

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	
RAD: 14-157243- -5	FECHA: 2016-03-09 09:18:32
DEP: 2020 DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES	EVE: 378 FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO I
TRA: 11 PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II	FOLIOS: 13
ACT: 519 TRASLADOINFORME	

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Abogado(a)/Señor(a)
JESÚS MARÍA MÉNDEZ BERMÚDEZ

Asunto: Radicación: 14-157243- -5
Trámite: 11
Evento: 378
Actuación: 519
Oficio: 2438
Folios: 13

Patente de Invención	X			Patente de Modelo de Utilidad	
Vía Nacional					
Vía PCT (Fase Nacional)	X	Capítulo I	X	Capítulo II	
No. Solicitud Internacional	PCT/EP2012/076419				
Fecha de Presentación Internacional	20/12/2012				

Como resultado del examen de fondo realizado, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción:	Radicado N° 14-157243-00000-0000	21/Julio/2014
Reivindicaciones:	Radicado N° 14-157243-00000-0000	21/Julio/2014
Dibujos:	Radicado N° 14-157243-00000-0000	21/Julio/2014
	Radicado N° 14-157243-00001-0000	22/Julio/2014
Prioridad:	US 61/578,281	21/Diciembre/2011
	IT TO2012A000012	11/Enero/2012
	US 61/672,956	18/Julio/2012
	US 61/736,639	13/Diciembre/2012

2. Análisis de la Prioridad

Se acepta la reivindicación de prioridad porque ésta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486) y su contenido técnico corresponde con el de la prioridad reivindicada.

3. Objeto de la invención

De acuerdo con lo establecido en el numeral 1.2.2.2 del capítulo primero del Título X de la Circular Única para efectos del examen de patentabilidad, se tendrá en cuenta la tasa pagada por la solicitante al momento de comenzar el examen para las reivindicaciones adicionales; esto es que cuando la solicitud contenga más de diez (10) reivindicaciones y no se haya pagado la tasa complementaria, sólo se estudiarán las cubiertas por la tasa pagada. En el presente caso se estudiarán las reivindicaciones 1 a 37 del capítulo reivindicatorio (Pág. 104 a 111, Radicado N°. 14-157243-00000-0000).

Título de la solicitud: “Un paso de prehidrólisis mejorado que involucra vacío” (Pág. 65, Radicado N°. 14-157243-00000-0000).

El problema planteado en esta solicitud consiste en la necesidad de incrementar la recuperación de glucosa de una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua aplicando vacío.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona un proceso que involucra la aplicación de vacío a una composición que comprende la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, durante un corto periodo de tiempo. La composición que comprende la biomasa lignocelulósica pretratada puede incluir, además, un líquido agregado, líquido libre, o carecer del líquido libre. Después de que dicha composición ha sido expuesta a una condición de vacío, se quita el vacío, se agrega un catalizador a la composición y se realiza la hidrólisis catalítica de la composición.

El objeto de la presente solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): C12P 19/02, D21C 1/10.

4. De la solicitud de patente

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

La evaluación de los criterios de claridad y concisión de las reivindicaciones presentadas permite encontrar que:

- La reivindicación 1 tiene por objeto un proceso, sin embargo muestra la secuencia de etapas técnicas de manera general, sin reivindicar sus condiciones técnicas tales como: temperatura, tiempo, presión, entre otras, las cuales definen completamente la invención. Se sugiere realizar las aclaraciones respectivas o definir la invención por sus características esenciales, teniendo en cuenta no modificar o ampliar la material ya divulgada.
- Las reivindicaciones 1, 2, 4, 7, 8, 9, 14, 16, 18, 26, 27, 29 y 37 presentan como características técnicas esenciales términos generales, tales como “condición de vacío”, “materia seca”, “un líquido agregado”, “líquido libre”, “catalizador”, “un producto de la hidrólisis”, “una enzima”, “una biomasa lignocelulósica pretratada”, “exponer”, “una composición”, “un contenido de materia seca”, “una biomasa lignocelulósica procesada”, “un proceso de pretratamiento”, “realizar una hidrólisis catalítica” y “C5” los cuales, aunque corresponden a términos ampliamente conocidos, abarcan una extensa gama de posibilidades. De tal manera, sugieren de forma imprecisa que la protección se extiende a otras posibles variaciones, por lo cual se propone realizar las modificaciones respectivas utilizando términos que describan de forma menos general, definir claramente los rangos y/o restringir los componentes reclamados a aquellos que tienen un efecto técnico demostrado.
- En la reivindicación 1 la expresión “donde el catalizador es capaz de hidrolizar la biomasa (...)” corresponde a características funcionales, las cuales aunque explican la relación que hay entre diversas características estructurales y pueden estar incluidas en las reivindicaciones, no definen la invención; de tal manera no se tiene en cuenta para el estudio de patentabilidad.

