



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

(21) **PI0612939-0 A2**

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



(51) *Int.Cl.:*
C12P 19/02

(54) Título: **MÉTODOS DE TRATAMENTO DE BIOMASSA COMPOSTA DE MATÉRIAS-PRIMAS INTEGRADAS**

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

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

(72) Inventor(es): Bonnie Hames, James B. Dunson , Julie Friend, Melvin Tucker, Richard Elander, Susan Hennessey

(74) Procurador(es): Cristiane Araújo Rodrigues

(86) Pedido Internacional: PCT US2006014144 de 12/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/110899de 19/10/2006

(57) Resumo: MÉTODOS DE TRATAMENTO DE BIOMASSA COMPOSTA DE MATÉRIAS-PRIMAS INTEGRADAS. A presente invenção fornece um método de tratamento de biomassa composta de matérias-primas integradas para produzir açúcares fermentáveis. Um aspecto dos métodos descritos no presente inclui uma etapa de pré-tratamento em que a biomassa é integrada com um fluxo de alimentação alternativo e a matéria-prima integrada resultante, em concentrações relativamente altas, é tratada com baixa concentração de amônia com relação ao peso seco de biomassa. Em outro aspecto, uma alta concentração de sólidos de biomassa previamente tratada é integrada com um fluxo de alimentação alternativo para sacarificação.

“MÉTODOS DE TRATAMENTO DE BIOMASSA COMPOSTA DE MATÉRIAS-PRIMAS INTEGRADAS”

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

5

DECLARAÇÃO DE DIREITOS GOVERNAMENTAIS

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

CAMPO DA INVENÇÃO

10

A presente invenção refere-se ao campo geral de processamento de biomassa. Especificamente, são fornecidos métodos de integração de fluxos de alimentação alternativos que incluem co-produtos de baixo valor e fluxos residuais de processamento industrial, tais como processamento de grãos e outras sementes, em biomassa para o tratamento e utilização em processos de produção de produtos com alto valor.

15

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

20

Matérias-primas e resíduos celulósicos e lignocelulósicos, tais como resíduos agrícolas, madeira, resíduos florestais, lodo de fabricação de papel e resíduos sólidos municipais e industriais fornecem matéria-prima renováveis potencialmente grande para a produção de substâncias químicas, plásticos, combustíveis e alimentos. Matérias-primas e resíduos celulósicos e lignocelulósicos, compostos de polímeros de carboidrato que compreendem celulose, hemicelulose, glucanos e lignina, são geralmente tratados por uma série de meios químicos, mecânicos e enzimáticos para liberar principalmente açúcares de hexose e pentose, que podem ser fermentados em seguida em produtos úteis.

25

São utilizados métodos de pré-tratamento para fabricar os polímeros de carboidrato de materiais celulósicos e lignocelulósicos mais

facilmente disponíveis para enzimas de sacarificação para essa hidrólise. Os métodos de pré-tratamento padrão historicamente utilizaram principalmente ácidos fortes em altas temperaturas, entretanto, devido a altos custos de energia, altos custos de equipamento, altos custos de recuperação de catalisador de pré-tratamento e incompatibilidade com enzimas de 5 sacarificação, métodos alternativos estão sendo desenvolvidos, tais como pré-tratamento enzimático ou o uso de ácido ou base em temperaturas mais suaves em que hidrólise reduzida de polímeros de carboidratos de biomassa ocorre durante o pré-tratamento, que necessita de sistemas de enzimas 10 aprimorados para sacarificar celulose e hemicelulose.

Práticas atuais de utilização de biomassa são geralmente dirigidas ao fornecimento de fluxo de biomassa, freqüentemente de uma fonte, e pré-tratamento do fluxo de biomassa por meio dos métodos padrão descritos acima. Estas práticas não se utilizam da integração de diversos fluxos de 15 biomassa, tal como em fluxos em processo ou fluxos residuais, em diferentes etapas de processamento, e não incluem processos de tratamento economicamente robustos para os mencionados fluxos de biomassa integrados.

A fim de atingir um processo economicamente robusto que 20 incorpora o uso de fluxos de alimentação de biomassa integrados, é necessário um processo comercial que inclui hidrólise de carboidratos em lignocelulose de fluxos de alimentação de biomassa integrados. Para atingir a viabilidade econômica, este processo deve também fornecer altos rendimentos de açúcares em altas concentrações, utilizando baixas quantidades de 25 substâncias e produzem fonte de açúcares fermentáveis com baixa toxicidade para organismos fermentativos que convertem açúcares em substâncias de valor agregado e combustíveis.

Os métodos descritos no presente abordam meios de

incorporação dos mencionados fluxos de alimentação integrados em processos economicamente robustos que atendem aos critérios necessários acima para a produção de substâncias com valor agregado e combustíveis.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

5 A presente invenção fornece um método de tratamento de biomassa composta de matérias-primas integradas para produzir açúcares fermentáveis.

Um aspecto dos métodos descritos no presente inclui uma etapa de pré-tratamento em que a biomassa é integrada com um fluxo de
10 alimentação alternativo e a matéria-prima integrada resultante, em concentrações relativamente altas, é tratada com baixa concentração de amônia com relação ao peso seco de biomassa. Em outro aspecto, uma alta concentração de sólidos de biomassa previamente tratada é integrada com um fluxo de alimentação alternativo para sacarificação.

15 Em uma realização, a biomassa é tratada em um método que compreende:

- a. fornecimento de biomassa;
- b. adição à biomassa de a) de pelo menos um fluxo de alimentação alternativo para produzir uma matéria-prima integrada ;
- 20 c. contato da matéria-prima integrada de b) com uma solução aquosa que compreende amônia para formar uma mistura de matéria-prima integrada e amônia aquosa, em que a amônia está presente em concentração pelo menos suficiente para manter pH alcalino da mistura de matéria-prima integrada e amônia aquosa, mas em que a mencionada amônia está presente
25 em menos de cerca de 12% em peso com relação ao peso seco de matéria-prima integrada e, adicionalmente, em que o peso seco de matéria-prima integrada encontra-se em uma alta concentração de sólidos de pelo menos cerca de 15% em peso com relação ao peso da mistura de matéria-prima

integrada e amônia aquosa, para gerar um produto de matéria-prima integrada previamente tratado; e

d. contato do produto de c) com uma associação de enzimas de sacarificação sob condições apropriadas;

5 para produzir um produto de açúcar fermentável.

Em outra realização, matérias-primas integradas são tratadas e sacarificadas em um método que compreende:

a. fornecimento de biomassa;

b. submissão da biomassa de a) a um processo de pré-
10 tratamento para fabricar um produto de biomassa previamente tratado;

c. adição ao produto de biomassa previamente tratada de b) de pelo menos um fluxo de alimentação alternativo para produzir uma primeira ou segunda matéria-prima integrada ; e

d. contato da primeira ou segunda matéria-prima integrada
15 de c) com uma associação de enzimas de sacarificação sob condições apropriadas;

para produzir um produto de açúcar fermentável. Em um aspecto do presente método, o processo de pré-tratamento de b) inclui o contato da biomassa com solução aquosa que compreende amônia para formar uma
20 mistura de biomassa e amônia aquosa, em que a amônia está presente em concentração pelo menos suficiente para manter pH alcalino da mistura de biomassa e amônia aquosa, mas em que a mencionada amônia está presente em menos de cerca de 12% em peso com relação ao peso seco de biomassa e, adicionalmente, em que o peso seco de biomassa encontra-se em alta
25 concentração de sólidos de pelo menos cerca de 15% em peso com relação ao peso da mistura de biomassa e amônia aquosa. Em aspecto adicional do presente método, o fluxo de alimentação alternativo que é adicionado ao produto de biomassa previamente tratada de b) compreende destilação produzida durante o

processamento de sementes. Em ainda outro aspecto, a biomassa de a) pode ou não ser matéria-prima integrada conforme descrito no presente.

Os açúcares fermentáveis resultantes dos métodos descritos no presente podem ser utilizados em seguida para a produção de substâncias com valor agregado, combustíveis ou outros produtos com alto valor.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

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

A presente invenção fornece métodos de tratamento de biomassa e fluxos de alimentação alternativos, denominados coletivamente "matérias-primas integradas", para produzir açúcares fermentáveis. Os açúcares fermentáveis podem ser utilizados em seguida para a produção de substâncias com valor agregado, combustíveis ou outros produtos com alto valor.

Os fluxos de alimentação alternativos incluem pelo menos um co-produto com baixo valor, fluxo de processamento e/ou fluxo de resíduos de processamento industrial.

A biomassa e fluxos de alimentação alternativos podem ser combinados para formar matéria-prima integrada para o processamento de

pré-tratamento para atingir pré-tratamento concorrente de biomassa e o fluxo de processo ou co-produto. Alternativamente, biomassa não integrada pode ser previamente tratada, o fluxo de processo ou co-produto adicionado à biomassa previamente tratada, formando segunda matéria-prima integrada para 5 sacarificação. Nos dois casos, é incluída etapa de pré -tratamento em que biomassa não integrada ou matéria-prima integrada em concentração relativamente alta é tratada com concentração relativamente baixa de amônia com relação ao peso seco do material inicial e o produto tratado com amônia é digerido em seguida com uma associação de enzimas de sacarificação para 10 produzir açúcares fermentáveis. Os açúcares fermentáveis são convertidos por biocatalisadores em produtos alvo com alto valor, tais como substâncias, plásticos e combustíveis.

DEFINIÇÕES:

No presente relatório descritivo, é utilizada uma série de termos. 15 São fornecidas as definições a seguir:

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

O termo “lignocelulósico” designa composição que compreende 20 lignina e celulose. Material lignocelulósico pode também compreender hemicelulose.

O termo “celulósico” designa composição que compreende celulose.

Por “peso seco” de biomassa, indica-se o peso da biomassa que 25 possui toda ou essencialmente toda a água removida. Peso seco é tipicamente medido de acordo com o Padrão E1756-01 da Sociedade Norte-Americana de Testes e Materiais (ASTM) (*Standard Test Method for Determination of Total Solids in Biomass*) ou o Padrão T-412 om-02 da Technical Association of the

Pulp and Paper Industry, Inc. (TAPPI) (*Moisture in Pulp, Paper and Paperboard*).

