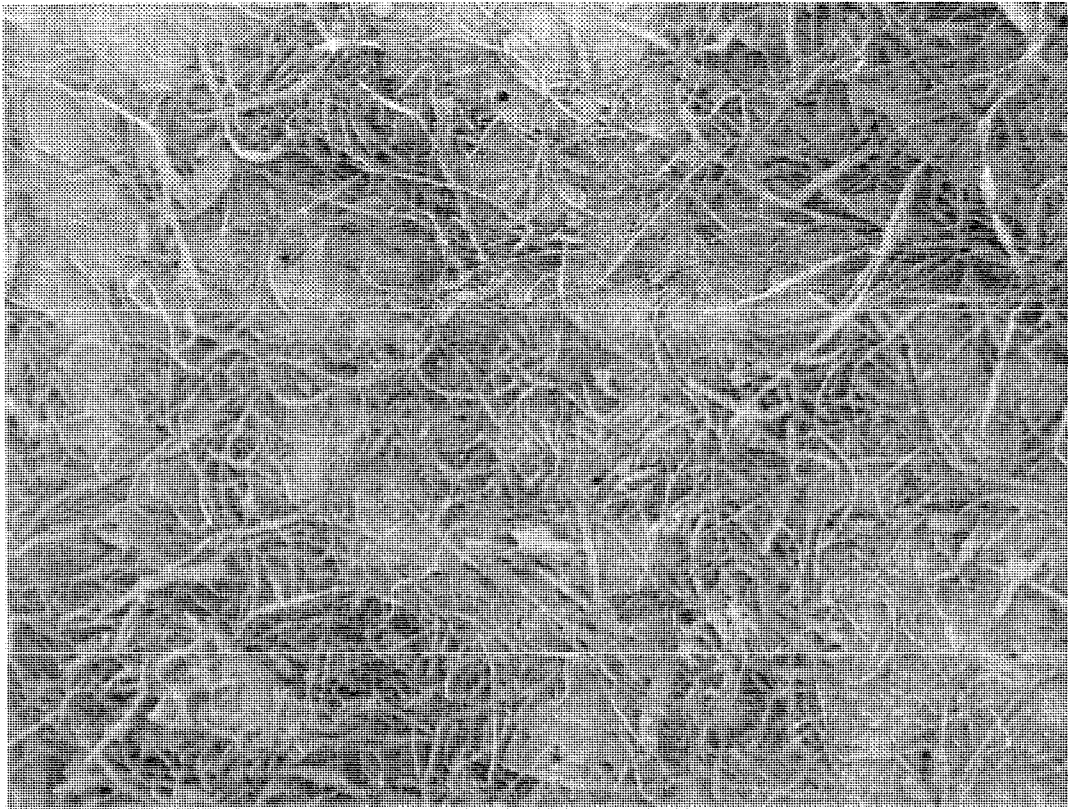


FIG. 25



X25 1mm

FIG. 26

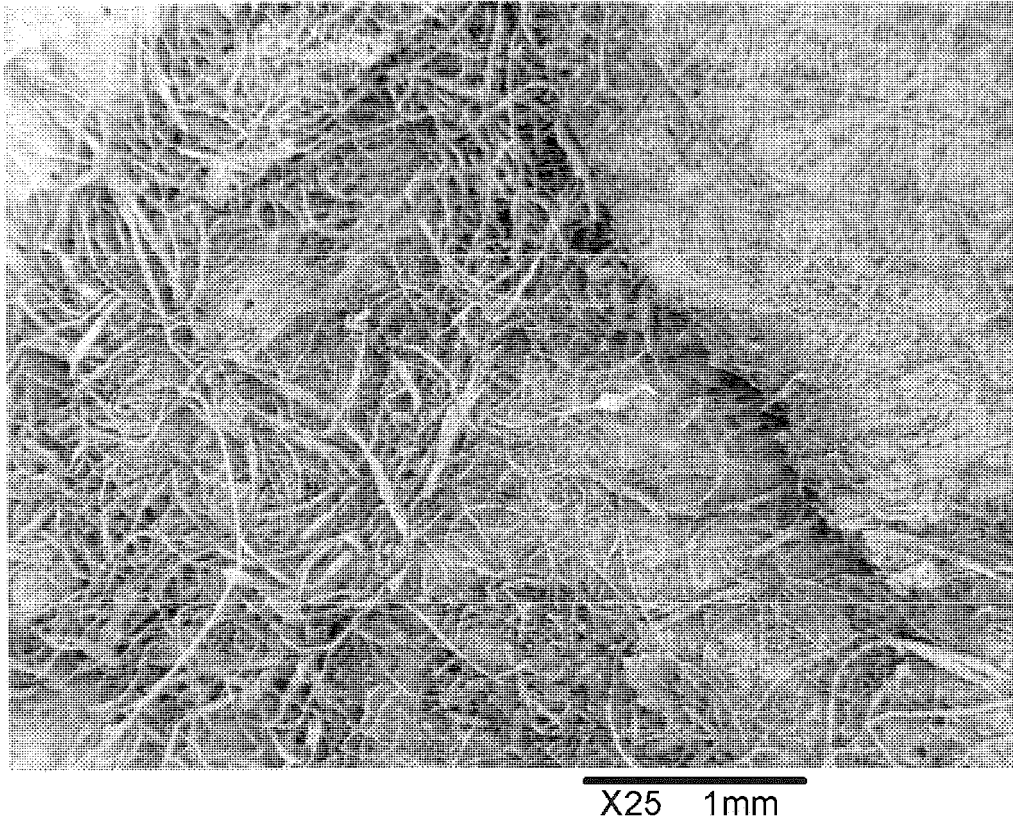


FIG. 27

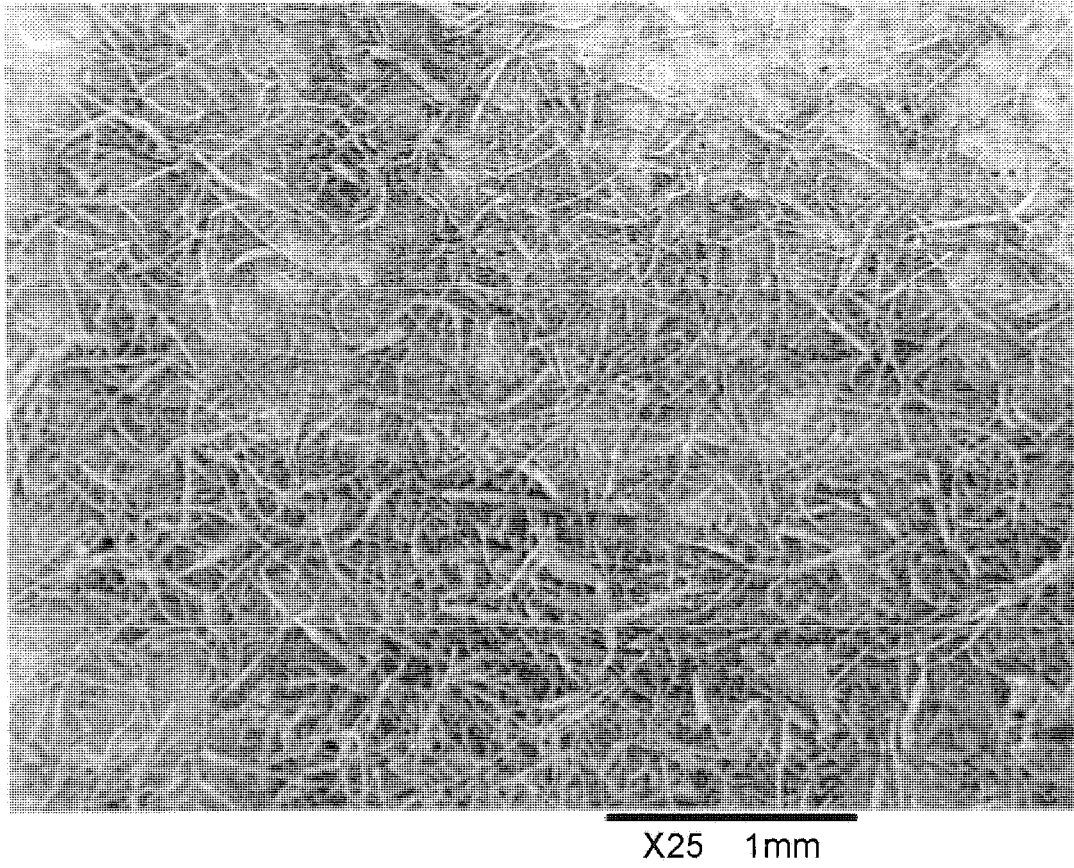