- En las reivindicaciones 1, 4, 16, 18, 27, 29, la expresión “*el por ciento en peso*” no corresponde con términos usados en el campo técnico, se sugiere realizar los cambios necesarios.
- En las reivindicaciones 1, 3, 5, 16, 17, 27 y 28, las expresiones “*al menos*”, “*mínimo*”, “*menor que*” son imprecisas, por lo cual no permiten distinguir la invención del estado de la técnica. Se sugiere sustituirlas por un término preciso o un rango concreto.
- Las reivindicaciones 3 a 6, 17 a 20 y 28 a 31 no son concisas porque reclaman un gran número de posibilidades para las condiciones del proceso, se sugiere restringir la solicitud a los rangos que hayan sido probados, es decir, que se encuentren debidamente sustentados en la descripción y en los ejemplos.
- En las reivindicaciones 3, 17 y 28, la expresión “*en donde la condición de vacío es menor que una presión absoluta medida en milibar (mbar), seleccionada del grupo...*” no es clara porque no permite saber la referencia de presión para la condición de vacío. Se sugiere revisar la descripción, página 28, líneas 12 a 14, y hacer los ajustes correspondientes.

5. Determinación del Estado de la Técnica

El estado de la técnica se determinó con base en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad: 21 de diciembre de 2011, y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	Art 1*	“The influence of solid/liquid separation techniques on the sugar yield in two-step dilute acid hydrolysis of softwood followed by enzymatic hydrolysis”	16/Marzo/2009
D2	Art 2*	“Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H ₂ SO ₄ impregnation for etanol production”	2003

El documento D1¹ divulga la investigación de la influencia de someter a presión la biomasa, junto con los efectos de no lavar el material, en el rendimiento del azúcar obtenida de una hidrólisis en dilución ácida de dos pasos, con o sin la subsecuente digestión enzimática de los sólidos (Resumen).

El documento D2² divulga un proceso de pretratamiento de madera suave, antes de la hidrólisis enzimática, con vapor por impregnación en H₂SO₄ diluido para mejorar la obtención de azúcares totales y etanol (Resumen).

6. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Nivel inventivo (Art 18 D486)

La reivindicación 1 consiste en: “*Un proceso para incrementar la recuperación de glucosa de una biomasa lignocelulósica pretratada, que comprende los pasos de...*” (Pág. 104, Radicado N°. 14-157243-00000-0000).

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:

Características esenciales	D1	D2
Un proceso para incrementar la recuperación de glucosa de una biomasa lignocelulósica pretratada, que comprende los pasos de	Se considera una hidrólisis en dilución ácida de madera blanda, bien sea como un proceso independiente o como pretratamiento antes de la hidrólisis	Antes de la hidrólisis enzimática de la madera suave, se necesita un pretratamiento. En el estudio se hace un pretratamiento con vapor en dos etapas, por impregnación

1 *Monavari, Sanam et al. Biotechnology for Biofuels 2009, 2, 6.
<http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-2-6>

2 *Söderström Johanna et al. Biomass and Bioenergy, 2003, 24, 6, 475-486.