A expressão "substância alvo" designa substância produzida por meio de fermentação. Substância é utilizada em sentido amplo e inclui moléculas tais como proteínas, que incluem, por exemplo, peptídeos, enzimas e anticorpos.

Substância alvo que "pode ser derivada de biomassa" é substância alvo produzida por processo por meio do qual biomassa é hidrolisada para liberar açúcares fermentáveis e os açúcares fermentáveis são fermentados utilizando pelo menos um biocatalisador para produzir substância alvo desejada.

As expressões "plastificante" e "agente amolecedor" designam materiais que causam redução das forças intermoleculares coesivas ao longo das cadeias de polímero ou entre elas. Esses materiais podem agir, por exemplo, para reduzir a cristalinidade ou romper uniões entre fibras de carboidrato de lignina e não de lignina (tais como celulose ou hemicelulose).

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

A expressão "biomassa previamente tratada" indica biomassa que tenha sido submetida a pré-tratamento antes da sacarificação.

"Biomassa" indica qualquer material celulósico ou lignocelulósico e inclui materiais que compreendem celulose, compreendendo ainda opcionalmente hemicelulose, lignina, amido, oligossacarídeos e/ou monossacarídeos. Biomassa pode também compreender componentes adicionais, tais como proteína e/ou lipídio. Segundo a presente invenção, biomassa pode ser derivada de uma única fonte, ou biomassa pode compreender mistura derivada de mais de uma fonte; biomassa poderá compreender, por exemplo, mistura de espigas de milho e forragem de milho

ou mistura de grama e folhas. Biomassa inclui, mas sem limitar-se a safras bioenergéticas, resíduos agrícolas, resíduo sólido municipal, resíduo sólido industrial, lodo de fabricação de papel, resíduos de jardins, resíduos de madeira e de florestas. Exemplos de biomassa incluem, mas sem limitar-se a 5 grãos de milho, espigas de milho, resíduos de safras tais como cascas de milho, forragem de milho, gramas, trigo, palha de trigo, feno, cevada, palha de cevada, palha de arroz, brotos de grama, resíduos de papel, bagaço de cana de açúcar, sorgo, soja, árvores, ramos, raízes, folhas, lascas de madeira, serragem, arbustos e moitas, legumes, frutas, flores e esterco animal. Em uma 10 realização, biomassa que é útil para a presente invenção inclui biomassa que possui valor de carboidrato relativamente alto, é relativamente densa e/ou de coleta, transporte, armazenagem e/ou manipulação relativamente fácil. Em realização da presente invenção, biomassa que é útil inclui espigas de milho, forragem de milho e bagaço de cana de açúcar.

15 "Fluxo de alimentação alternativo" ou "matéria-prima alternativo" inclui uma série de materiais que poderão beneficiar-se do processo geral de conversão de biomassa em açúcares fermentáveis para a produção de substâncias com valor agregado e/ou combustíveis. Estes fluxos de alimentação podem ser produzidos por meio de processamento industrial, incluindo processamento de grãos ou 20 sementes, processamento de alimentos, processamento de papel e polpa etc. Um tipo desse material inclui co-produtos e resíduos do processamento de grãos ou outras sementes, que incluem processamento por moagem seca de milho, moagem seca de milho e moagem úmida de milho. Conforme descrito no presente, em algumas realizações, processamento industrial e/ou de resíduos agrícolas fornece 25 materiais fibrosos que podem ser incorporados a processamento de pré-tratamento. Em outras realizações, fluxos de processamento industrial ou outros fluxos de alimentação (tais como fluxos de resíduo ou com baixo valor) podem ser incorporados a biomassa após o pré-tratamento para beneficiar-se de etapas de

processamento de biomassa adicionais que incluem sacarificação e fermentação. Fontes não limitadoras de fluxos de resíduos e de baixo valor que podem compor fluxo de alimentação alternativo incluem resíduos agrícolas, tais como cascas de milho e outras safras, resíduos sólidos municipais, resíduos sólidos industriais, lodo da fabricação de papel, resíduos de jardins, resíduos de madeiras e florestas.

“Matérias-primas integradas” ou “fluxos de alimentação integrados” indica uma combinação de biomassa e pelo menos um fluxo de alimentação ou matéria-prima alternativo.

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

MATÉRIA-PRIMA INTEGRADA PARA PRÉ-TRATAMENTO:

Aspecto do método do presente inclui a combinação de qualquer matéria-prima de biomassa com pelo menos um fluxo de alimentação alternativo que é compreendido de co-produto de baixo valor ou fluxo de processamento industrial, tal como fluxo de resíduos.

Conforme descrito acima, o processamento industrial para a geração de produtos com alto valor, tais como óleo, amido, proteína, xarope de açúcar e etanol, freqüentemente gera co-produtos com baixo valor, fluxos no processo e fluxos residuais. Nos métodos do presente, estes co-produtos são capturados para reciclagem de volta para fluxos de processamento de produtos com alto valor ou utilizados para beneficiar-se do processamento para a produção de combustíveis e substâncias com valor agregado.

Em aspecto do método reivindicado, co-produto de processamento de grãos ou outras sementes ou fluxo de processo que inclui fibra pode ser combinado com outra biomassa para fornecer matéria-prima

integrada que é tratada previamente.

Os materiais de interesse que compreendem a matéria-prima alternativa incluem co-produtos de baixo valor, fluxos em processo e fluxos residuais; que, juntos, são denominados fluxos alternativos. Co-produto de baixo valor, por exemplo, é aquele que é vendido para ração animal. Exemplos de baixos fluxos de processo de sementes com baixo teor de amido ou alto teor de óleo incluem fluxos de cascas que são separados no processamento de sojas, sementes de girassol, amendoins e sementes de algodão. Fluxos residuais que contêm material fibroso podem também ser utilizados na preparação de matéria-prima integrada para pré-tratamento. As matérias-primas integradas para pré-tratamento podem incluir material que contém fibra produzido no processamento de qualquer semente, tal como milho, aveia, trigo, cevada, arroz, canola, girassol, algodão, ervilha, soja e outros legumes.

Grãos de soja são tipicamente processados nos Estados Unidos por meio de extração de solvente com hexano para recuperar o óleo. Os grãos são limpos e podem ser secos e mantidos até o equilíbrio em umidade de 10-11% para facilitar a liberação do revestimento ou da casca de semente. Eles são partidos em seguida, descascados por meio de peneiramento ou aspiração e condicionados por meio de tratamento com fluxo (qv) para facilitar a formação de flocos. As carnes condicionadas são transformadas em flocos e extraídas com hexano para remover o óleo. Hexano e o óleo na micela são separados por meio de evaporação e o hexano é recuperado (*Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, quarta edição, 1997). Os revestimentos ou cascas de sementes removidos durante esse processamento podem ser utilizados como fluxo de alimentação integrado no método do presente.

O processamento de girassóis consiste de pressão de rosca, extração direta com hexano ou extração de solvente antes da pressão. Este último é mais comumente utilizado nos Estados Unidos. A primeira etapa é

limpeza, seguida por descascamento. A semente descascada é condicionada por meio de aquecimento e então segue para prensas de rosca ou é transformada em flocos como no caso de extração direta de solvente com hexano. O aglomerado prensado por rosca é moído para uso em alimentações ou granulado e extraído por hexano para recuperar o óleo restante (Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, quarta edição, 1997). As cascas removidas durante esse processamento podem ser utilizadas como fluxo de alimentação integrado no método do presente.

O processamento de amendoins em óleo de amendoim é conduzido por meio de prensa por rosca ou prensa prévia, seguida por extração de solvente. Em pressão de rosca, os amendoins são descascados, cozidos e prensados para gerar óleo bruto mais aglomerado que contém cerca de 5% de óleo residual. O aglomerado é moído e as cascas de amendoim moídas são misturadas de volta para ajustar o teor de proteína. Em extração de solvente em processamento prévio, as carnes cozidas são prensadas com rosca sob baixa pressão para remover parte do óleo e extraídas em seguida com hexano para reduzir o óleo residual para cerca de 1%. Hexano residual no alimento é recuperado por meio de aplicação de camisa ou fluxo vivo em retirador de solvente. Hexano na micela é recuperado por meio de evaporação (Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, quarta edição, 1997). As cascas removidas durante esse processamento podem ser utilizadas como fluxo de alimentação integrado no método do presente.

Sementes de algodão nos Estados Unidos são processadas em óleo e massa por meio de pressão de rosca ou extração de solvente. Em pressão de rosca, a semente é limpa, desfibrada, descascada, transformada em flocos e cozida antes da prensa. Rendimentos de prensa de rosca geram aglomerado que contém 2,5-4,0% de óleo residual. O aglomerado é moído em massa e cascas de semente de algodão moídas são misturadas de volta para ajustar teor de proteína em

padrões de comercialização. No procedimento de extração de solvente, os flocos são freqüentemente processados por meio de expansor para cozinhar rapidamente os flocos e formar aros, que são extraídos em seguida com hexano. A massa emergente dos extratores de solvente é liberada de hexano por meio de aquecimento (*Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, quarta edição, 1997). As cascas removidas durante esse processamento podem ser utilizadas como fluxo de alimentação integrado no método do presente.

Fluxos de processamento de grãos incluem fluxo de fibras composto de cascas que é produzido durante a moagem seca, resíduos de moagem fibrosa de moagem úmida, fluxos de grãos exauridos produzidos em vários processos e os grãos secos e solúveis de destilador (DDGS) e grãos secos de destilador (DDG) resultantes dos processos de moagem seca. DDGS inclui fibra, óleo, proteína e levedura e é o material restante após a remoção de etanol da mistura de fermentação. Os sólidos são filtrados para produzir a fração de DDG, que é vendida para ração animal. A fração líquida restante (destilação) pode ser reciclada de volta na forma de fluxo em processo ou evaporada e combinada com DDG para formar o co-produto DDGS.

Outro exemplo de fonte potencial para fluxos de alimentação alternativos incluem processamento de raízes, tais como processamento de beterrabas, batatas (brancas ou doces) etc. No processamento de beterraba para a produção de açúcar, o açúcar é removido por meio de extração contracorrente com água. Os sólidos de beterraba residuais, ou polpa, que saem do aparelho de extração são pressionados para remover água e reduzir o nível de umidade para cerca de 75%. Esta polpa prensada pode ser vendida como se encontra para operações de alimentação local, mas é mais comumente misturada com melaços, seca a cerca de 10% de umidade e vendida como ração para gado. (*Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, quarta edição, 1997). Esta polpa prensada pode ser utilizada

como fluxo de alimentação integrado no método do presente.