FIG. 28

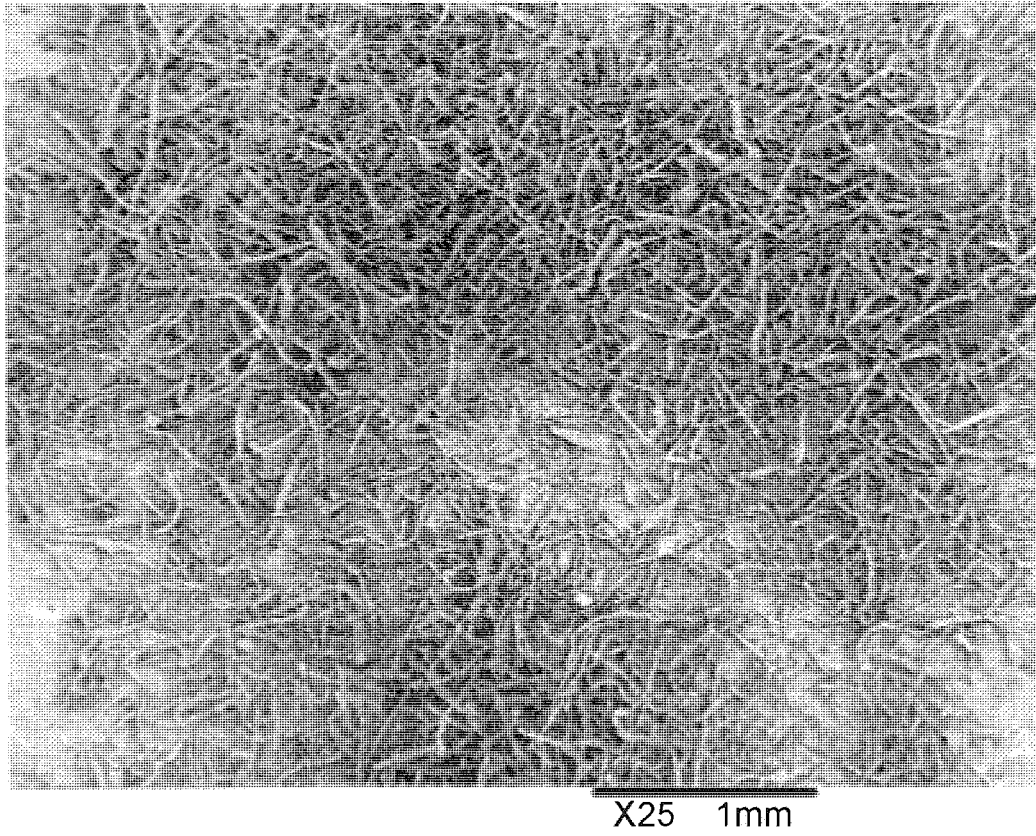


FIG. 29

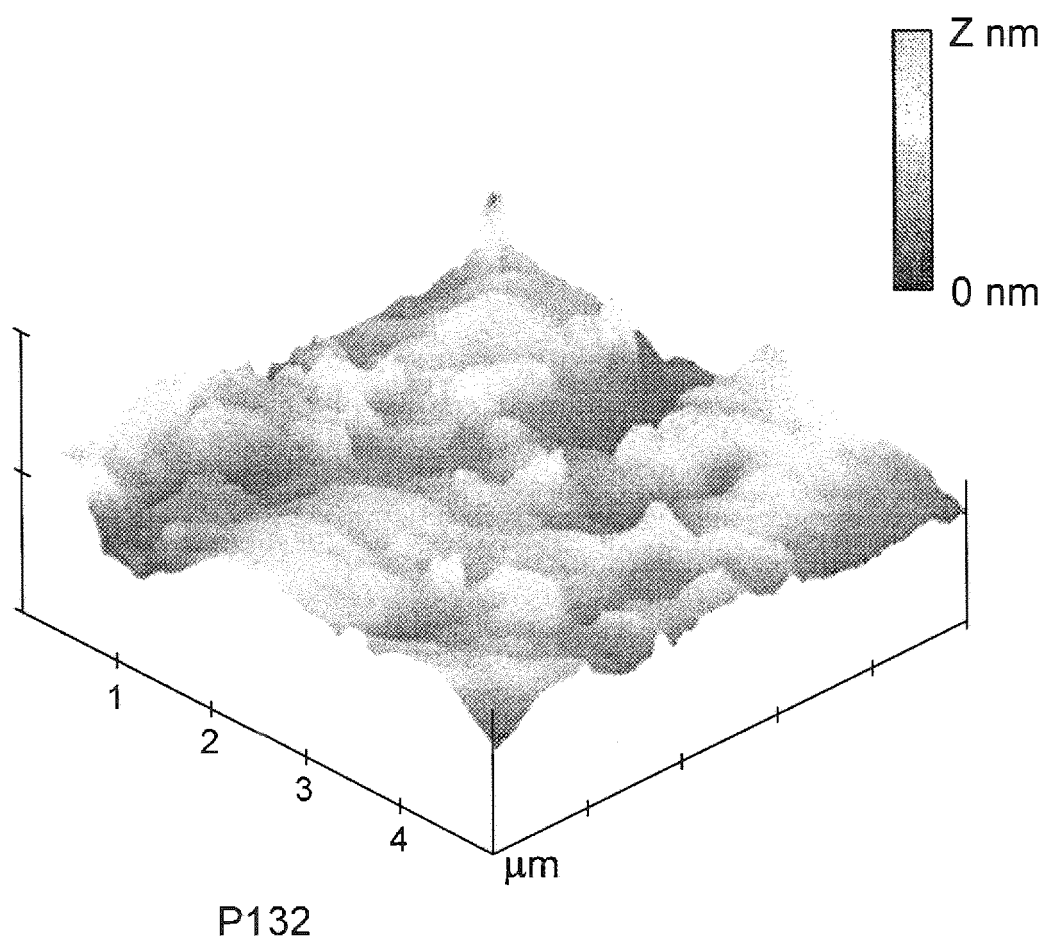
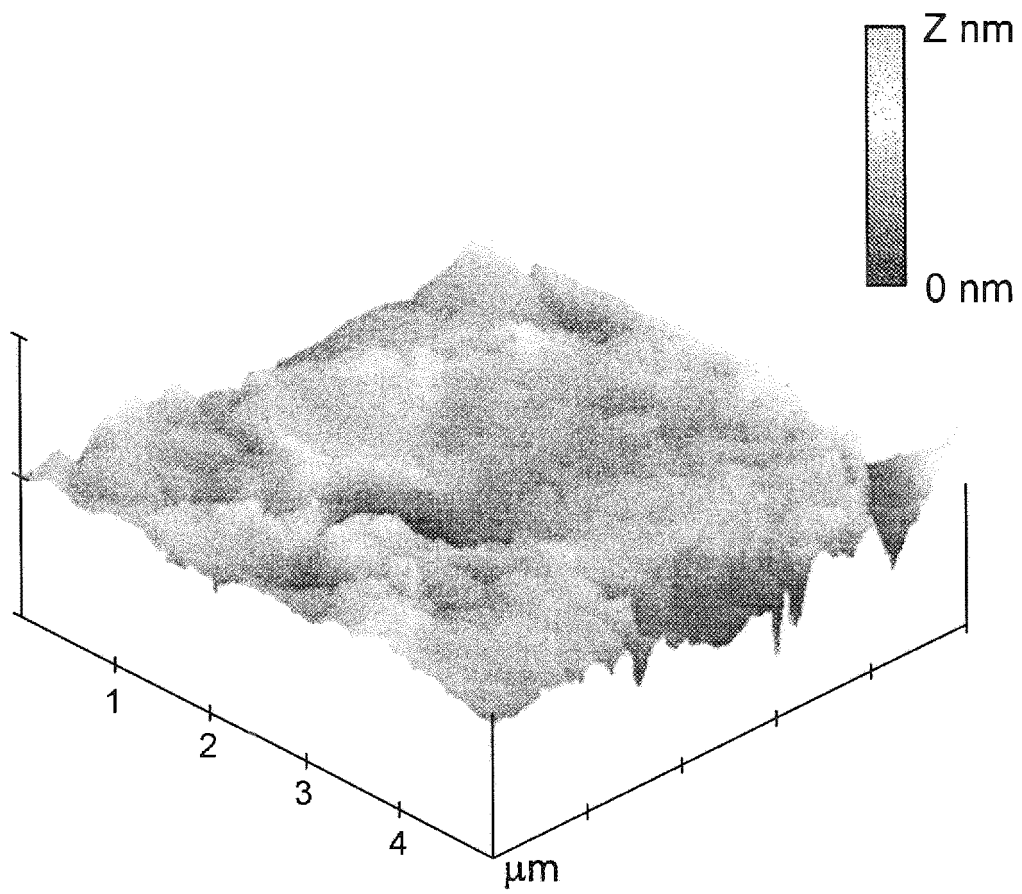