	enzimática, que resulta en mayores rendimientos de azúcar que un proceso con una etapa de hidrólisis ácida (Resumen).	en H ₂ SO ₄ diluido para mejorar la obtención de azúcares totales y etanol (Resumen).
A) Exponer una composición a una condición de vacío	Una fracción de los sólidos de la primera hidrólisis ácida fue filtrada en vacío para separar los residuos sólidos y líquidos (Métodos, Primer paso de hidrólisis ácida). La lechada pretratada obtenida de la segunda hidrólisis ácida fue presionada en un filtro de vacío para separar los líquidos y los sólidos (Métodos, Segundo paso de hidrólisis ácida).	No lo menciona
Donde la composición tiene un contenido de materia seca, y la composición comprende una biomasa lignocelulósica procesada en un proceso de pretratamiento y un líquido agregado que se ha agregado a la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua después del proceso de pretratamiento	La madera blanda fue impregnada con SO₂ y sujeta a un primer paso de hidrólisis ácida usando vapor a alta temperatura. El material obtenido fue separado en dos fracciones: una fue presionada y la otra fue filtrada en vacío para separar los residuos líquidos y sólidos. La fracción sólida fue reimpregnada con SO₂ y pretratada nuevamente con vapor (Métodos, segundo paso de hidrólisis ácida). Las condiciones de ambas hidrólisis ácidas se realizaron bajo lo establecido en estudios anteriores, como el de Söderström Johanna et al. Biomass and Bioenergy, 2003, 24, 6, 475-486. (Métodos, Primer y segundo paso de hidrólisis ácida). El residuo sólido de ambas etapas fue lavado con agua y sujeto a hidrólisis enzimática (Métodos, párr. 1). La torta lavada fue presionada o filtrada al vacío (Métodos, Primer paso de hidrólisis ácida).	El material usado para la impregnación con H₂SO₄ en el primer paso tenía un contenido de materia seca (DM, por sus siglas en inglés) de 55.5%. (Pág. 477, Col. 1, último párrafo). En el primer paso de pretratamiento, la materia prima fue impregnada con H₂SO₄ diluido (...) y pretratada a 180°C por 10 minutos. El material impregnado tenía un contenido de 30% de materia seca. El material fue separado por centrifugación en un residuo sólido y un líquido. El material sólido fue lavado con agua para remover todas las sustancias solubles (Pág. 478, Col. 1, Párr. 1). En el segundo paso de pretratamiento, el material sólido lavado, con un contenido de materia seca de 37%, fue reimpregnado con H₂SO₄ (Pág. 478, Col. 1, Párr. 2).
En donde el por ciento en peso del contenido de materia seca de la composición en peso de la cantidad total de la composición, está en el intervalo de 1 a 60 por ciento en peso	No lo menciona.	El material usado para la impregnación con H₂SO₄ en el primer paso tenía un contenido de materia seca (DM, por sus siglas en inglés) de 55.5%. (Pág. 477, Col. 1, último párrafo). En el primer paso de pretratamiento, el material impregnado tenía un contenido de 30% de materia seca (Pág. 478, Col. 1, Párr. 1). En el segundo paso de pretratamiento, el material sólido lavado, con un contenido de materia seca de 37%, fue reimpregnado con H₂SO₄ (Pág. 478, Col. 1, Párr. 2).
B) Dejar de exponer la composición a la condición de vacío	La composición pretratada fue presionada o filtrada al vacío para separar los líquidos y los sólidos. Las fracciones líquidas fueron analizadas (...), y las fracciones sólidas fueron sujetas a hidrólisis enzimática (Segundo paso de	No lo menciona

	hidrólisis ácida).	
C) Agregar un catalizador a la composición, en donde el catalizador es capaz de hidrolizar la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua en la composición	La hidrólisis enzimática fue llevada a cabo sobre los sólidos lavados del segundo paso de hidrólisis ácida para alcanzar la máxima digestibilidad de los pedazos de madera, usando enzimas (Métodos, Hidrólisis Enzimática).	La hidrólisis enzimática se realizó usando una mezcla de celulasa comercial, Celluclast 1.5 1, suplementada con una preparación de β -glucosidase (Pág. 478, Col. 2, último párrafo).
D) Realizar una hidrólisis catalítica de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua en la composición	El residuo sólido del segundo paso fue lavado y sujeto a hidrólisis enzimática para determinar el rendimiento de azúcar del proceso enzimático (Métodos, párr. 1).	Se realizó hidrólisis enzimática al material sólido lavado (Pág. 479, Col 1, Párr. 2).

El documento D1 se considera el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque divulga la investigación de la influencia de someter a presión la biomasa, junto con los efectos de no lavar el material, en el rendimiento del azúcar obtenida de una hidrólisis en dilución ácida de dos pasos, con o sin la subsecuente digestión enzimática de los sólidos (Resumen).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y el procedimiento divulgado de D1 consiste en que éste último no divulga el porcentaje en peso del contenido de materia seca de la composición.