Os fluxos de alimentação alternativos utilizados no método do presente, além de material de processo fibroso, podem também conter quantidades menores de componentes que incluem proteína, óleo e/ou amido.

5 Os depositantes revelaram que a combinação de materiais de sementes processados, amido e/ou óleo com biomassa que é tipicamente utilizado em pré-tratamento, não apresenta impacto negativo sobre o rendimento de açúcares fermentáveis produzidos no tratamento de sacarificação a seguir do matéria-prima integrada e previamente tratado
10 utilizando o método do presente. Além disso, o rendimento de açúcar esperado produzido a partir da matéria-prima integrada no método do presente pode ser baseado no teor celulósico total (incluindo hemicelulósico) da matéria-prima integrada . Desta forma, os fluxos de processamento de sementes podem ser adicionados a outra biomassa para pré-tratamento e a fibra no fluxo de
15 processamento é tratada previamente junto com a outra biomassa na preparação para sacarificação, para produzir açúcares fermentáveis. A eficácia do uso desta matéria-prima integrada para pré-tratamento fornece matéria-prima abundante, de baixo custo e continuamente disponível para instalações de processamento de biomassa.

20

PRÉ-TRATAMENTO:

A concentração de amônia utilizada no pré-tratamento de matéria-prima integrada no método do presente é no mínimo concentração que é suficiente para manter alcalino o pH da mistura de matéria-prima integrada e amônia aquosa e no máximo menos de cerca de 12% em peso com relação ao
25 peso seco de matéria-prima integrada . Esta baixa concentração de amônia é suficiente para pré-tratamento e a baixa concentração pode também ser de menos de cerca de 10% em peso com relação ao peso seco de matéria-prima integrada . Concentração muito baixa de 6% de amônia com relação ao peso

seco de matéria-prima integrada ou menos pode também ser utilizada para pré-tratamento. Por alcalino, indica-se pH de mais de 7,0. É particularmente apropriado pH da mistura de matéria-prima integrada e amônia aquosa que é de mais de 8. Em uma realização, amônia está presente em menos de cerca de 8% em peso com relação ao peso seco de matéria-prima integrada . Em uma realização, amônia está presente em menos de cerca de 10% em peso com relação ao peso seco de matéria-prima integrada . É particularmente apropriada amônia a menos de cerca de 6% em peso com relação ao peso seco de matéria-prima integrada .

10 Amônia, da forma utilizada no processo do presente, fornece vantagens sobre outras bases. Amônia particiona-se em fase líquida e fase de vapor. Amônia gasosa pode difundir-se mais facilmente através da biomassa que base líquida, o que resulta em pré-tratamento mais eficaz em concentrações mais baixas. Amônia também concorre com hidrólise, por meio de amonólise, de acetil ésteres em biomassa para formar acetamida (conforme 15 exibido em CL2825, que é incorporado ao presente como referência, Exemplo 11). Acetamida é menos tóxica que acetato para certos organismos de fermentação, tais como *Zymomonas mobilis* (conforme exibido em CL2825, que é incorporado ao presente como referência, Exemplo 12). Desta forma, a 20 conversão de acetil ésteres em acetamida em vez de ácido acético reduz a necessidade de remoção de ácido acético. O uso de amônia também reduz a necessidade de suplementar meio de crescimento utilizado durante fermentação com fonte de nitrogênio. Além disso, amônia é material de baixo custo e, desta forma, fornece processo econômico. Amônia pode também ser 25 reciclada para o reator de pré-tratamento durante pré-tratamento ou após pré-tratamento, de forma a permitir processo mais econômico. Após o pré-tratamento, por exemplo, à medida que a temperatura é reduzida para a apropriada para sacarificação, gás amônia pode ser liberado, opcionalmente na

presença de vácuo, e pode ser reciclado. Em processo contínuo, amônia pode ser continuamente reciclada.

Segundo o método do presente, a solução aquosa que compreende amônia pode compreender opcionalmente pelo menos uma base adicional, tal como hidróxido de sódio, carbonato de sódio, hidróxido de potássio, carbonato de potássio, hidróxido de cálcio e carbonato de cálcio. A pelo menos uma base adicional pode ser agregada em quantidade que é combinada com amônio para formar quantidade de base total que é de menos de cerca de 20% em peso com relação ao peso seco de biomassa. Preferencialmente, a segunda base total mais amônia encontra-se em quantidade que é de menos de cerca de 15% em peso. Pode-se utilizar, por exemplo, base(s) adicional(is) para neutralizar ácidos em biomassa, para fornecer íons metálicos para as enzimas de sacarificação ou para fornecer íons metálicos para o meio de crescimento de fermentação.

No método do presente, o peso seco de matéria-prima integrada encontra-se em concentração inicial de pelo menos cerca de 15% até cerca de 80% do peso da mistura de matéria-prima integrada e amônia aquosa. Mais adequadamente, o peso seco de matéria-prima integrada encontra-se em concentração de cerca de 15% a cerca de 60% do peso da mistura de matéria-prima integrada e amônia aquosa. O percentual de matéria-prima integrada na mistura de matéria-prima integrada e amônia aquosa é mantido alto para minimizar a necessidade de concentração de açúcares resultante da sacarificação da matéria-prima integrada previamente tratada, para uso em fermentação. A alta concentração de matéria-prima integrada também reduz o volume total de material de pré-tratamento, o que torna o processo mais econômico.

A matéria-prima integrada pode ser utilizada diretamente conforme obtida por meio das fontes ou a energia pode ser aplicada à matéria-prima integrada para reduzir o tamanho, aumentar a extensão exposta e/ou

aumentar a disponibilidade de celulose, hemicelulose e/ou oligossacarídeos presentes na matéria-prima integrada para amônia e enzimas de sacarificação utilizadas na segunda etapa do método. Meios de energia úteis para redução do tamanho, aumento da extensão exposta e/ou aumento da disponibilidade de celulose, hemicelulose e/ou oligossacarídeos presentes na matéria-prima integrada para amônia e enzimas de sacarificação incluem, mas sem limitar-se a moagem, fragmentação, quebra, retalhamento, corte, refino em disco, ultrassom e microondas. Esta aplicação de energia pode ocorrer antes ou durante o pré-tratamento, antes ou durante a sacarificação ou qualquer de suas combinações.

O pré-tratamento de matéria-prima integrada com solução de amônia é conduzido em qualquer recipiente apropriado. Tipicamente, o recipiente é aquele que pode suportar pressão, possui mecanismo de aquecimento e possui mecanismo de mistura do conteúdo. Os recipientes disponíveis comercialmente incluem, por exemplo, o reator Zipperclave® (Autoclave Engineers, Erie, PA), o reator Jaygo (Jaygo Manufacturing, Inc., Mahwah, NJ) e o reator de pistola de vapor (Autoclave Engineers, Erie, PA). Reatores em escala muito maior com capacidades similares podem ser utilizados. Alternativamente, a matéria-prima integrada e a solução de amônia podem ser combinadas em um recipiente e transferidas em seguida para outro reator. Além disso, matéria-prima integrada pode ser previamente tratada em um recipiente e processada adicionalmente em seguida em outro reator tal como o reator de pistola de vapor (Autoclave Engineers, Erie, PA).

Antes do contato da matéria-prima integrada com solução aquosa que compreende amônia, pode-se aplicar vácuo ao recipiente que contém a matéria-prima integrada. Evacuando-se ar dos poros da matéria-prima integrada, pode-se atingir melhor penetração da amônia na matéria-prima integrada. O período de tempo para aplicação de vácuo e a quantidade de

pressão negativa que é aplicada à matéria-prima integrada dependerão do tipo de matéria-prima integrada e podem ser determinados empiricamente, de forma a atingir pré-tratamento ideal da matéria-prima integrada (conforme medido por meio da produção de açúcares fermentáveis após a sacarificação).

5 O contato da matéria-prima integrada com solução aquosa que compreende amônia é conduzido sob temperatura de cerca de 4 °C a cerca de 200 °C. Foi revelado que contato inicial da matéria-prima com amônia a 4 °C, que permite a impregnação a esta temperatura, aumenta a eficiência de sacarificação. Em outra realização, o mencionado contato da matéria-prima
10 integrada é conduzido sob temperatura de cerca de 75 °C a cerca de 150 °C. Em ainda outra realização, o mencionado contato da matéria-prima integrada é conduzido sob temperatura de mais de 90 °C a cerca de 150 °C.

O contato da matéria-prima integrada com solução aquosa que compreende amônia é conduzido por período de tempo de até cerca de oito
15 horas. São possíveis períodos de pré-tratamento mais longos, mas período de tempo mais curto é preferível por razões econômicas práticas.

Em uma realização, o processo de pré-tratamento pode ser realizado em temperatura relativamente alta por período de tempo relativamente curto, tal como cerca de 100 °C a cerca de 150 °C por cerca de
20 cinco minutos a cerca de duas horas. Em outra realização, o processo de pré-tratamento pode ser realizado sob temperatura mais baixa por período de tempo relativamente longo, tal como cerca de 75 °C a cerca de 100 °C por cerca de duas horas a cerca de oito horas. Em ainda outra realização, o processo de pré-tratamento pode ser realizado à temperatura ambiente (cerca
25 de 22-26 °C) por período de tempo ainda mais longo de cerca de 24 horas. Outras combinações de tempo e temperatura intermediárias a estas podem também ser utilizadas.

Para o processo de pré-tratamento, a temperatura, tempo de pré-

tratamento, concentração de amônia, concentração de uma ou mais bases adicionais, concentração de matéria-prima integrada , tipo de matéria-prima integrada e tamanho de partículas de matéria-prima integrada são relacionados; desta forma, estas variáveis podem ser ajustadas conforme o necessário para obter produto ideal a ser colocado em contato com uma associação de enzimas de sacarificação.