FIG. 29A



P132-10

FIG. 29B

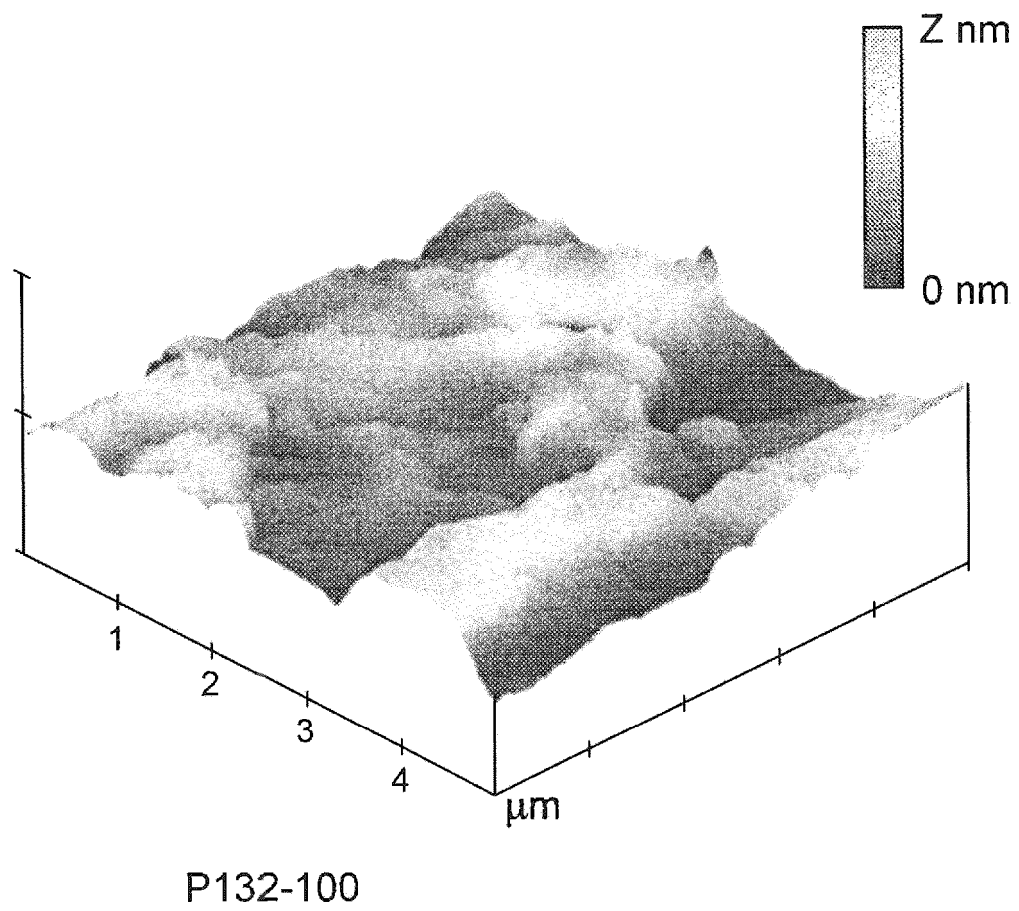


FIG. 29C

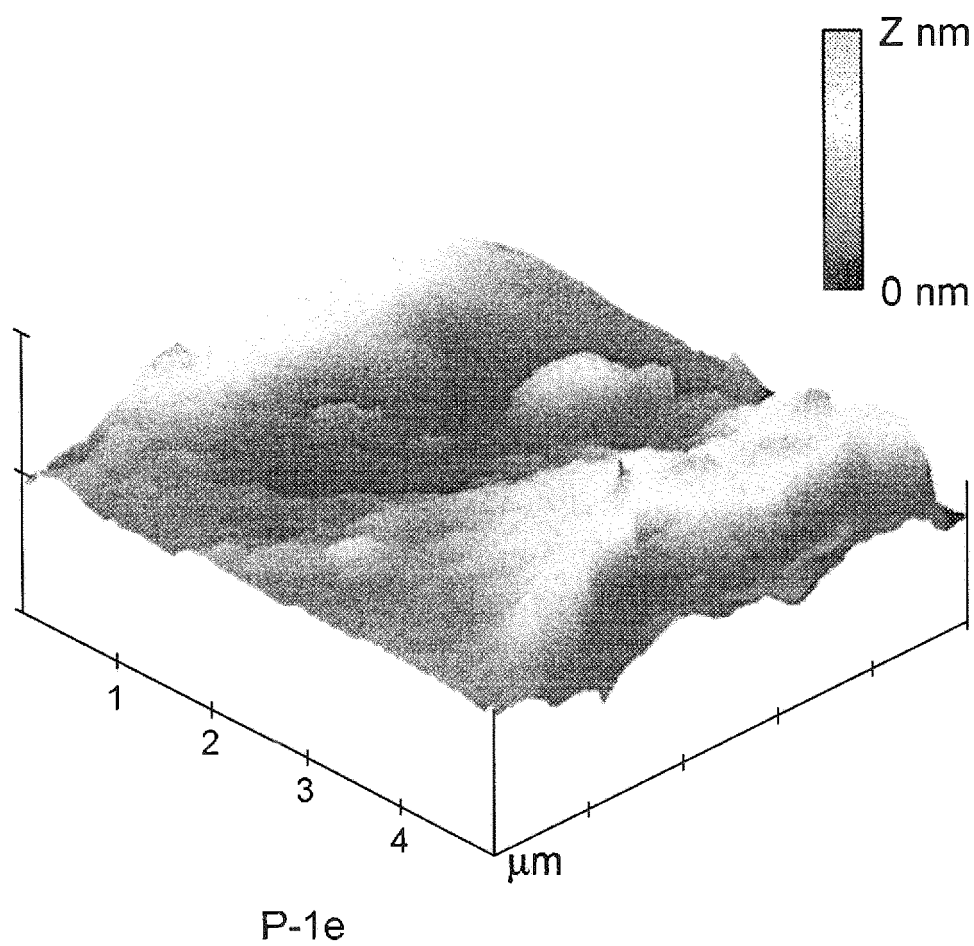


FIG. 29D

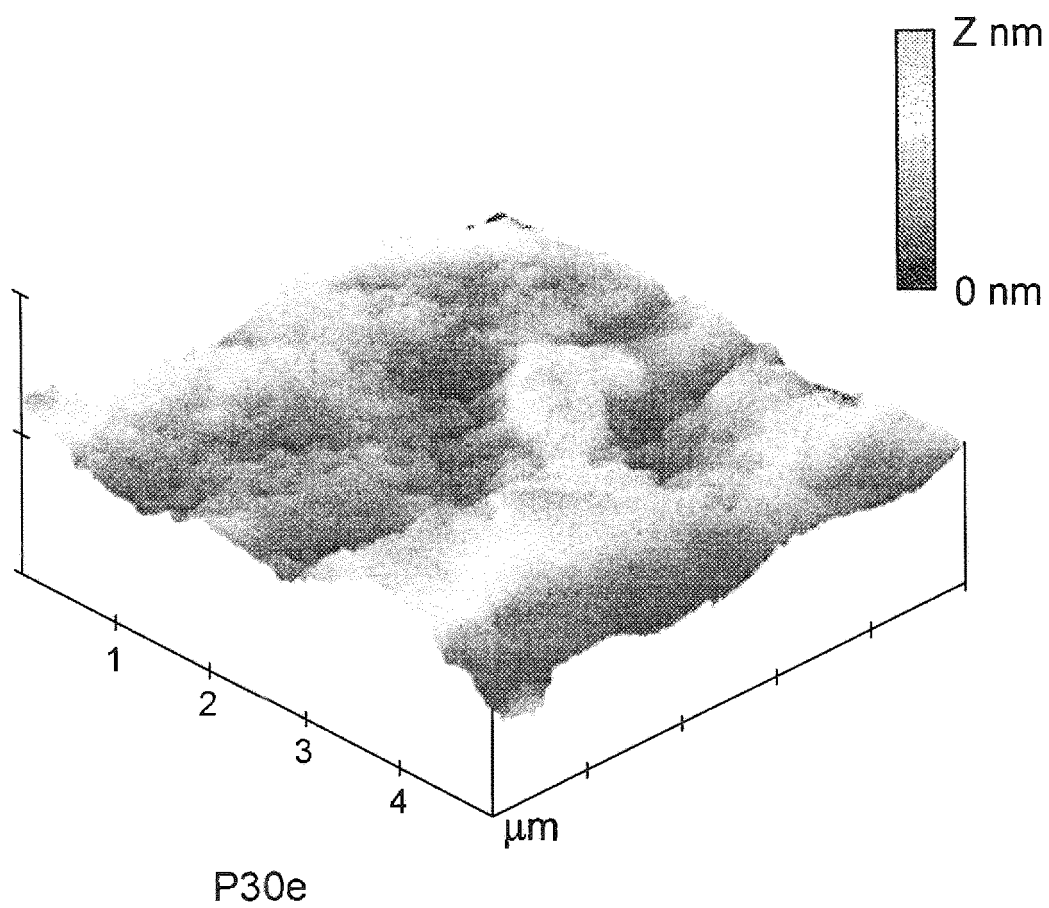


FIG. 29E

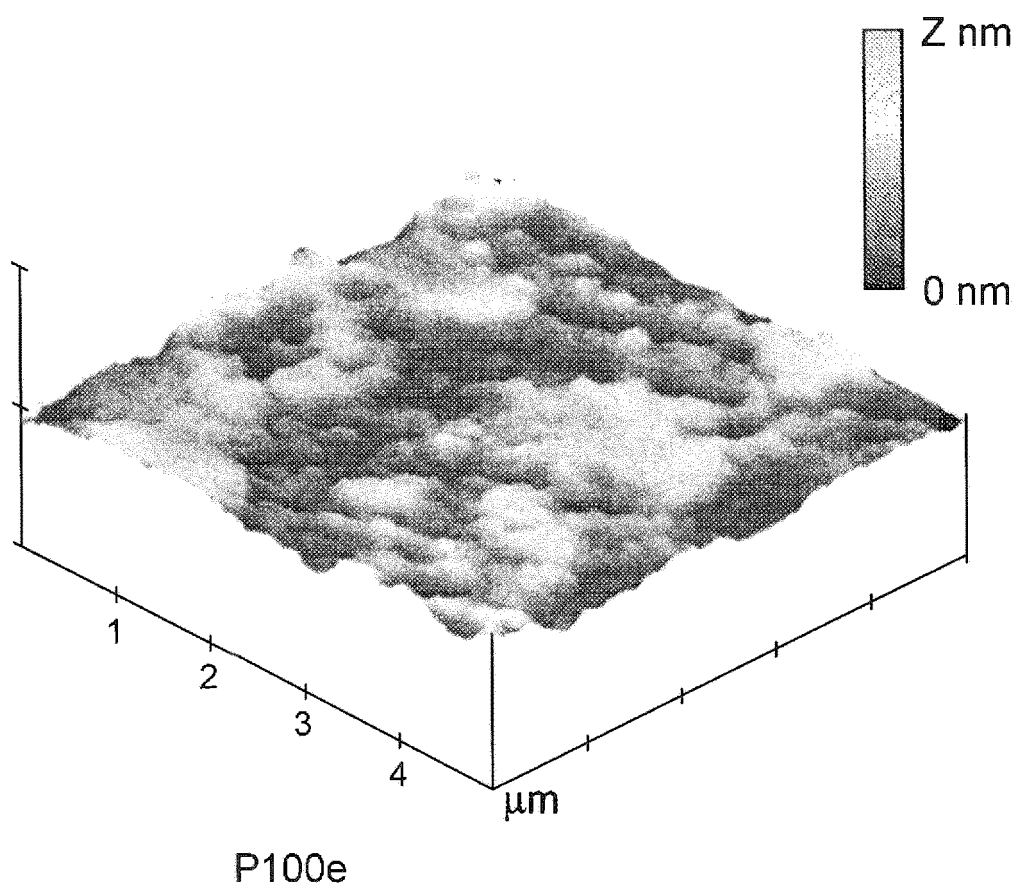