No se evidencia un efecto técnico inesperado entre el método de la presente solicitud que incluye exponer a una condición de vacío, previa a la hidrólisis enzimática, una composición de biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, cuyo porcentaje en peso de materia seca está entre 1% y 60% de la cantidad total de la composición, junto con un líquido agregado después del pretratamiento, y el método divulgado en el documento D1 en el que se realiza un proceso de hidrólisis enzimática de sólidos insolubles en agua cuyo pretratamiento consiste en que primero son lavados y luego son sometidos a presión o filtración en vacío, dado que ambas invenciones solucionan el mismo problema técnico, que consiste en proporcionar un método para obtener azúcares a través de hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica que involucra el pretratamiento de la materia prima en una condición de vacío.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: “¿Cómo obtener un método para la obtención de azúcares a través de hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica que involucra el pretratamiento de la materia prima en una condición de vacío, alternativo al revelado en el documento D1?

Sin embargo, la utilización de materia seca con un contenido de entre 1% y 60% de la cantidad total de la composición ya está divulgada en D2, donde se evidencia que el contenido de materia seca de las composiciones empleadas en los pasos de pretratamiento de biomasa lignocelulósica es de 30% en el primer paso (Pág. 478, Col. 1, Párr. 1), y de 37% en el segundo paso (Pág. 478, Col. 1, Párr. 2).

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, estaría en capacidad de seleccionar que el contenido de materia seca de la composición en peso de la cantidad total de la composición esté en el intervalo de 1 a 60% en peso, como una alternativa a las reveladas en el documento D1, y llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia.

De igual manera el documento D1 divulga las características de las reivindicaciones dependientes así:

Reivindicación 7: la fracción sólida resultante fue lavada con agua caliente en exceso (Métodos, Primer paso de hidrólisis ácida). Por lo tanto, el líquido agregado carece de un catalizador capaz de hidrolizar la biomasa.

Reivindicación 11: la hidrólisis enzimática no se hace bajo condición de vacío, dado que no lo especifica en el documento.

Reivindicaciones 13 y 15: La impregnación de la materia celulósica se hace con SO₂ (Métodos, párr. 1), por lo cual no utilizan amoníaco en el pretratamiento y, por ende, la composición expuesta a la condición de vacío carece de amoníaco.

Reivindicación 14: La hidrólisis enzimática fue realizada sobre los sólidos lavados del segundo paso de hidrólisis ácida para alcanzar la máxima digestibilidad de las astillas de madera, usando enzimas (Métodos, Hidrólisis Enzimática).

Asimismo, el documento D2 divulga las características de las reivindicaciones dependientes así:

Reivindicación 4: El material usado para la impregnación con H₂SO₄ en el primer paso tenía un contenido de materia seca (DM, por sus siglas en inglés) de 55.5%. (Pág. 477, Col. 1, último párrafo). En el primer paso de pretratamiento, el material impregnado tenía un contenido de 30% de materia seca (Pág. 478, Col. 1, Párr. 1). En el segundo paso de pretratamiento, el material sólido lavado, con un contenido de materia seca de 37%, fue reimpregnado con H₂SO₄ (Pág. 478, Col. 1, Párr. 2).

Por otra parte, las reivindicaciones 2 y 12 son afectadas con el conocimiento del técnico, *“el experto medio deberá poseer experiencia y contar con un saber general en la materia y con una serie de conocimientos en el campo específico de la invención”*, el cual conoce que:

Reivindicación 2: si bien D1 no menciona que los pasos de hidrólisis ácida se realicen en un recipiente distinto de aquel en el que se hace la hidrólisis enzimática, la persona normalmente versada en la materia puede reconocer que, si los sólidos de las hidrólisis ácida son lavados, presionados y filtrados, esto se hace en un equipo distinto de aquel en que se lleva a cabo la hidrólisis enzimática para evitar que las enzimas estén expuestas a condiciones que lleguen a inactivarlas, además de tener unas condiciones de proceso distintas a las de la hidrólisis ácida. Por lo tanto, se considera obvia. Cabe decir, que la solución al anterior problema técnico objetivo se encuentra dentro de un proceso de optimización, lo cual hace parte de la práctica habitual de la persona versada en la materia que trabaje en el campo de la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica.

En las reivindicación 12 se habla de que el proceso es continuo, pero el proceso descrito en la parte experimental es por lotes. Según lo anterior, la reivindicación 12 no menciona características inventivas adicionales, pues la selección de hacer el proceso por lotes o continuo no demuestra tener un efecto técnico sobre la invención, por lo cual no se considera inventiva. Cabe decir, que la solución al anterior problema técnico objetivo se encuentra dentro de un proceso de optimización, lo cual hace parte de la práctica habitual de la persona versada en la materia que trabaje en el campo de la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica.