Plastificante, agente amolecedor ou sua combinação, tal como polióis (por exemplo, glicerol, etileno glicol), ésteres de polióis (tais como monoacetato de glicerol), éteres de glicol (tais como dietileno glicol), acetamida, etanol e etanolaminas, podem ser adicionados no processo de pré-tratamento (ou seja, etapa (a)). Pode-se adicionar plastificante como componente da solução de amônia aquosa, na forma de solução separada, ou como componente seco.

A reação de pré-tratamento pode ser realizada em qualquer recipiente apropriado, tal como reator em bateladas ou reator contínuo. Os técnicos no assunto reconhecerão que, sob temperaturas mais altas (acima de 100 °C), é necessário recipiente sob pressão. O recipiente apropriado pode ser equipado com meios, tais como impulsores, para agitar a mistura de biomassa e amônia aquosa. Projeto de reator é discutido em Lin, K-H. e Van Ness, H. C. (em Perry, R. H. e Chilton, C. H. (eds.), *Chemical Engineer's Handbook*, quinta edição (1973), Capítulo 4, McGraw-Hill, NY. A reação de pré-tratamento pode ser conduzida na forma de processo em bateladas ou processo contínuo.

Os técnicos no assunto sabem bem que fonte de nitrogênio é necessária para crescimento de microorganismos durante a fermentação; desta forma, o uso de amônia durante o pré-tratamento fornece fonte de nitrogênio e reduz ou elimina a necessidade de suplemento do meio de crescimento utilizado durante a fermentação com fonte de nitrogênio. Caso o pH do produto de pré-tratamento exceda aquele em que as enzimas de sacarificação são ativas ou exceda a faixa apropriada para crescimento microbiano em

fermentação, podem ser utilizados ácidos para reduzir o pH. A quantidade de ácido utilizada para atingir o pH desejado pode resultar na formação de sais em concentrações que são inibidoras para enzimas de sacarificação ou crescimento microbiano. A fim de reduzir a quantidade de ácido necessária para atingir o pH desejado e reduzir o custo da matéria prima de NH_3 no processo de pré-tratamento do presente, gás amônia pode ser evacuado do reator de pré-tratamento e reciclado.

A fim de obter quantidades suficientes de açúcares de matéria-prima integrada, a matéria-prima integrada pode ser previamente tratada com solução de amônia aquosa uma vez ou mais de uma vez. De forma similar, reação de sacarificação pode ser realizada uma ou mais vezes. Processos de pré-tratamento e sacarificação podem ser realizados uma ou mais vezes. Processos de pré-tratamento e sacarificação podem ser repetidos se desejado, para obter rendimentos de açúcares mais altos. Para determinar o desempenho dos processos de pré-tratamento e sacarificação, separadamente ou em conjunto, o rendimento teórico de açúcares que podem ser derivados da matéria-prima integrada inicial pode ser determinado e comparado com rendimentos medidos.

Após o pré-tratamento, o produto compreende mistura de amônia, matéria-prima integrada parcialmente degradado e açúcares fermentáveis. Antes de processamento adicional, amônia pode ser removida da matéria-prima integrada previamente tratado por meio de aplicação de vácuo. A remoção de amônia reduz o pH e, desta forma, menos ácido neutralizante é utilizado para obter o pH desejado para sacarificação e fermentação. Isso resulta em carga de sal mais baixa na mistura de pré-tratamento. Tipicamente, permanece alguma amônia, que é desejada para fornecer fonte de nitrogênio para fermentação.

Em realização preferida, toda a mistura de pré-tratamento que

compreende frações solúveis e insolúveis é utilizada em reação de sacarificação. Em outra realização, antes de sacarificação, a fração aquosa que compreende amônia e açúcares solubilizados pode ser separada de particulados insolúveis que permanecem na mistura. Os métodos de separação das frações solúveis das insolúveis incluem, mas sem limitar-se a decantação e filtração. Os particulados insolúveis podem ser reciclados para o reator de pré-tratamento. Os particulados insolúveis podem ser opcionalmente lavados com solvente aquoso (tal como água) para remover açúcares adsorvidos antes da reciclagem para o reator de pré-tratamento. A fração insolúvel pode ser submetida em seguida a tratamento adicional com solução de amônia aquosa conforme descrito acima para pré-tratamento, seguido por sacarificação com uma associação de enzimas de sacarificação. A fração solúvel pode também ser concentrada antes da sacarificação utilizando processo apropriado, tal como evaporação.

SEGUNDA MATÉRIA-PRIMA INTEGRADA – COMBINAÇÃO APÓS

15

PRÉ-TRATAMENTO:

Em outro aspecto do método do presente, fluxo de alimentação alternativo, tal como fluxo de processamento de sementes, é combinado com biomassa previamente tratada para fornecer segunda matéria-prima integrada que é sacarificada. A biomassa previamente tratada é um material que tenha sido previamente tratado conforme descrito no presente, substituindo biomassa por matéria-prima integrada ou fluxo de alimentação alternativo, tal como mencionado acima, fluxo de processamento de sementes é combinado com matéria-prima integrada previamente tratada para fornecer uma segunda matéria-prima integrada que é sacarificada.

25

Para o fluxo de alimentação alternativo que é fluxo de processamento de sementes, o fluxo de processamento de sementes que pode ser combinado com material previamente tratado inclui material que possui geralmente baixo teor de fibras, tal como o fluxo de destilação descrito acima no

presente ou líquido de infusão de milho. É particularmente útil fluxo de processamento de sementes que forneça característica ou componente que seja benéfico para a sacarificação e/ou produto de açúcar de fermentação. Benefício que pode ser fornecido por fluxo de processamento de sementes é o ajuste do pH do material previamente tratado. Fluxo de processamento de sementes que é ácido é de uso específico quando o processo de pré-tratamento for conduzido sob pH alcalino. É geralmente útil reduzir o pH antes da sacarificação, para coincidir com o pH ideal da associação de enzimas de sacarificação. A destilação de moagem seca e fermentação de etanol descrita acima, por exemplo, possui tipicamente pH de cerca de 3 e 5. A adição de destilação a material previamente tratado reduzirá o pH do processo de sacarificação.

Neste método, em que fluxo de alimentação alternativo é integrado a biomassa previamente tratada (a biomassa pode ou não ser biomassa integrada previamente tratada), o método de pré-tratamento não é limitador. A biomassa previamente tratada pode haver passado por outros métodos convencionais de pré-tratamento, tais como hidrólise ácida ou outros métodos de pré-tratamento conhecidos na técnica (vide, por exemplo, a Patente Norte-Americana nº 5.916.780).

Em um aspecto deste método, o fluxo de alimentação alternativo é composto de resíduo de destilação. O resíduo de destilação tipicamente contém aminoácidos e outros nutrientes da fermentação de levedura que é benéfica em produto de açúcar de fermentação. Desta forma, o produto de açúcar de fermentação resultante da sacarificação de matéria-prima integrada pode conter açúcares fermentáveis, bem como outros nutrientes derivados de fluxo de processamento de sementes. A presença dos nutrientes pode resultar em necessidade reduzida para nutrientes adicionais no produto de sacarificação antes do seu uso em fermentações de biocatalisadores.

SACARIFICAÇÃO:

No método do presente, as matérias-primas a seguir podem ser sacarificadas: 1) matéria-prima integrada e previamente tratada; 2) matéria-prima integrada e previamente tratada que é combinada após o pré-tratamento com pelo menos um fluxo de alimentação alternativo para formar uma segunda matéria-prima integrada que é sacarificada; ou 3) biomassa não integrada previamente tratada que é combinada com pelo menos um fluxo de alimentação alternativo após o pré-tratamento para formar uma segunda matéria-prima integrada. No presente método, uma ou mais das matérias-primas integradas descritas acima, com numeração 1-3, é hidrolisada na presença da associação de enzimas de sacarificação para liberar oligossacarídeos e/ou monossacarídeos em hidrolisado. A sacarificação no método do presente é de matéria-prima integrada, caso a integração ocorra antes do pré-tratamento, após o pré-tratamento ou ambos. Enzimas de sacarificação e métodos de tratamento de biomassa são analisados em Lynd, L. R. et al (*Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (2002) 66: 506-577).

Em aspecto do método do presente, antes da sacarificação, a fração aquosa que compreende amônia e açúcares solubilizados pode ser separada de particulados insolúveis restantes na mistura. Métodos de separação das frações solúveis das insolúveis incluem, mas sem limitar-se a decantação e filtragem. Os particulados insolúveis podem ser reciclados para reator de pré-tratamento. Os particulados insolúveis podem ser opcionalmente lavados com solvente aquoso (tal como água) para remover açúcares adsorvidos antes da reciclagem para o reator de pré-tratamento. A fração insolúvel pode ser submetida em seguida a tratamento adicional com solução de amônia aquosa conforme descrito acima para pré-tratamento, seguido por sacarificação com uma associação de enzimas de sacarificação. A fração solúvel pode também ser concentrada antes da sacarificação utilizando

processo apropriado, tal como evaporação.

Antes da sacarificação, o produto de pré -tratamento pode ser tratado para alterar o pH, composição ou temperatura de tal forma que as enzimas da associação de enzimas de sacarificação sejam ativas. O pH pode ser alterado por meio da adição de fluxo de alimentação alternativo, conforme descrito no presente acima ou de ácidos em forma sólida ou líquida. Alternativamente, dióxido de carbono (CO₂), que pode ser recuperado da fermentação, pode ser utilizado para reduzir o pH. CO₂, por exemplo, pode ser recolhido de fermentador e alimentado, tal como por meio de borbulhamento, para o produto de pré-tratamento, monitorando ao mesmo tempo o pH, até atingir-se o pH desejado. A temperatura pode ser trazida para temperatura que seja compatível com a atividade de enzimas de sacarificação, conforme indicado abaixo. Quaisquer co-fatores necessários para a atividade de enzimas utilizadas em sacarificação podem ser adicionados.