FIG. 29F

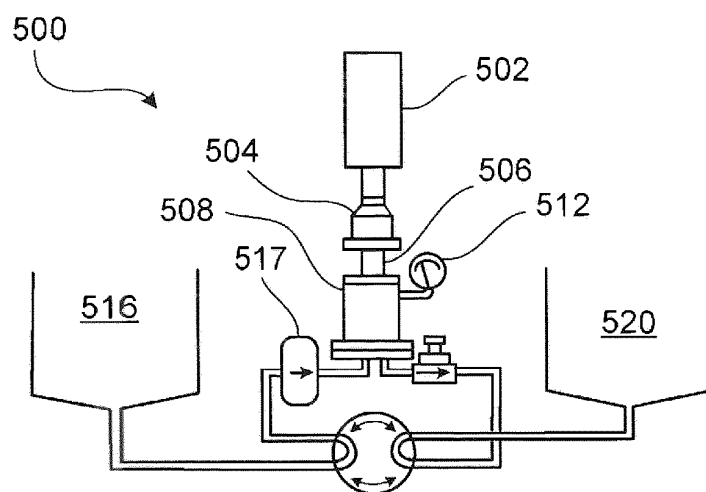


FIG. 30

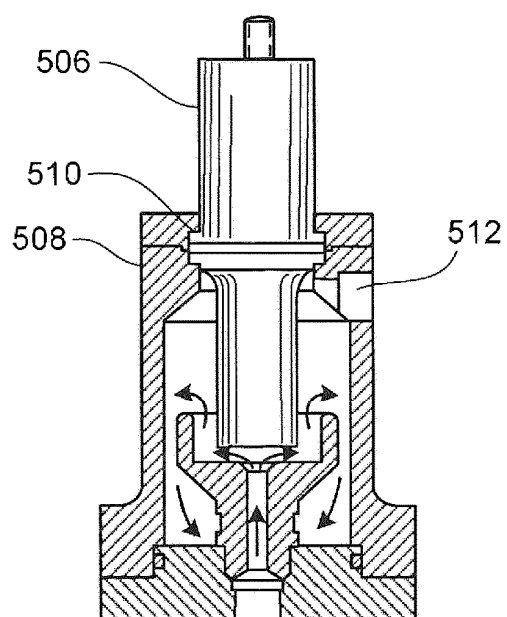


FIG. 31

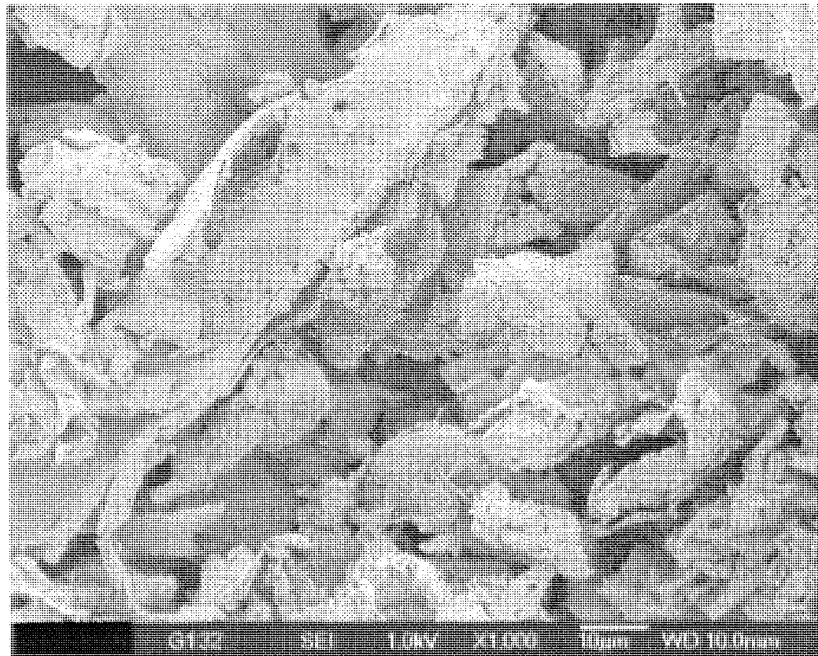


FIG. 32

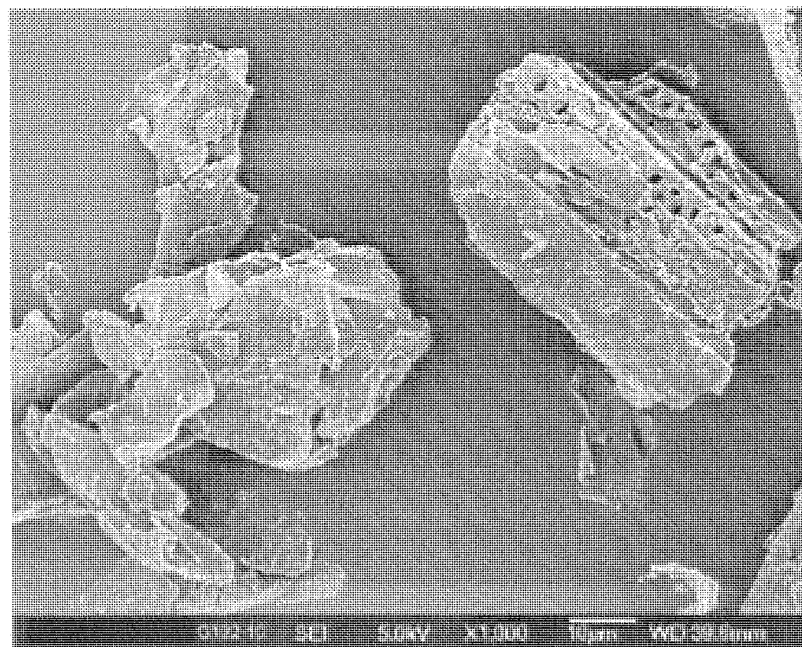