Las reivindicaciones dependientes 2, 4, 7 y 11 a 15 no mencionan alguna característica que hagan inventivo el proceso de la reivindicación 1, por lo cual se considera que tampoco son inventivas.

La reivindicación 16 consiste en: *“Un proceso para incrementar la recuperación de glucosa de una biomasa lignocelulósica pretratada, que comprende los pasos de...”* (Pág. 107, Radicado N°. 14-157243-00000-0000).

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:

Características esenciales	D1	D2
----------------------------	----	----

Un proceso para incrementar la recuperación de glucosa de una biomasa lignocelulósica pretratada, que comprende los pasos de	Se considera una hidrólisis en dilución ácida de madera blanda, bien sea como un proceso independiente o como pretratamiento antes de la hidrólisis enzimática, que resulta en mayores rendimientos de azúcar que un proceso con una etapa de hidrólisis ácida (Resumen).	Antes de la hidrólisis enzimática de la madera suave, se necesita un pretratamiento. En el estudio se hace un pretratamiento con vapor en dos etapas, por impregnación en H ₂ SO ₄ diluido para mejorar la obtención de azúcares totales y etanol (Resumen).
A) Exponer una composición a una condición de vacío	Una fracción de los sólidos de la primera hidrólisis ácida fue filtrada en vacío para separar los residuos sólidos y líquidos (Métodos, Primer paso de hidrólisis ácida). La lechada pretratada obtenida de la segunda hidrólisis ácida fue presionada en un filtro de vacío para separar los líquidos y los sólidos (Métodos, Segundo paso de hidrólisis ácida).	No lo menciona
Donde la composición tiene un contenido de materia seca, y la composición comprende una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua	La madera blanda fue impregnada con SO₂ y sujeta a un primer paso de hidrólisis ácida usando vapor a alta temperatura. El material obtenido fue separado en dos fracciones: una fue presionada y la otra fue filtrada en vacío para separar los residuos líquidos y sólidos. La fracción sólida fue reimpregnada con SO₂ y pretratada nuevamente con vapor (Métodos, segundo paso de hidrólisis ácida). Las condiciones de ambas hidrólisis ácidas se realizaron bajo lo establecido en estudios anteriores, como el de Söderström Johanna et al. Biomass and Bioenergy, 2003, 24, 6, 475-486. (Métodos, Primer y segundo paso de hidrólisis ácida).	El material usado para la impregnación con H₂SO₄ en el primer paso tenía un contenido de materia seca (DM, por sus siglas en inglés) de 55.5%. (Pág. 477, Col. 1, último párrafo). En el primer paso de pretratamiento, la materia prima fue impregnada con H₂SO₄ diluido (...) y pretratada a 180°C por 10 minutos. El material impregnado tenía un contenido de 30% de materia seca. El material fue separado por centrifugación en un residuo sólido y un líquido. El material sólido fue lavado con agua para remover todas las sustancias solubles (Pág. 478, Col. 1, Párr. 1). En el segundo paso de pretratamiento, el material sólido lavado, con un contenido de materia seca de 37%, fue reimpregnado con H₂SO₄ (Pág. 478, Col. 1, Párr. 2).
En donde el por ciento en peso del contenido de materia seca de la composición en peso de la cantidad total de la composición, está en el intervalo de 1 a 60 por ciento en peso	No lo menciona.	El material usado para la impregnación con H₂SO₄ en el primer paso tenía un contenido de materia seca (DM, por sus siglas en inglés) de 55.5%. (Pág. 477, Col. 1, último párrafo). En el primer paso de pretratamiento, el material impregnado tenía un contenido de 30% de materia seca (Pág. 478, Col. 1, Párr. 1). En el segundo paso de pretratamiento, el material sólido lavado, con un contenido de materia seca de 37%, fue reimpregnado con H₂SO₄. Una porción del material pretratado fue separado por filtración en un residuo sólido y un líquido para evaluación, por separado, de hidrólisis enzimática y fermentación (Pág. 478, Col. 1, Párr. 2).