A associação de enzimas de sacarificação compreende uma ou mais enzimas selecionadas principal, mas não exclusivamente, a partir do grupo "glicosidases" que hidrolisam as ligações éter de di-, oligo- e polissacarídeos e são encontradas na classificação de enzimas EC 3.2.1.x (*Enzyme Nomenclature* 1992, Academic Press, San Diego, CA com Suplemento 1 (1993), Suplemento 2 (1994), Suplemento 3 (1995), Suplemento 4 (1997) e Suplemento 5 (em *Eur. J. Biochem.* (1994) 223: 1-5, *Eur. J. Biochem.* (1995) 232: 1-6, *Eur. J. Biochem.* (1996) 237: 1-5, *Eur. J. Biochem.* (1997) 250: 1-6 e *Eur. J. Biochem.* (1999) 264: 610-650, respectivamente)) do grupo geral "hidrolases" (EC 3). Glicosidases úteis no método do presente podem ser categorizadas pelas matérias-primas integradas que elas hidrolisam. As glicosidases úteis para o método do presente incluem glicosidases hidrolisantes de celulose (tais como celulases, endoglucanases, exoglucanases, celobiohidrolases, β -glicosidases), glicosidases hidrolisantes

de hemicelulose (tais como xilanases, endoxilanases, exoxilanases, β -xilosidases, arabinoxilanases, manases, galactases, pectinases, glucuronidases) e glicosidases hidrolisantes de amido (tais como amilases, α -amilases, β -amilases, glucoamilases, α -glucosidases, isoamilases). Além disso, pode ser útil adicionar outros aditivos à associação de enzimas de 5 sacarificação tais como peptidases (EC 3.4.x.y), lipases (EC 3.1.1.x e 3.1.4.x), ligninases (EC 1.11.1.x) e feruloil esterases (EC 3.1.1.73) para ajudar a liberar polissacarídeos de outros componentes das matérias-primas integradas. Sabe-se bem na técnica que microorganismos que produzem enzimas hidrolisantes 10 de polissacarídeos exibem freqüentemente atividade, tal como degradação de celulose, que é catalisada por várias enzimas ou grupo de enzimas que possuem diferentes especificidades de substrato. Desta forma, “celulase” de microorganismo pode compreender grupo de enzimas, todas as quais podem contribuir com a atividade degradante de celulose. Preparações de enzimas 15 comerciais ou não comerciais, tais como celulase, podem compreender numerosas enzimas, dependendo do esquema de purificação utilizado para obter a enzima. Desta forma, a associação de enzimas de sacarificação de acordo com o método do presente pode compreender atividade enzimática, tal como “celulase”, mas reconhece-se que esta atividade pode ser catalisada por 20 mais de uma enzima.

Enzimas de sacarificação podem ser obtidas comercialmente, tais como celulase Spezyme[®] CP (Genencor International, Rochester, NY) e xilanase Multifect[®] (Genencor). Além disso, enzimas de sacarificação podem ser produzidas biologicamente, incluindo utilizando microorganismos 25 recombinantes.

Os técnicos no assunto saberiam como determinar a quantidade eficaz de enzimas para uso no consórcio e ajustar condições para atividade enzimática ideal. Os técnicos no assunto também saberiam como otimizar as

classes de atividades enzimáticas necessárias no consórcio para obter sacarificação ideal de um dado produto de pré-tratamento sob as condições selecionadas.

Conforme indicado acima, fluxos de alimentação alternativos, tais como alto teor de fibra e outros fluxos de processamento de sementes que podem ser utilizados para formar matérias-primas integradas, podem incluir componente de amido. Este amido pode ser decomposto em açúcares fermentáveis utilizando as glicosidases hidrolisantes de amido (tais como amilases, β -amilases, α -amilases, glucoamilases, β -glucosidases, isoamilases). Desta forma, quando fluxo de alimentação alternativo que inclui amido é incorporado antes ou depois do pré-tratamento, é particularmente apropriado incluir enzimas hidrolisantes de amido durante a sacarificação no processo do presente para aumentar a produção de açúcar fermentável.

Os fluxos de alimentação alternativos que podem ser utilizados para formar matérias-primas integradas nos métodos do presente podem incluir componente de proteína. A proteína pode ser decomposta utilizando peptidases. Desta forma, quando fluxo de processamento de grãos que inclui proteína for incorporado antes ou depois do pré-tratamento, pode ser apropriado incluir enzimas hidrolisantes de proteínas durante a sacarificação no processo do presente para melhorar o produto de açúcar fermentável com aminoácidos.

Preferencialmente, a reação de sacarificação é realizada à temperatura e pH ideais para as enzimas de sacarificação ou perto deles. A temperatura ideal utilizada com a associação de enzimas de sacarificação no método do presente varia de cerca de 15 °C a cerca de 100 °C. Em outra realização, a temperatura ideal varia de cerca de 20 °C a cerca de 80 °C. O pH ideal pode variar de cerca de 2 a cerca de 11. Em outra realização, o pH ideal utilizado com a associação de enzimas de sacarificação no método do presente

varia de cerca de quatro a cerca de dez.

A sacarificação pode ser realizada em tempo de cerca de vários minutos a cerca de 120 horas e, preferencialmente, cerca de vários minutos a cerca de 48 horas. O tempo de reação dependerá da concentração e atividade específica de enzimas, bem como o substrato utilizado e as condições ambientais, tais como temperatura e pH. Os técnicos no assunto podem determinar facilmente condições ideais de temperatura, pH e tempo a serem utilizadas com substrato específico e associação de enzimas de sacarificação.

A sacarificação pode ser realizada em bateladas ou na forma de processo contínuo. A sacarificação pode também ser realizada em uma etapa ou em uma série de etapas. Enzimas diferentes necessárias para sacarificação podem exibir, por exemplo, pH ou temperatura ideal diferente. Tratamento primário pode ser realizado com enzima(s) em uma temperatura e pH, seguido por tratamentos secundários ou terciários (ou mais) com enzima(s) diferentes em temperaturas e/ou pH diferentes. Além disso, tratamento com enzimas diferentes em etapas seqüenciais pode ser realizado ao mesmo pH e/ou temperatura, tal como utilizando hemicelulases seguidas por celulases.

O grau de solubilização de açúcares a partir das matérias-primas integradas ou as segundas matérias-primas integradas após a sacarificação pode ser monitorado medindo-se a liberação de monossacarídeos e oligossacarídeos. Métodos de medição de monossacarídeos e oligossacarídeos são bem conhecidos na técnica. A concentração de açúcares redutores pode ser determinada, por exemplo, utilizando o teste de ácido 1,3-dinitrossalicílico (DNS) (Miller, G. L., *Anal. Chem.* (1959) 31: 426-428). Alternativamente, açúcares podem ser medidos por meio de HPLC utilizando coluna apropriada conforme descrito no presente no capítulo Métodos Gerais.

Açúcares fermentáveis liberados das matérias-primas integradas ou as segundas matérias-primas integradas podem ser utilizados

por microorganismos apropriados para a produção de substâncias alvo. Após a sacarificação, mas antes da fermentação, a mistura de sacarificação pode ser concentrada por meio de evaporação, por exemplo, para aumentar a concentração de açúcares fermentáveis. Opcionalmente, líquido no produto de sacarificação pode ser separado de sólidos em método contínuo ou por bateladas. Opcionalmente, o líquido ou o produto de sacarificação completo pode ser esterilizado antes da fermentação. Dependendo do(s) microorganismo(s) utilizado(s) durante a fermentação e do pH utilizado durante a sacarificação, o pH pode ser ajustado ao apropriado para fermentação. Além disso, a mistura de sacarificação pode ser suplementada com nutrientes adicionais necessários para o crescimento microbiano. Suplementos podem incluir, por exemplo, extrato de levedura, aminoácidos específicos, fosfato, fontes de nitrogênio, sais e traços de elementos. Podem também ser incluídos componentes necessários para a fabricação de produto específico elaborado por biocatalisador específico, tal como antibiótico para manter plasmídeo ou co-fator necessário em reação catalisada por enzimas. Além disso, açúcares adicionais podem ser incluídos para aumentar a concentração total de açúcar. A mistura de sacarificação pode ser utilizada como componente de caldo de fermentação, por exemplo, compondo cerca de 90% a cerca de 10% do meio final.

Temperatura e/ou gás no espaço superior podem também ser ajustados, dependendo de condições úteis para o(s) microorganismo(s) de fermentação. A fermentação pode ser aeróbica ou anaeróbica. A fermentação pode ocorrer após a sacarificação, ou pode ocorrer simultaneamente com a sacarificação por meio de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). SSF pode manter baixos os níveis de açúcar produzidos por meio de sacarificação, de forma a reduzir a potencial inibição de produto das enzimas de sacarificação, reduzir a disponibilidade de açúcar para microorganismos

contaminantes e aumento da conversão de biomassa previamente tratada em monossacarídeos e/ou oligossacarídeos.

Substâncias alvo que podem ser produzidas por meio de fermentação incluem, por exemplo, ácidos, álcoois, alcanos, alquenos, aromáticos, aldeídos, cetonas, biopolímeros, proteínas, peptídeos, aminoácidos, vitaminas, antibióticos e produtos farmacêuticos. Álcoois incluem, mas sem limitar-se a metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, etileno glicol, propanodiol, butanodiol, glicerol, eritritol, xilitol e sorbitol. Os ácidos incluem ácido acético, ácido láctico, ácido propiônico, ácido 3-hidroxi propiônico, ácido butírico, ácido glucônico, ácido itacônico, ácido cítrico, ácido succínico e ácido levulínico. Os aminoácidos incluem ácido glutâmico, ácido aspártico, metionina, lisina, glicina, arginina, treonina, fenilalanina e tirosina. Substâncias alvo adicionais incluem metano, etileno, acetona e enzimas industriais.

A fermentação de açúcares em substâncias alvo pode ser conduzida por um ou mais biocatalisadores apropriados em fermentações de etapa única ou múltiplas. Biocatalisadores podem ser microorganismos selecionados a partir de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Biocatalisadores podem ser microorganismos do tipo selvagem ou microorganismos recombinantes e incluem *Escherichia*, *Zymomonas*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Clostridium*. Em outra realização, biocatalisadores podem ser selecionados a partir do grupo que consiste de *Escherichia coli* recombinante, *Zymomonas mobilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis*.

Muitos biocatalisadores utilizados em fermentação para produzir substâncias alvo foram descritos e outros podem ser descobertos, produzidos por meio de mutação ou elaborados por meios recombinantes. Qualquer biocatalisador que utilize açúcares fermentáveis produzidos no método do

presente pode ser utilizado para elaborar a(s) substância(s) alvo cuja produção seja conhecida, por meio de fermentação no método do presente.