FIG. 33

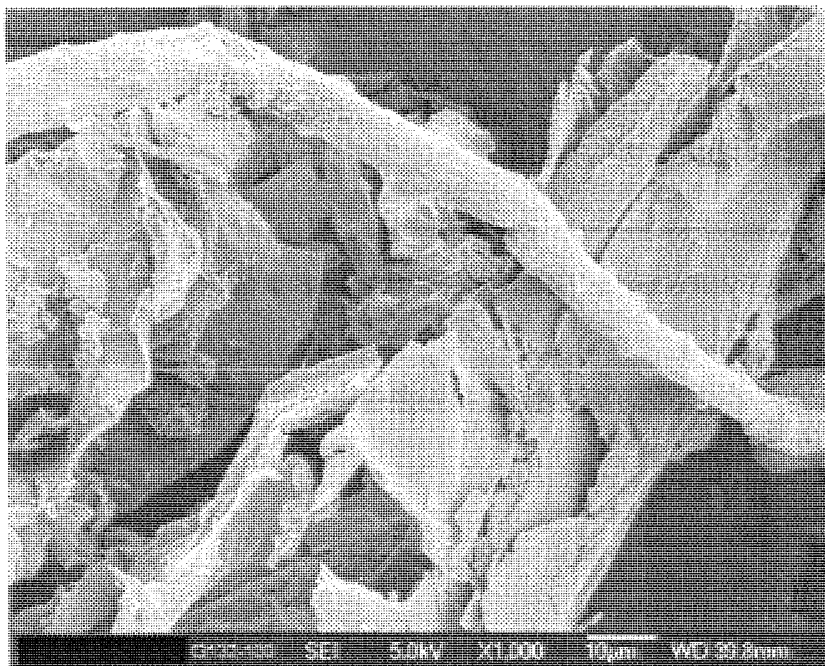


FIG. 34

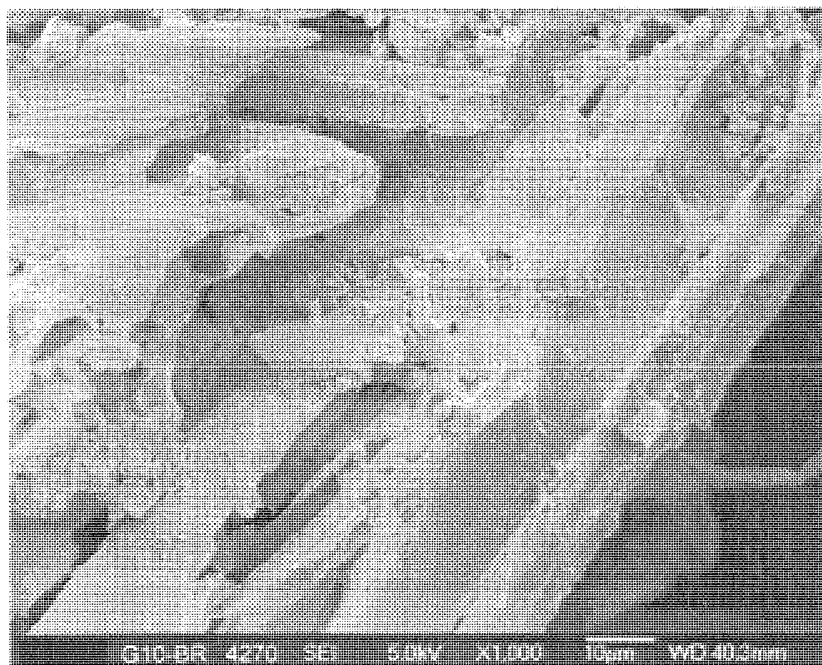


FIG. 35

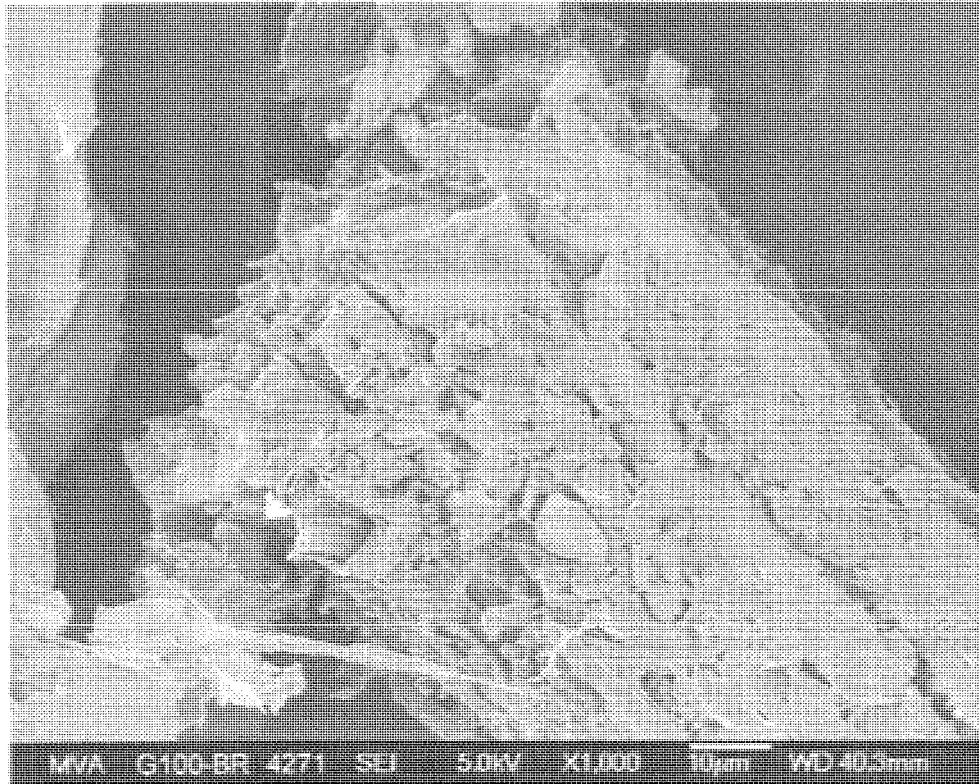
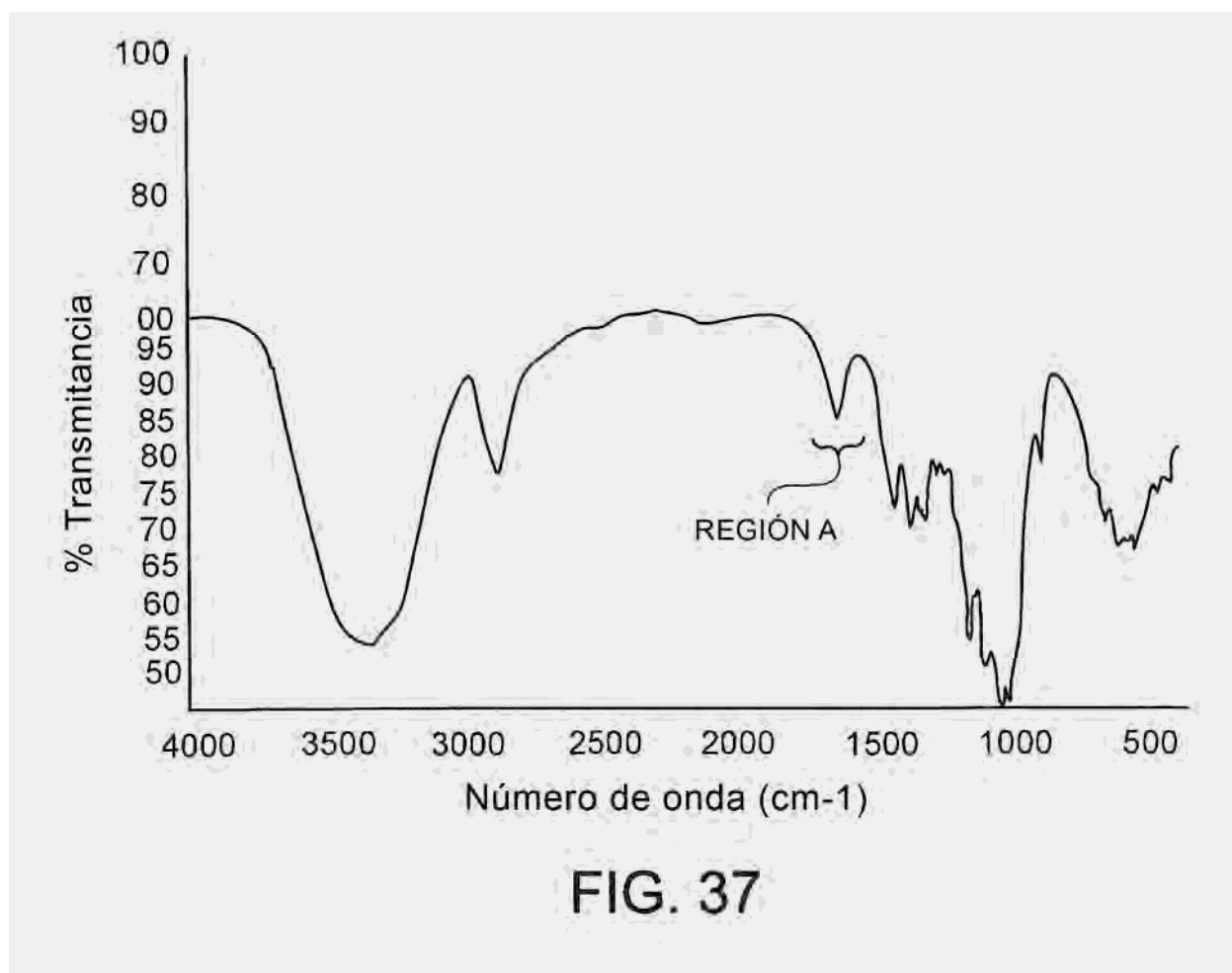


FIG. 36



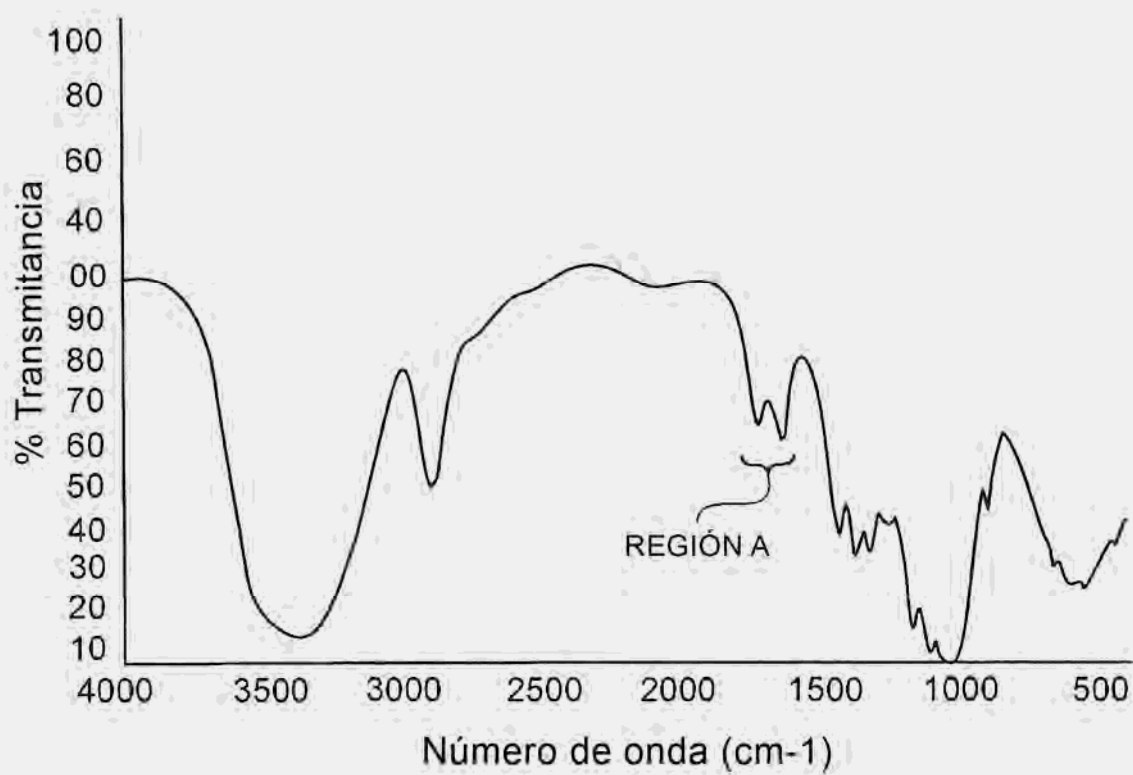


FIG. 38

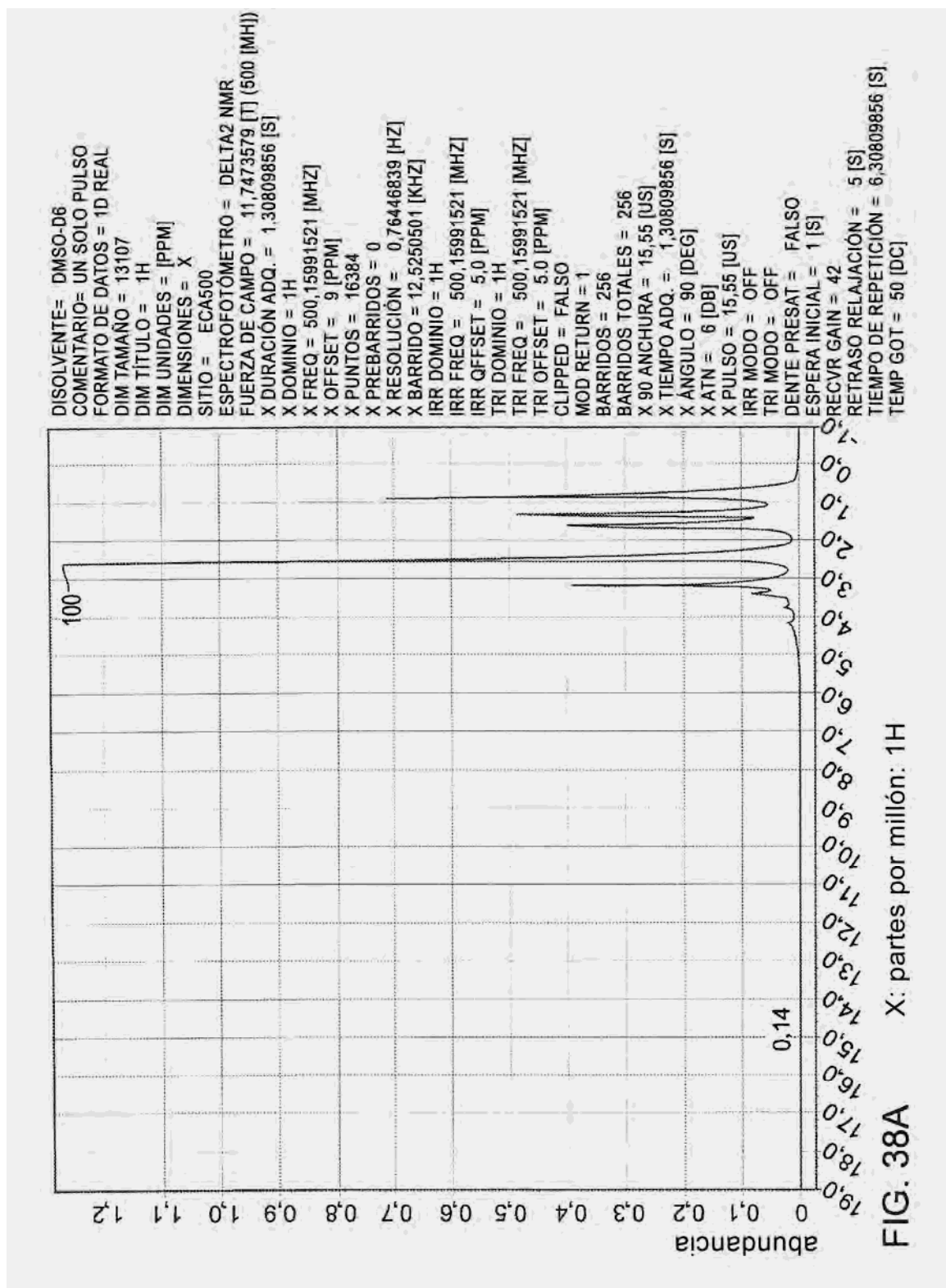


FIG. 38A X: partes por millón: 1H

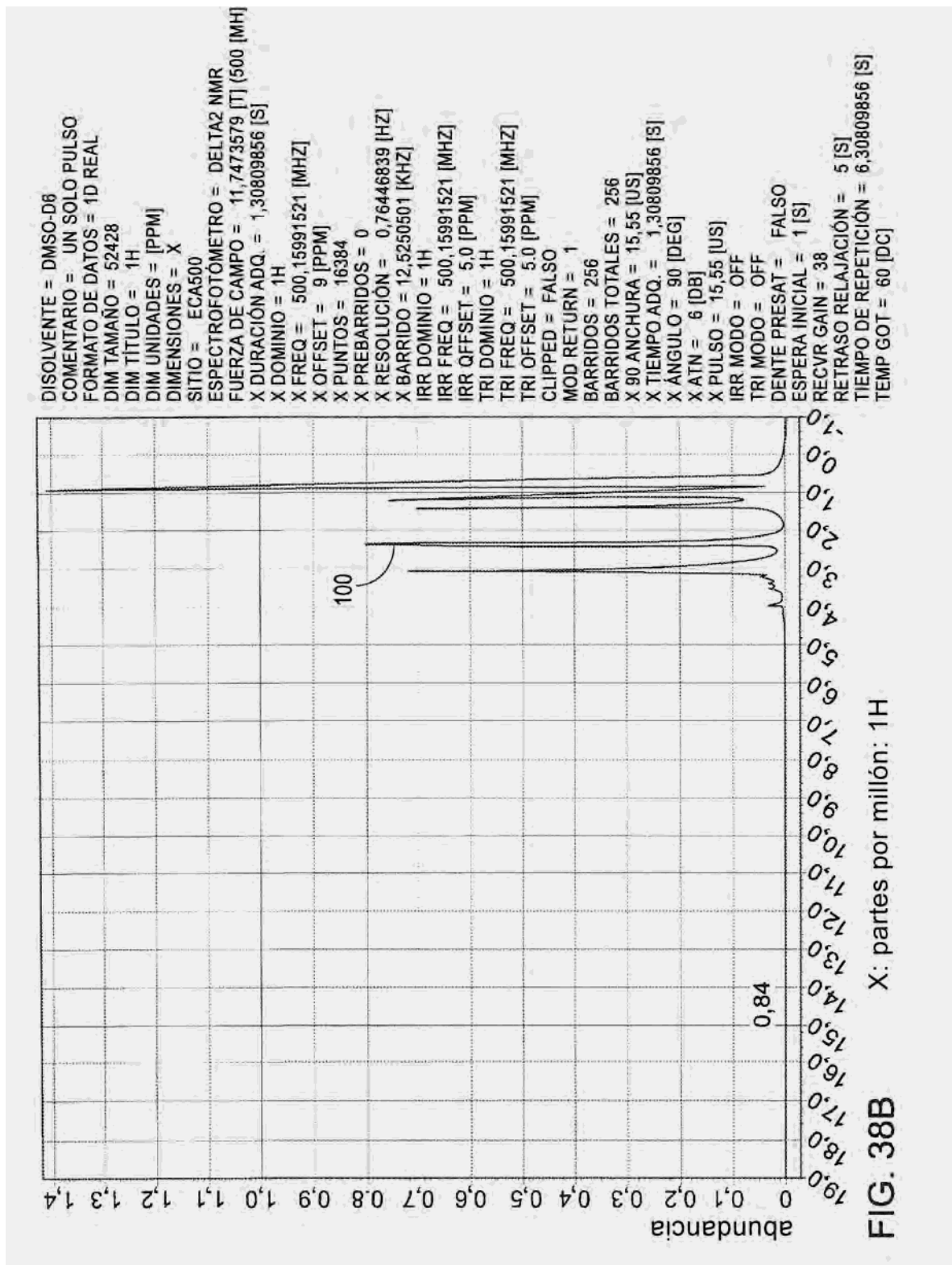