A fermentação de carboidratos em acetona, butanol e etanol (fermentação ABE) por *Clostridia* solventogênico é bem conhecida (Jones e Woods (1986), *Microbiol. Rev.* 50: 484-524). Processo de fermentação para a produção de altos níveis de butanol, que também produz acetona e etanol, utilizando linhagem mutante de *Clostridium acetobutylicum*, é descrito em US 5.192.673. O uso de linhagem mutante de *Clostridium beijerinckii* para produzir altos níveis de butanol, que também produz acetona e etanol, é descrito em US 6.358.717. Linhagens geneticamente modificadas de *E. coli* também vêm sendo utilizadas como biocatalisadores para a produção de etanol (Underwood et al (2002), *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6263-6272). Linhagem geneticamente modificada de *Zymomonas mobilis* que possui produção aprimorada de etanol é descrita em US 2003/0162271 A1.

Ácido láctico foi produzido em fermentações por linhagens recombinantes de *E. coli* (Zhou et al (2003), *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 399-407), linhagens naturais de *Bacillus* (US 20050250192) e *Rhizopus oryzae* (Tay e Yang (2002), *Biotechnol. Bioeng.* 80: 1-12). Linhagens recombinantes de *E. coli* vêm sendo utilizadas como biocatalisadores em fermentação para produzir 1,3-propanodiol (US 6.013.494, US 6.514.733) e ácido adípico (Niu et al (2002), *Biotechnol. Prog.* 18: 201-211). Ácido acético foi fabricado por meio de fermentação utilizando *Clostridia* recombinante (Cheryan et al (1997), *Adv. Appl. Microbiol.* 43: 1-33) e linhagens de levedura recém identificadas (Freer (2002), *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 271-275). A produção de ácido succínico por *E. coli* recombinante e outras bactérias é descrita em US 6.159.738 e por *E. coli* recombinante mutante em Lin et al (2005), *Metab. Eng.* 7: 116-127). Ácido pirúvico foi produzido por levedura *Torulopsis glabrata* mutante (Li et al (2001), *Appl. Microbiol. Technol.* 55: 680-685) e por *E. coli* mutante (Yokota et al (1994), *Biosci.*

Biotech. Biochem. 58: 2164-2167). Linhagens recombinantes de *E. coli* vêm sendo utilizadas como biocatalisadores para a produção de ácido para-hidroxicinâmico (US 20030170834) e ácido quínico (US 20060003429).

Mutante de *Propionibacterium acidipropionici* vem sendo utilizado em fermentação para produzir ácido propiônico (Suwannakham e Yang (2005), *Biotechnol. Bioeng.* 91: 325-337) e ácido butírico foi elaborado por *Clostridium tyrobutyricum* (Wu e Yang (2003), *Biotechnol. Bioeng.* 82: 93-102). Propionato e propanol foram elaborados por meio de fermentação a partir de treonina por *Clostridium sp.* linhagem 17cr1 (Janssen (2004), *Arch. Microbiol.* 182: 482-486). *Aureobasidium pullulans* similar a levedura foi utilizado para elaborar ácido glucônico (Anantassiadis et al (2005), *Biotechnol. Bioeng.* 91: 494-501) por mutante de *Aspergillus niger* (Singh et al (2001), *Indian J. Exp. Biol.* 39: 1136-43). Ácido 5-ceto-D-glucônico foi elaborado por mutante de *Gluconobacter oxydans* (Elfari et al (2005), *Appl. Microbiol. Biotech.* 66: 668-674), ácido itacônico foi produzido por mutantes de *Aspergillus terreus* (Reddy e Singh (2002), *Bioresour. Technol.* 85: 69-71), ácido cítrico foi produzido por linhagem mutante de *Aspergillus niger* (Ikram-UI-Haq et al (2005), *Bioresour. Technol.* 96: 645-648) e xilitol foi produzido por *Candida guilliermondii* FTI 20037 (Mussatto e Roberto (2003), *J. Appl. Microbiol.* 95: 331-337). Biopoliésteres que contêm 4-hidroxivalerato, também contendo quantidades significativas de ácido 3-hidroxibutírico e ácido 3-hidroxivalérico, foram produzidos por *Pseudomonas putida* e *Ralstonia eutropha* recombinantes (Gorenflo et al (2001), *Biomacromolecules* 2: 45-57). L-2,3-butanodiol foi elaborado por *E. coli* recombinante (Ui et al (2004), *Lett. Appl. Microbiol.* 39: 533-537).

A produção de aminoácidos por meio de fermentação foi realizada utilizando linhagens auxotróficas e linhagens resistentes a análogos de aminoácidos de *Corynebacterium*, *Brevibacterium* e *Serratia*. A produção de histidina utilizando linhagem resistente a análogo de histidina, por exemplo, é descrita na Patente

Japonesa Publicada nº 8596/81 e utilizando linhagem recombinante é descrita em EP 136.359. A produção de triptofano utilizando linhagem resistente a análogo de triptofano é descrita nas Patentes Japonesas Publicadas nº 4505/72 e 1937/76. A produção de isoleucina utilizando linhagem resistente a análogo de isoleucina é descrita nas Patentes Japonesas Publicadas nº 38995/72, 6237/76 e 32070/79. A produção de fenilalanina utilizando linhagem resistente a análogo de fenilalanina é descrita na Patente Japonesa Publicada nº 10035/81. A produção de tirosina utilizando linhagem que requer fenilalanina para crescimento, resistente a tirosina (*Agr. Chem. Soc. Japan* 50 (1) R79-R87 (1976) ou linhagem recombinante (EP 263515, EP 332234) e a produção de arginina utilizando linhagem resistente a análogo de L-arginina (*Agr. Biol. Chem.* (1972) 36: 1675-1684, Patentes Japonesas Publicadas nº 37235/79 e 150381/82) foram descritas. Fenilalanina também foi produzida por meio de fermentação em *Escherichia coli* linhagens ATCC 31882, 31883 e 31884. A produção de ácido glutâmico em bactéria corineforme recombinante é descrita em US 6.962.805. A produção de treonina por linhagem mutante de *E. coli* é descrita em Okamoto e Ikeda (2000), *J. Biosci. Bioeng.* 89: 87-79. Metionina foi produzida por linhagem mutante de *Corynebacterium lilium* (Kumar et al (2005), *Bioresour. Technol.* 96: 287-294).

Peptídeos, enzimas e outras proteínas úteis também foram elaborados por biocatalisadores (por exemplo, em US 6.861.237, US 6.777.207, US 6.228.630).

O pré-tratamento e sacarificação de biomassa em açúcares fermentáveis, seguido por fermentação dos açúcares em substância alvo, é exemplificado em CL2825 (Exemplo 9), que é incorporado ao presente como referência, para a produção de etanol a partir de espigas de milho previamente tratadas utilizando *Z. mobilis* como biocatalisador para a fermentação de açúcares em etanol. O método de acordo com a presente invenção pode também ser utilizado para a produção de 1,3-propanodiol a partir de biomassa. A biomassa sofre pré-tratamento e sacarificação de acordo com a presente

invenção; após (ou durante) a sacarificação, *E. coli* é utilizado para produzir 1,3-propanodiol conforme descrito em CL2825 (Exemplo 10).

Substâncias alvo produzidas em fermentação por biocatalisadores podem ser recuperadas utilizando diversos métodos conhecidos na técnica. Os produtos podem ser separados de outros componentes de fermentação por meio de centrifugação, filtração, microfiltração e nanofiltração. Os produtos podem ser extraídos por meio de troca de íons, extração com solvente ou eletrodialise. Agentes floculantes podem ser utilizados para auxiliar na separação de produtos. Como exemplo específico, 1-butanol bioproduzido pode ser isolado do meio de fermentação utilizando métodos conhecidos na técnica para fermentações de ABE (vide, por exemplo, Durre, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 639-648 (1998), Groot et al, *Process. Biochem.* 27: 61-75 (1992) e suas referências). Sólidos, por exemplo, podem ser removidos do meio de fermentação por meio de centrifugação, filtração, decantação ou similares. Em seguida, o 1-butanol pode ser isolado do meio de fermentação utilizando métodos tais como destilação, destilação azeotrópica, extração de líquidos em líquidos, adsorção, extração de gás, evaporação de membrana ou pervaporação. A purificação de 1,3-propanodiol a partir de meios de fermentação pode ser realizada, por exemplo, submetendo-se a mistura de reação a extração com solvente orgânico, destilação e cromatografia de coluna (US 5.356.812). Solvente orgânico particularmente bom para este processo é cicloexano (US 5.008.473). Aminoácidos podem ser recolhidos do meio de fermentação por meio de métodos tais como adsorção de resina de troca de íons e/ou cristalização.

25

EXEMPLOS

MÉTODOS GERAIS E MATERIAIS:

São utilizadas as abreviações a seguir:

"HPLC" é Cromatografia de Líquidos de Alta Eficiência, "C" é

centígrado, "kPa" é quiloPascal, "m" é metro, "mm" é milímetro, "kW" é quilowatt, " μm " é micrômetro, " μl " é microlitro, "ml" é mililitro, "l" é litro, "min" é minuto, "mM" é milimolar, "cm" é centímetro, "g" é grama, "kg" é quilograma, "wt" é peso, "h" é hora, "temp." ou "T" é temperatura, "teór." é teórico, "pretreat" é pré-tratamento, "DWB" é peso seco de biomassa.