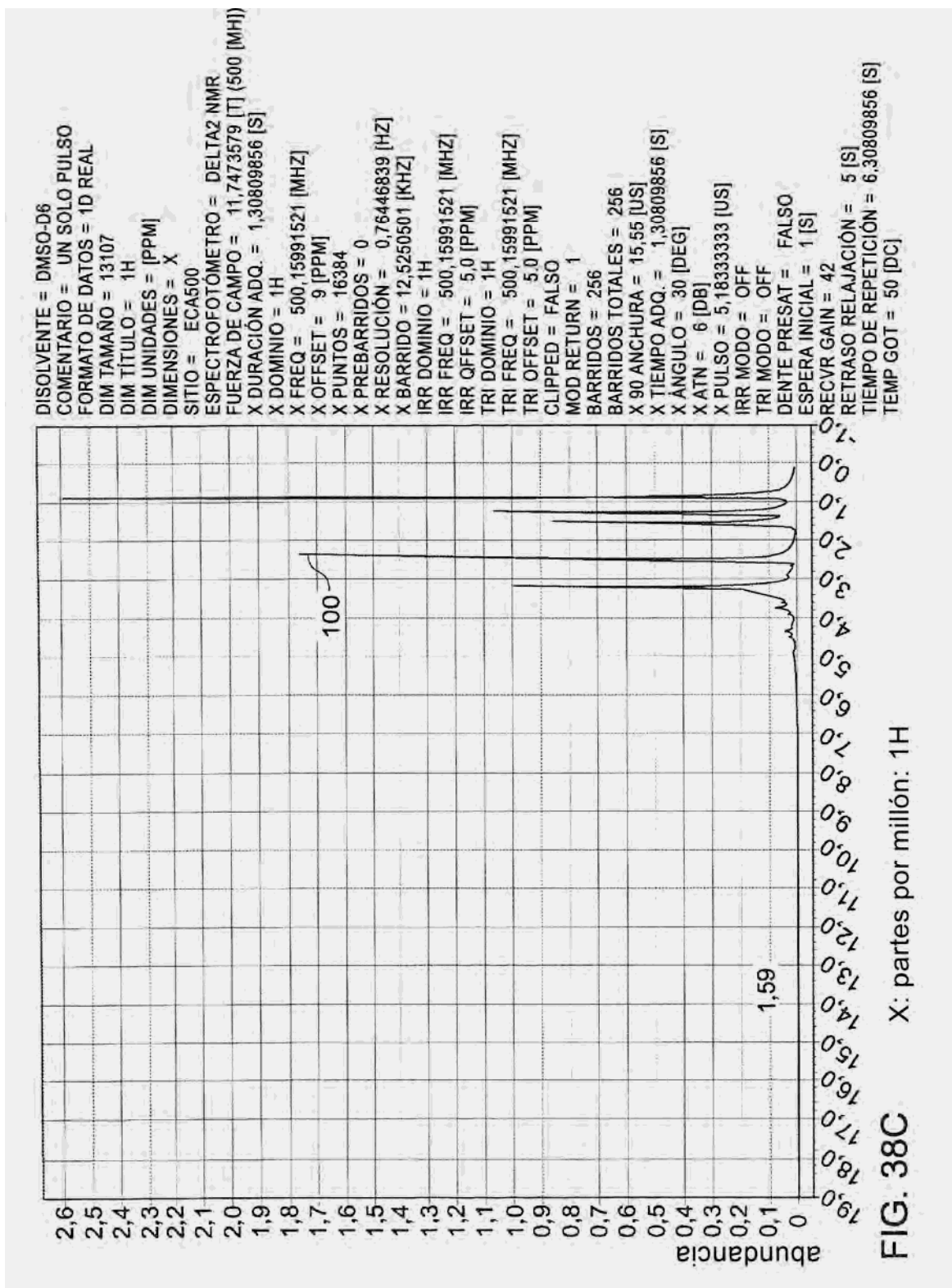
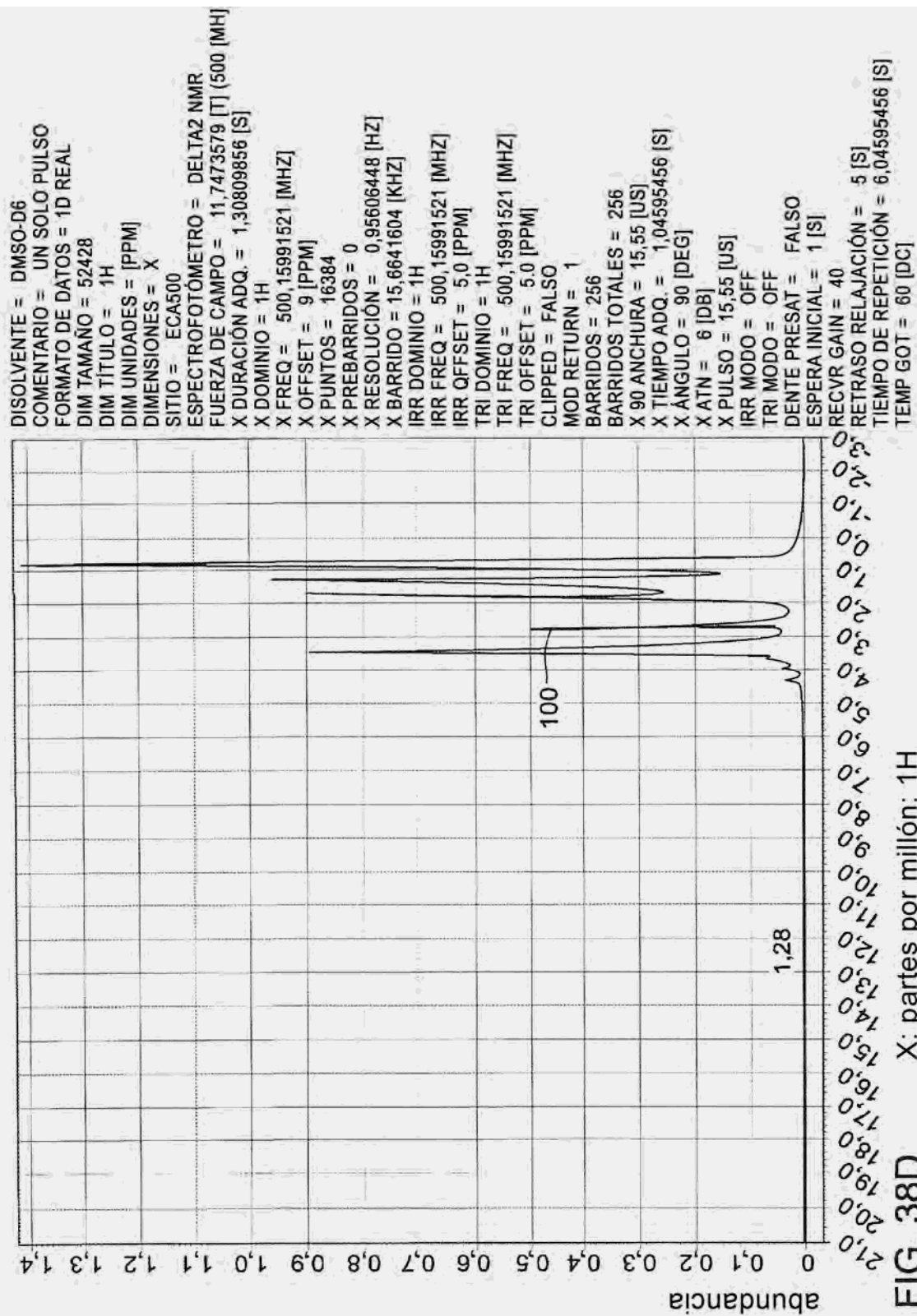
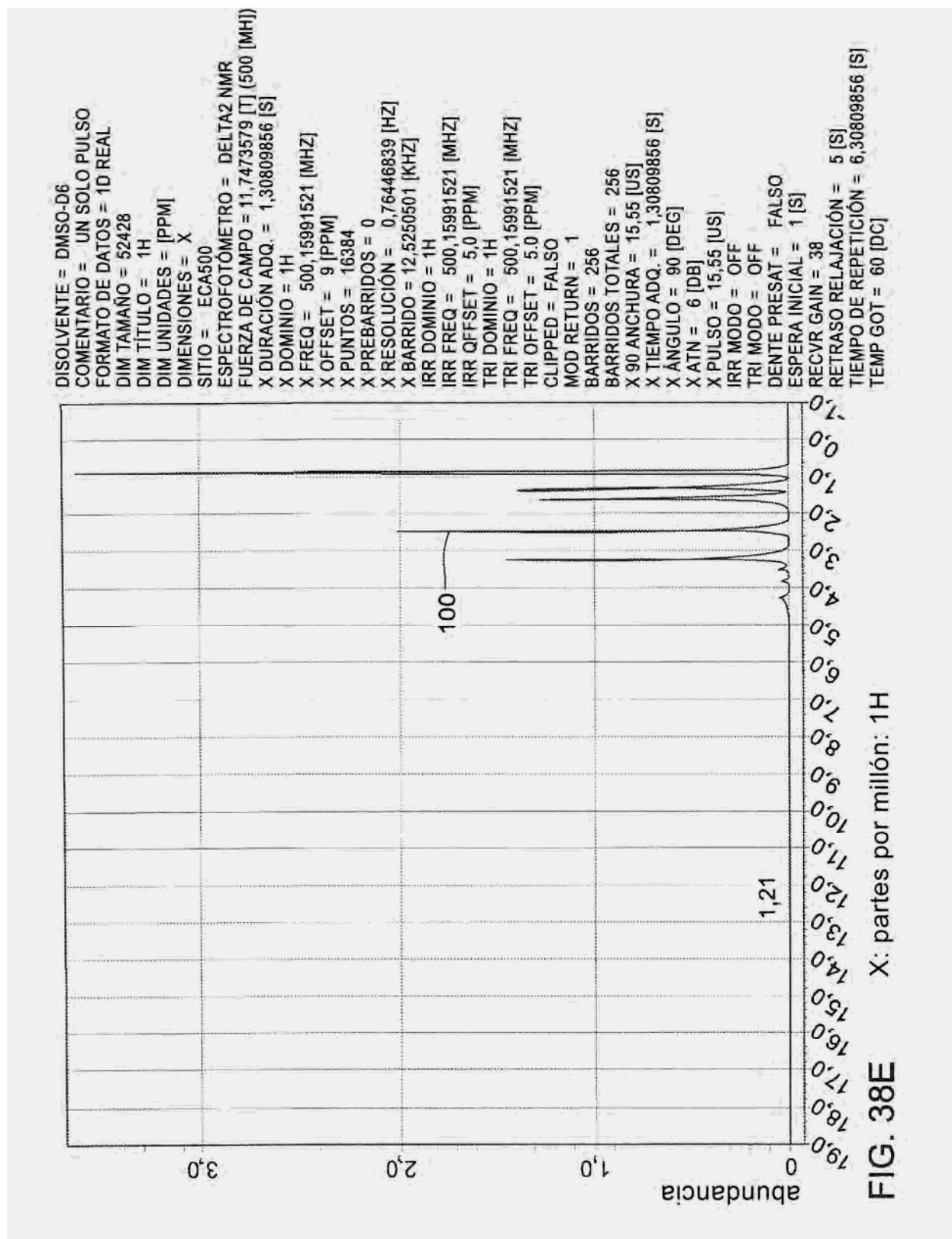
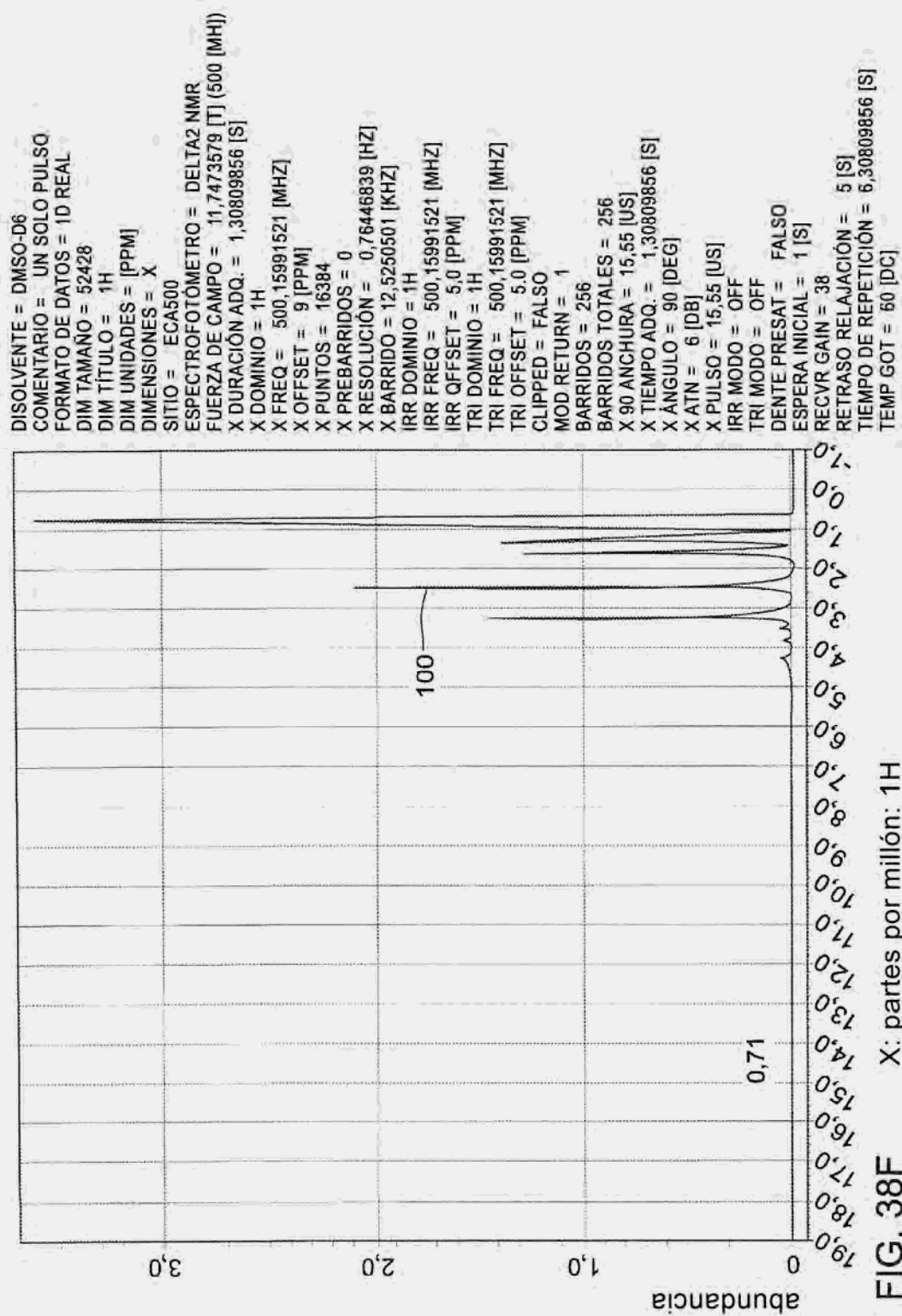