Ácido sulfúrico, hidróxido de amônio, ácido acético, acetamida, extrato de levedura, ácido 2-morfolinoetanossulfônico (MES), fosfato de potássio, glicose, xilose, triptona, cloreto de sódio e ácido cítrico foram obtidos por meio da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

10 **REATOR DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E PRÉ-TRATAMENTO (PEHR):**

Aparelho de tratamento de biomassa com dimensões e características exibidas na Figura 2 e descritas no presente acima é denominado Reator PEHR e foi utilizado nos Exemplos a seguir. Resumidamente, reator PEHR de nove litros (construído na NREL, Golden, CO, descrito em detalhes no pedido copendente nº CL3447) possui recipiente de reação de aço inoxidável de cerca de 15 cm x 51 cm com lança de injeção para introdução de reagentes de processamento. A lança de injeção é conectada utilizando junta giratória para porta em tampa sobre uma extremidade do recipiente, que possui porta adicional para acesso ao recipiente. Quatro pás correm no comprimento da parede de recipiente e são fixadas perpendicularmente à parede. As pás e 22 cilindros de meios de atrito cerâmicos de 3,2 cm x 3,2 cm (Advanced Ceramics, East Palestine, OH), em livre flutuação no recipiente, aplicam mistura mecânica de biomassa e reagente à medida que o recipiente gira, promovendo assimilação de reagente na biomassa. O reator PEHR é colocado sobre Aparelho de Rolo de Produção Celular Bellco (Bellco Technology, Vineland, NJ), que fornece mecanismo de rotação e o reator com aparelho de rolo é abrigado em câmara com temperatura controlada que fornece calor. A

câmara com temperatura controlada consiste de quadro de alumínio para sustentar almofadas isolantes de cortiça em volta do Aparelho de Produção Celular Bellco, ao qual é ligado aquecedor que é controlado por termopares inseridos através do centro da lança de injeção. Pode-se aplicar vácuo e
5 pressão ao recipiente de reação fixando-se fontes externas à porta conectada a lança na tampa.

MÉTODOS ANALÍTICOS:

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

Açúcares solúveis (glicose, celobiose, xilose, galactose, arabinose
10 e manose) em líquido de sacarificação foram medidos por meio de HPLC (Agilent Modelo 1100, Agilent Technologies, Palo Alto CA) utilizando colunas Bio-Rad HPX-87P e Bio-Rad HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA) com colunas de guarda apropriadas. O pH da amostra foi medido e ajustado em 5-6 com ácido sulfúrico, se necessário. A amostra foi passada em seguida
15 através de filtro de seringa de 0,2 µm diretamente para ampola de HPLC. As condições de condução de HPLC foram as seguintes:

HPX-87P (PARA CARBOIDRATOS):

- Volume de injeção: 10 a 50 µl, dependendo da concentração e dos limites do detector.
- 20 - Fase móvel: HPLC grau água, 0,2 µm filtrado e com gases retirados.
- Velocidade de fluxo: 0,6 ml/minuto.
- Temperatura da coluna: 80-85 °C, temperatura da coluna de guarda < 60 °C.
- 25 - Temperatura do detector: o mais perto possível da temperatura da coluna principal.
- Detector: índice de refração.
- Tempo de condução: 35 minutos de coleta de dados mais quinze

minutos após a condução (com possível ajuste para compostos eluentes posteriores).

Biorad Aminex HPX-87H (para carboidratos):

5 Volume de injeção: 5 a 10 µl, dependendo da concentração e dos limites do detector.

Fase móvel: 0,01 N ácido sulfúrico, 0,2 µm filtrado e seus gases retirados.

Velocidade de fluxo: 0,6 ml/minuto.

Temperatura da coluna: 55 °C.

10 Temperatura do detector: o mais perto possível da temperatura da coluna.

Detector: índice de refração.

Tempo de condução: 25 a 75 minutos de coleta de dados.

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

EXEMPLO 1

PRÉ-TRATAMENTO E SACARIFICAÇÃO DE BIOMASSA COMBINADA QUE CONTÉM ESPIGAS DE MILHO E DIFERENTES AMOSTRAS DE GRÃOS EXAURIDOS EM REATOR

PEHR

20 AMOSTRAS DE GRÃOS EXAURIDOS FORAM PREPARADAS A PARTIR DE:

1. Grãos de milho-dente inteiros amarelos nº 2 (adquiridos da Agway).

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

3. Processamento de grãos de milho por meio do processo Quick Fiber para remover o gérmen e a fibra da casca (US 6.254.914). O material de

partida foi obtido por meio da Vijay Singh da Universidade de Illinois.

4. Farinha de cerveja foi obtida por meio da Cargill (Mineápolis, MN).

Grãos exauridos designam sólidos residuais do processamento de grãos nos quais amido é convertido em açúcar. Grãos exauridos foram produzidos essencialmente por meio de processo de uísque básico. Os materiais de partida diferentes foram tratados com enzimas degradantes de amido para produzir açúcares e a massa resultante foi filtrada para recuperar os sólidos de aglomerado de filtração ou grãos exauridos.

Os materiais de partida foram moídos em moinho de amostra Foss (sede norte-americana: Eden Prairie, MN) Cyclotec 1093 (materiais de partida 1 e 2 acima) até 250 μm ou em misturador (materiais de partida 3 e 4 acima) e combinados em seguida com água e 200 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em recipiente de reação de vidro agitado encamisado de dois litros. O pH da mistura foi ajustado em 6,5 com 1 N NaOH e adicionou-se a metade da α -amilase total (Spezyme HPA, Genencor International, Palo Alto, CA). O recipiente de reação foi aquecido em seguida a 95 °C e a α -amilase restante foi adicionada vinte minutos depois. Após permanecer a 95 °C pelo tempo especificado, o recipiente foi resfriado a 70 °C e o pH da mistura foi ajustado em 4,5 com 1 M HCl. Adicionou-se glucoamilase (Gzyme 480, Genencor) e a temperatura foi rebaixada adicionalmente a 50 °C e mantida por uma noite. Nesse momento, o reator foi resfriado a < 40 °C e o conteúdo foi filtrado através de pano de filtro Dacron com tamanho de poro de 10 μm . O aglomerado de filtração foi lavado com água e o aglomerado de filtração final, ou grãos exauridos, foi seco a 105 °C por uma noite e armazenado à temperatura ambiente até o uso em experimentos de pré-tratamento. Condições de reação específicas para cada material de partida são relacionadas na Tabela 1 abaixo.

TABELA 1**PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE GRÃOS EXAURIDOS**

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

Espigas de milho inteiras foram processadas com moedor de mordente (motor de 2,2 kW) com espaçamento de mordente de cerca de 0,95 cm, seguido por fragmentador (motor de 1,5 kW, Franklin Miller Inc., Livingston, NJ), seguido por peneiramento com peneira Sweco equipada com peneira padrão norte-americana de 1,9 cm. Espigas fraturadas foram carregadas com um tipo de grão exaurido, conforme relacionado na Tabela 3, em reator PEHR. Os grãos exauridos foram de cerca de 10% do peso seco total de biomassa no reator. A carga total de biomassa seca foi de cerca de 473 g. Cada reator carregado foi previamente aquecido no incubador de rolo a 95 °C, sem rotação, antes do início do experimento. Aplicou-se vácuo (pressão medida de cerca de 85 kPa) ao recipiente de reação e o recipiente foi vedado. Quando a temperatura em cada recipiente de reação reestabilizou-se a 95 °C, iniciou-se a rotação a 19 rpm. Adicionou-se solução diluída de hidróxido de amônio para gerar concentração de amônia de 4 g de amônia/100 g de peso seco de biomassa e concentração de sólidos de 30 g de peso seco de biomassa/100 g de peso total de mistura de biomassa. Após a injeção, o vácuo sobre o recipiente foi liberado à pressão atmosférica. O reator foi

mantido a 95 °C por trinta minutos e a temperatura foi reduzida em seguida para 85 °C, onde foi mantida por quatro horas sem rotação. Ao final daquele período, aplicou-se vácuo (pressão medida de cerca de 85 kPa) ao recipiente de reação por trinta minutos para remover amônia e reduzir a temperatura do conteúdo de cada reator para cerca de 50 °C. Dióxido de carbono foi injetado em seguida em cada reator para liberar o vácuo e os reatores foram pressurizados até pressão medida com CO₂ de 138 kPa e girado sob pressão por trinta minutos a 50 °C.

Em seguida, o reator foi despressurizado, aberto e o pH do conteúdo foi ajustado em cerca de 5,5 por meio de injeção de 75 ml de 1 M tampão ácido cítrico, pH 4,8, no qual adicionou-se e dissolveu-se monidrato de ácido cítrico. O tampão de ácido cítrico foi injetado em cada reator após aquecimento a 50 °C e, em seguida, permitiu-se o equilíbrio por meio de incubação dos reatores a 50 °C e 19 rpm por uma hora. Os reatores foram removidos do incubador, abertos e o pH de amostra foi determinado. Caso o pH fosse de mais de 5,5, agregava-se monidrato de ácido cítrico sólido adicional e os reatores foram incubados com rotação a 50 °C por uma hora adicional. Este processo foi repetido com a frequência necessária para obter pH de cerca de ~5,5 para cada reator. Ao atingir-se o pH desejado, 28,4 mg/g de celulose Spezyme[®] CP (Genencor) e 10,1 mg de proteína ativa por grama de coquetel Diversa D2 que contém β -glucosidase, xilanase, β -xilosidase e arabinofuranosidase foram carregados no reator. Os reatores permaneceram no incubador a 50 °C e 19 rpm por 72 horas. Após esse pré-tratamento e sacarificação, os rendimentos de açúcar foram testados conforme descrito nos Métodos Gerais. Os rendimentos de glicose e xilose, com base no total de glucano e xilano que vêm com as duas alimentações, são exibidos na Tabela 2. Os rendimentos das amostras de biomassa de combinação de espiga mais grãos exauridos foram similares a rendimentos da amostra de espiga isolada.

TABELA 2

**RENDIMENTOS DE AÇÚCAR APÓS O PRÉ-TRATAMENTO E SACRIFICAÇÃO DE
ALIMENTAÇÕES DE BIOMASSA COMBINADAS**

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

EXEMPLO 2

**5 PRÉ-TRATAMENTO E SACRIFICAÇÃO DE BIOMASSA COMBINADA CONTENDO ESPIGAS DE
MILHO, GRÃOS EXAURIDOS E COMPONENTES ADICIONAIS NO REATOR PEHR**

Espigas fraturadas e grãos esgotados em uísque, preparados conforme descrito no Exemplo 1, foram combinados no reator PEHR conforme descrito no Exemplo 1. Além disso, foram adicionados outros
 10 componentes de grãos. Em uma amostra, amido (Sigma S4126, lote nº 093K0033) foi adicionado a 5 g/100 g de peso seco total de biomassa. Em outra amostra, óleo de milho (óleo de milho Sysco Classic, lote nº 4119095) foi adicionado em nível de cerca de 2 g/100 g de biomassa seca total. As amostras foram tratadas previamente e sacarificadas conforme
 15 descrito no Exemplo 1. Os resultados são exibidos na Tabela 3. Estes resultados também apresentam comparação favorável com os dados de controle somente de espigas da Tabela 2.