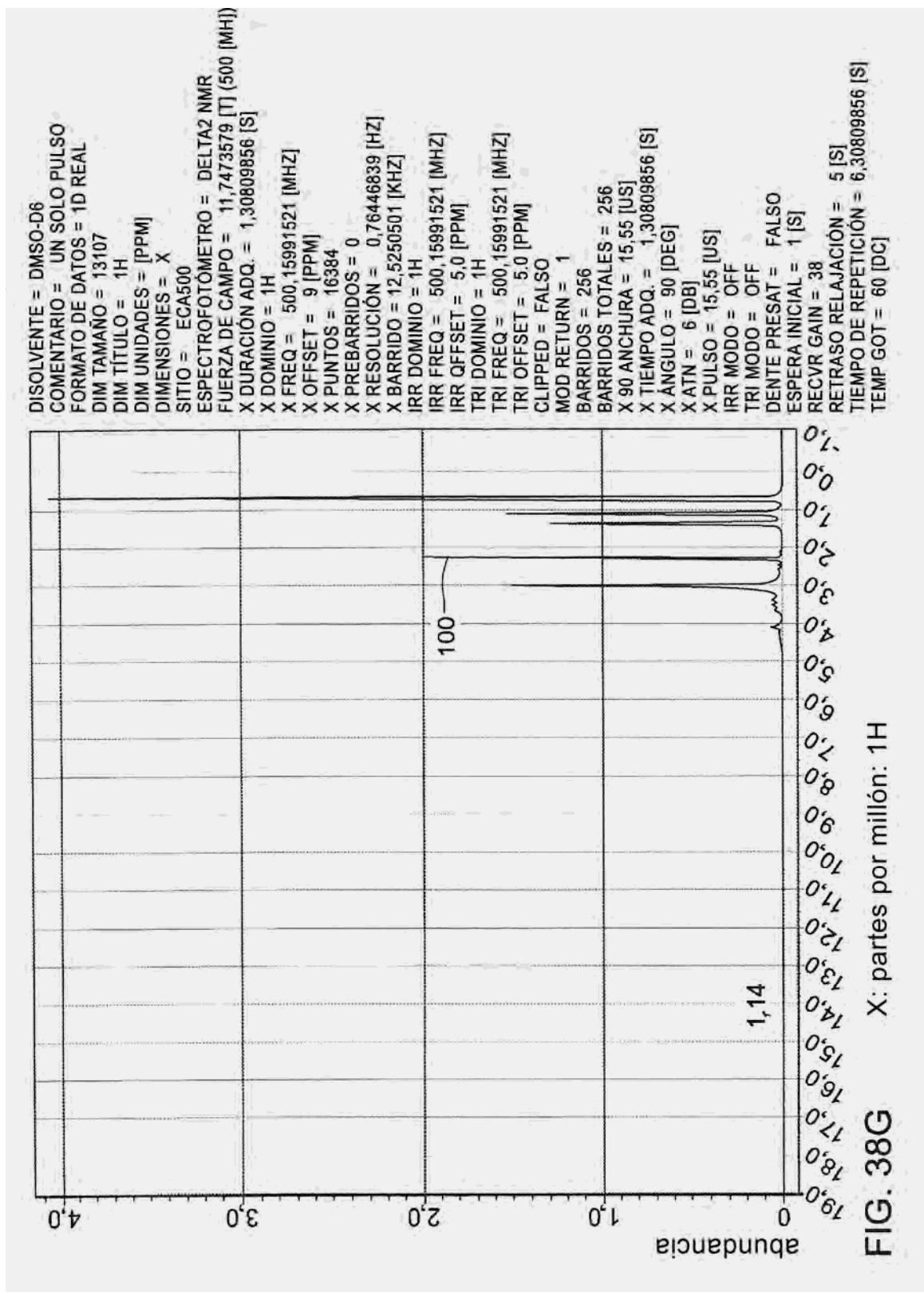
FIG. 38B X: partes por millón: 1H

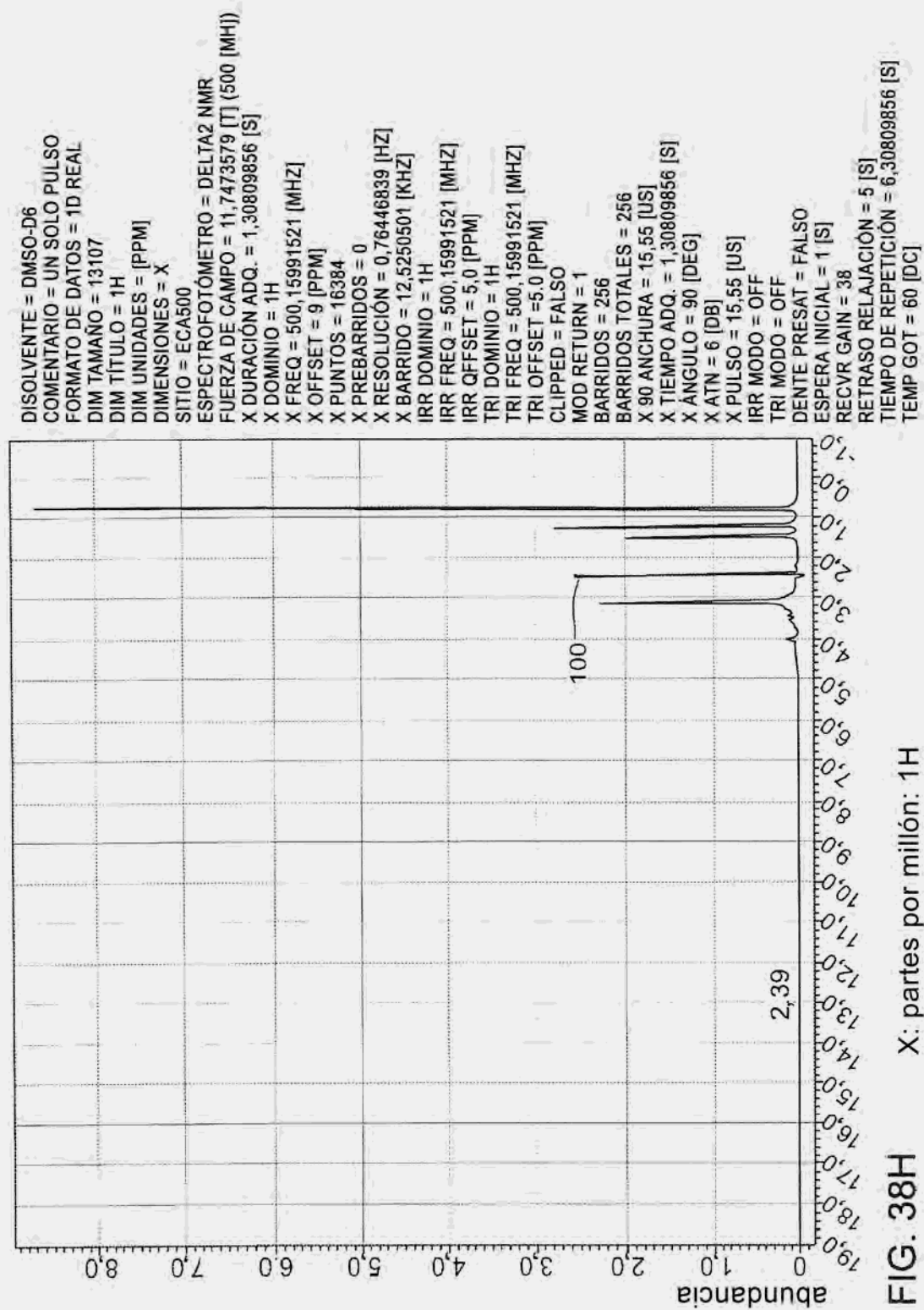


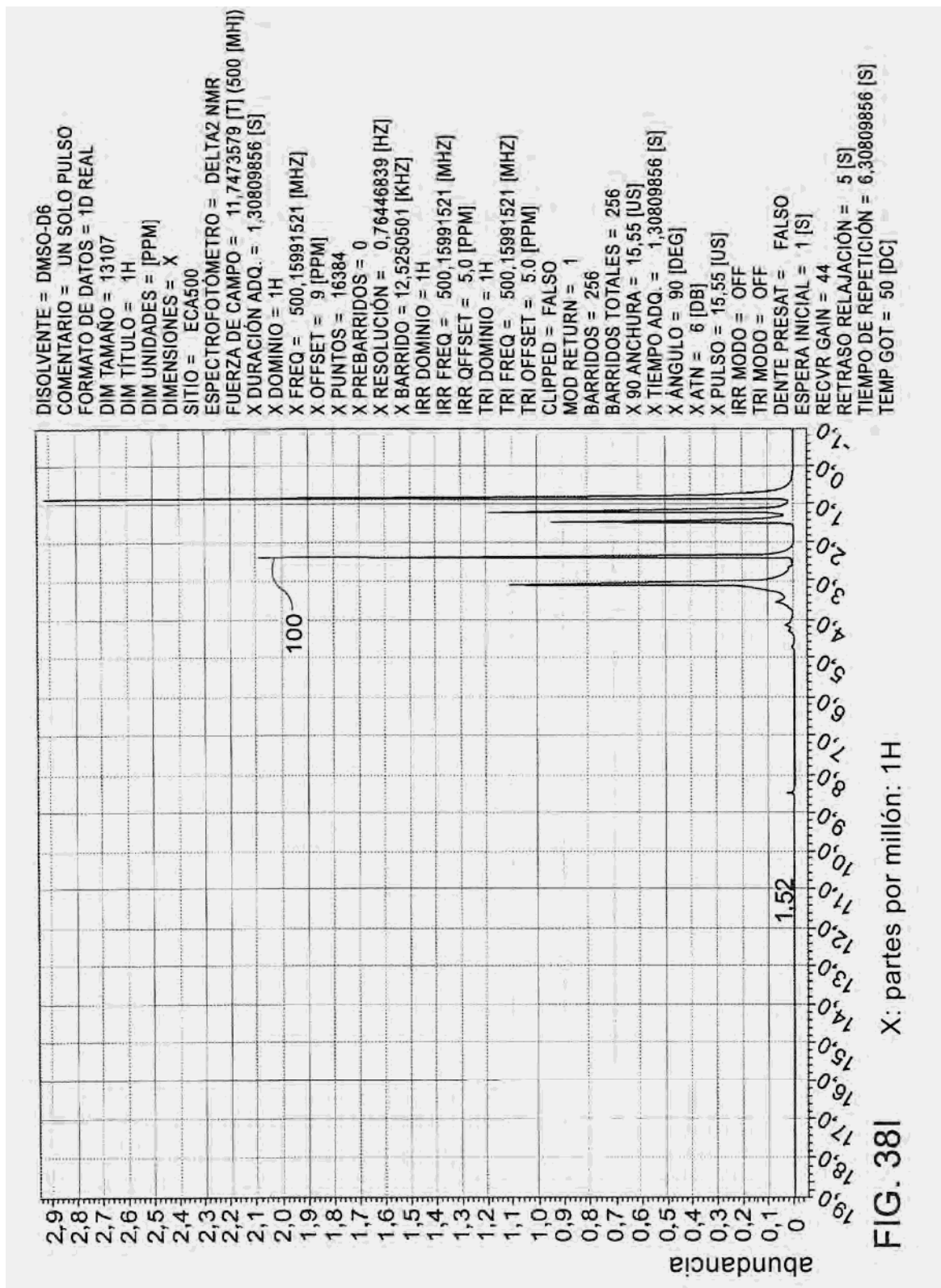












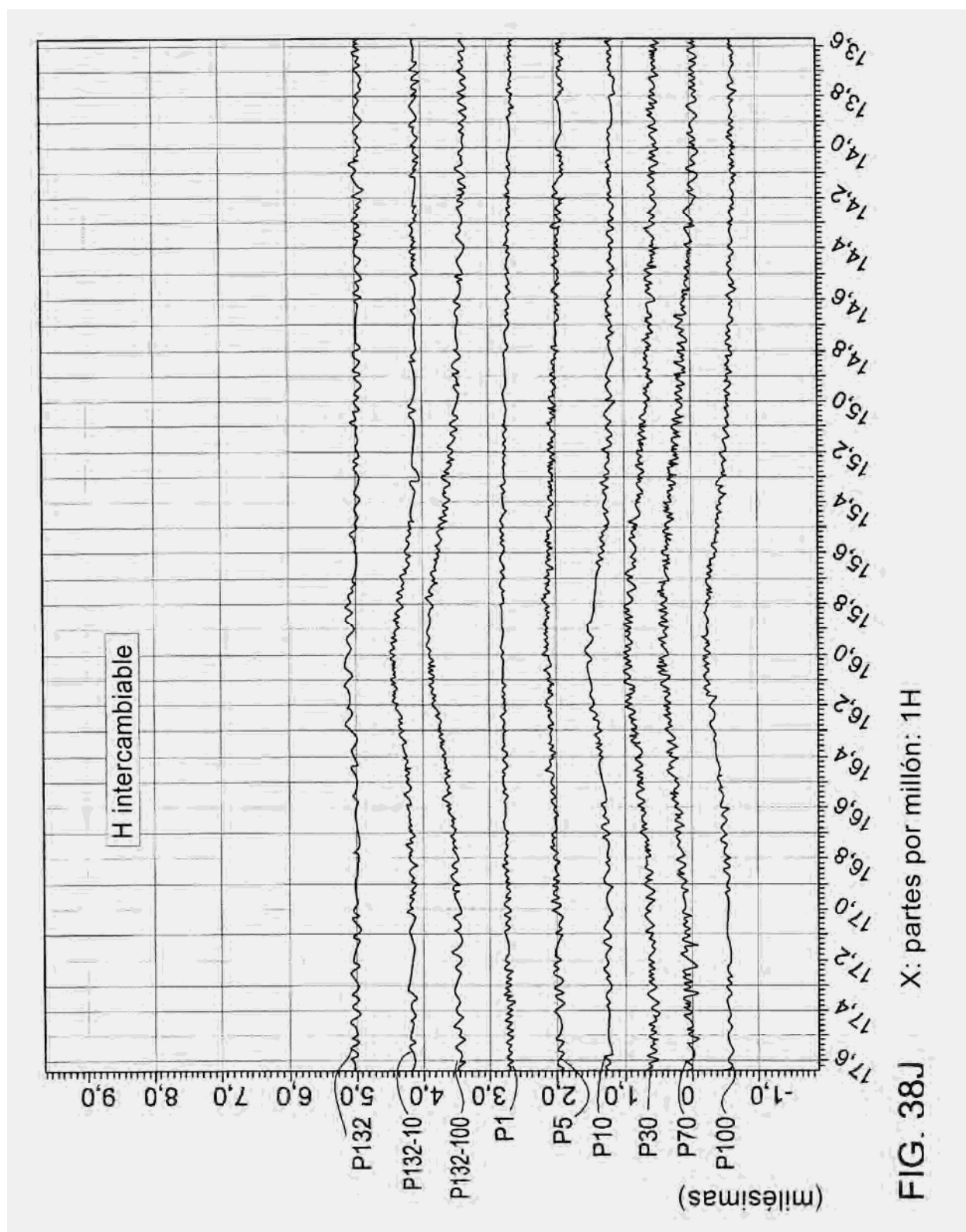


FIG. 38J X: partes por millón: 1H