TABELA 3

**RENDIMENTOS DE AÇÚCAR RESULTANTES DE PRÉ-TRATAMENTO E SACARIFICAÇÃO DE
ESPIGAS, GRÃOS ESGOTADOS E COMPONENTES DE GRÃOS ADICIONAIS**

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

EXEMPLO 35 **PRÉ-TRATAMENTO E SACARIFICAÇÃO DE BIOMASSA COMBINADA QUE CONTÉM****ESPIGAS DE MILHO E FIBRA DE MILHO NO REATOR PEHR**

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

10 sacarificada conforme descrito no Exemplo 1. Os rendimentos de açúcar resultantes são exibidos na Tabela 4. Os rendimentos da biomassa de combinação de espiga mais fibra de milho foram similares aos rendimentos da amostra de espiga isolada.

TABELA 4

**RENDIMENTOS DE AÇÚCAR RESULTANTES DO PRÉ-TRATAMENTO DE ESPIGAS DE
MILHO COMBINADAS COM FIBRA DE MILHO**

15

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

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE TRATAMENTO DE BIOMASSA COMPOSTA DE MATÉRIAS-PRIMAS INTEGRADAS, caracterizado pelo fato de que o mencionado método compreende:

- 5 (a) fornecimento de biomassa;
- (b) adição à biomassa de (a) de pelo menos um fluxo de alimentação alternativo para produzir uma matéria-prima integrada;
- (c) contato da matéria-prima integrada de (b) com uma solução aquosa que compreende amônia para formar uma mistura de
- 10 matéria-prima integrada e amônia aquosa, em que a amônia está presente em uma concentração pelo menos suficiente para manter pH alcalino da mistura de matéria-prima integrada e amônia aquosa, mas em que a mencionada amônia está presente em menos de cerca de 12% em peso com relação ao peso seco de matéria-prima integrada e, adicionalmente,
- 15 em que o peso seco de matéria-prima integrada encontra-se em uma alta concentração de sólidos de pelo menos cerca de 15% em peso com relação ao peso da mistura de matéria-prima integrada e amônia aquosa, para gerar um produto de matéria-prima integrada previamente tratado; e
- (d) contato do produto de (c) com uma associação de enzimas
- 20 de sacarificação sob condições apropriadas para produzir um produto de açúcar fermentável.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o pH da mistura de matéria-prima integrada e amônia aquosa é maior do que 8.

25 3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o mencionado peso seco de matéria-prima integrada encontra-se em concentração inicial de pelo menos cerca de 15% a cerca de 80%.

4. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o mencionado peso seco de matéria-prima integrada encontra-se em concentração inicial de pelo menos cerca de 15% a cerca de 60%.

5. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a mencionada amônia está presente em menos cerca de 10% em peso com relação ao peso seco de matéria-prima integrada .

6. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a mencionada amônia está presente em cerca de 6% em peso ou menos com relação ao peso seco de matéria-prima integrada .

10 7. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa (c) é conduzida sob temperatura de cerca de 4 °C a cerca de 200 °C.

15 8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a etapa (c) é conduzida sob temperatura de cerca de 75 °C a cerca de 150 °C.

9. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a etapa (c) é conduzida sob temperatura de mais de 90 °C a cerca de 150 °C.

20 10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa (c) é conduzida por um período de tempo de até cerca de oito horas.

11. MÉTODO DE TRATAMENTO DE BIOMASSA COMPOSTA DE MATÉRIAS-PRIMAS INTEGRADAS, caracterizado pelo fato de que o mencionado método compreende:

- 25
- (a) fornecimento de biomassa;
 - (b) submissão da biomassa de (a) a um processo de pré-tratamento para gerar um produto de biomassa previamente tratado;
 - (c) adição ao produto de biomassa previamente tratado de (b)

de pelo menos um fluxo de alimentação alternativo para produzir uma primeira ou segunda matéria-prima integrada; e

(d) contato da primeira ou segunda matéria-prima integrada de (c) com uma associação de enzimas de sacarificação sob condições apropriadas, para produzir um produto de açúcar fermentável.

12. MÉTODO, conforme a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o processo de pré-tratamento em (b) inclui o contato da biomassa com solução aquosa que compreende amônia para formar uma mistura de biomassa e amônia aquosa, em que a amônia está presente em uma concentração pelo menos suficiente para manter o pH alcalino da mistura de biomassa e amônia aquosa, mas em que a mencionada amônia está presente em menos de cerca de 12% em peso com relação a peso seco de biomassa e, adicionalmente, em que o peso seco de biomassa encontra-se em uma alta concentração de sólidos de pelo menos cerca de 15% em peso com relação ao peso da mistura de biomassa e amônia aquosa.

13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o pH da mistura de biomassa e amônia aquosa é maior do que 8.

14. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o mencionado peso seco de biomassa encontra-se em uma concentração inicial de pelo menos cerca de 15% a cerca de 80%.

15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o mencionado peso seco de biomassa encontra-se em uma concentração inicial de pelo menos cerca de 15% a cerca de 60%.

16. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a mencionada amônia está presente em menos de cerca de 10% em peso com relação a peso seco de biomassa.

17. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a mencionada amônia está presente em cerca de 6% em peso

ou menos com relação ao peso seco de biomassa.

18. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a etapa (b) é conduzida sob temperatura de cerca de 4 °C a cerca de 200 °C.

5 19. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a etapa (b) é conduzida sob temperatura de cerca de 75 °C a cerca de 150 °C.

20. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a etapa (b) é conduzida sob temperatura de mais de 90 °C a
10 cerca de 150 °C.

21. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a etapa (b) é conduzida por período de tempo de até cerca de oito horas.

22. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado
15 pelo fato de que a biomassa da etapa (a) é uma matéria-prima integrada .

23. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o fluxo de alimentação alternativo é composto de resíduo de destilação.

24. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1 ou 11,
20 caracterizado pelo fato de que biomassa é selecionada a partir do grupo que consiste de safras bioenergéticas, resíduos agrícolas, resíduo sólido municipal, resíduo sólido industrial, resíduos de jardim, resíduos de madeira e florestais.

25. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1 ou 11,
25 caracterizado pelo fato de que biomassa é selecionada a partir do grupo que consiste de brotos de grama, resíduos de papel, lodo de fabricação de papel, grãos de milho, espigas de milho, cascas de milho, forragem de milho, gramas, trigo, palha de trigo, feno, palha de arroz, bagaço de cana de açúcar, sorgo, soja, árvores, ramos, raízes, folhas, lascas de madeira, serragem, arbustos e

moitas, legumes, frutas, flores e esterco animal.

26. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1 ou 11, caracterizado pelo fato de que a biomassa é selecionada a partir do grupo que consiste de espigas de milho, forragem de milho, cascas de milho, bagaço de cana de açúcar, brotos de grama, palha de trigo, feno, cevada, palha de cevada, palha de arroz e gramas.

27. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a biomassa é selecionada a partir do grupo que consiste de espigas de milho, forragem de milho e bagaço de cana de açúcar.

28. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1 ou 12, caracterizado pelo fato de que a amônia é selecionada a partir do grupo que consiste de gás de amônia, hidróxido de amônio, uréia e suas combinações.

29. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1 ou 12, caracterizado pelo fato de que a mencionada solução aquosa que compreende amônia compreende adicionalmente pelo menos uma base adicional.

30. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1 ou 12, caracterizado pelo fato de que a amônia é reciclada.

31. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1 ou 11, caracterizado pelo fato de que o fluxo de alimentação alternativo é selecionado a partir do grupo que consiste de um co-produto, um fluxo em processo e um fluxo residual.

32. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o fluxo de alimentação alternativo é um fluxo de processamento de sementes de milho, aveia, trigo, cevada, arroz, canola, girassol, algodão, ervilha ou soja e outros legumes.

33. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1 ou 11, caracterizado pelo fato de que a mencionada associação de enzimas de sacarificação compreende pelo menos uma glicosidase.

34. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1 ou 11, caracterizado pelo fato de que a mencionada associação de enzimas de sacarificação compreende pelo menos uma enzima selecionada a partir do grupo que consiste de glicosidases hidrolisantes de celulose, glicosidases hidrolisantes de hemicelulose, glicosidases hidrolisantes de amido, peptidases, lipases, ligninases e feruloil esterases.

35. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1 ou 11, caracterizado pelo fato de que a mencionada associação de enzimas de sacarificação compreende pelo menos uma enzima selecionada a partir do grupo que consiste de celulasas, endoglucanases, exoglucanases, celobiohidrolases, β -glucosidases, xilanases, endoxilanases, exoxilanases, β -xilosidases, arabinoxilanases, manases, galactases, pectinases, glucuronidases, amilases, α -amilases, β -amilases, glucoamilases, α -glucosidases, isoamilases.

36. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1 ou 11, caracterizado pelo fato de que a etapa (d) é realizada sob temperatura de cerca de 15 °C a cerca de 100°C e sob pH de cerca de 2 a cerca de 11.

37. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a biomassa de (a) é composta de pelo menos um fluxo de alimentação alternativo.

38. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o mencionado resíduo de destilação é empregado para reduzir o pH do material previamente tratado, tornando-o mais propenso a sacarificação.

39. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1 ou 11, caracterizado pelo fato de que os mencionados açúcares fermentáveis são utilizados para produzir substâncias com valor agregado, combustíveis ou outros produtos com alto valor.

RESUMO**“MÉTODOS DE TRATAMENTO DE BIOMASSA COMPOSTA DE MATÉRIAS-PRIMAS INTEGRADAS”**

A presente invenção fornece um método de tratamento de
5 biomassa composta de matérias-primas integradas para produzir açúcares
fermentáveis. Um aspecto dos métodos descritos no presente inclui uma etapa
de pré-tratamento em que a biomassa é integrada com um fluxo de
alimentação alternativo e a matéria-prima integrada resultante, em
concentrações relativamente altas, é tratada com baixa concentração de
10 amônia com relação ao peso seco de biomassa. Em outro aspecto, uma alta
concentração de sólidos de biomassa previamente tratada é integrada com um
fluxo de alimentação alternativo para sacarificação.