La composición carece de líquido libre	Una fracción de los sólidos de la primera hidrólisis ácida fue filtrada en vacío para separar los residuos sólidos y líquidos (Primer paso de hidrólisis ácida). La lechada pretratada obtenida de la segunda hidrólisis ácida fue presionada en un filtro de vacío para separar los líquidos y los sólidos (Métodos, Segundo paso de hidrólisis ácida).	Una porción del material pretratado fue separado por filtración en un residuo sólido y un líquido para evaluación, por separado, de hidrólisis enzimática y fermentación (Pág. 478, Col. 1, Párr. 2).
B) Dejar de exponer la composición a la condición de vacío	La composición pretratada fue presionada o filtrada al vacío para separar los líquidos y los sólidos. Las fracciones líquidas fueron analizadas (...), y las fracciones sólidas fueron sujetas a hidrólisis enzimática (Segundo paso de hidrólisis ácida).	No lo menciona
C) Agregar un catalizador a la composición, en donde el catalizador es capaz de hidrolizar la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua en la composición	La hidrólisis enzimática fue llevada a cabo sobre los sólidos lavados del segundo paso de hidrólisis ácida para alcanzar la máxima digestibilidad de los pedazos de madera, usando enzimas (Métodos, Hidrólisis Enzimática).	La hidrólisis enzimática se realizó usando una mezcla de celulasa comercial, Celluclast 1.5 1, suplementada con una preparación de β -glucosidase (Pág. 478, Col. 2, último párrafo).
D) Realizar una hidrólisis catalítica de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua en la composición	El residuo sólido del segundo paso fue lavado y sujeto a hidrólisis enzimática para determinar el rendimiento de azúcar del proceso enzimático (Métodos, párr. 1).	Se realizó hidrólisis enzimática al material sólido lavado (Pág. 479, Col 1, Párr. 2).

El documento D1 se considera el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 16 porque divulga la investigación de la influencia de someter a presión la biomasa, junto con los efectos de no lavar el material, en el rendimiento del azúcar obtenida de una hidrólisis en dilución ácida de dos pasos, con o sin la subsecuente digestión enzimática de los sólidos (Resumen).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 16 y el procedimiento divulgado de D1 consiste en que éste último no divulga el porcentaje en peso del contenido de materia seca de la composición.

No se evidencia un efecto técnico inesperado entre el método de la presente solicitud que incluye exponer a una condición de vacío, previa a la hidrólisis enzimática, la composición de biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, cuyo porcentaje en peso de materia seca está entre 1% y 60% de la cantidad total de la composición, que no tiene líquido libre, y el método divulgado en el documento D1 en el que se realiza un proceso de hidrólisis enzimática de sólidos insolubles en agua cuyo pretratamiento consiste en que primero son lavados y luego son sometidos a presión o filtración en vacío, dado que ambas invenciones solucionan el mismo problema técnico, que consiste en proporcionar un método para obtener azúcares a través de hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica que involucra el pretratamiento de la materia prima en una condición de vacío.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: “¿Cómo obtener un proceso para la obtención de azúcares a partir de la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica que involucra el pretratamiento de la materia prima en una condición de vacío, alternativo al revelado en el documento D1?

Sin embargo, la utilización de materia seca con un contenido de entre 1% y 60% de la cantidad total de la composición ya está divulgada en D2, donde se evidencia que el contenido de materia seca de las composiciones empleadas en los pasos de pretratamiento de biomasa lignocelulósica es de 30% en el primer paso (Pág. 478, Col.

1, Párr. 1), y de 37% en el segundo paso (Pág. 478, Col. 1, Párr. 2).

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, estaría en capacidad de seleccionar que el contenido de materia seca de la composición en peso de la cantidad total de la composición esté en el intervalo de 1 a 60% en peso, como una alternativa a las reveladas en el documento D1, y llegar así al objeto de la reivindicación 16 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia.

De igual manera el documento D1 divulga las características de las reivindicaciones dependientes así:

Reivindicación 22: la hidrólisis enzimática no se hace bajo condición de vacío, dado que no lo especifica en el documento.

Reivindicaciones 24 y 25: La impregnación de la materia celulósica se hace con SO₂ (Métodos, párr. 1), por lo cual no utilizan amoníaco en el pretratamiento y, por ende, la composición expuesta a la condición de vacío carece de amoníaco.

Reivindicación 26: La hidrólisis enzimática fue realizada sobre los sólidos lavados del segundo paso de hidrólisis ácida para alcanzar la máxima digestibilidad de las astillas de madera, usando enzimas (Métodos, Hidrólisis Enzimática).

Asimismo, el documento D2 divulga las características de las reivindicaciones dependientes así:

Reivindicación 18: El material usado para la impregnación con H₂SO₄ en el primer paso tenía un contenido de materia seca (DM, por sus siglas en inglés) de 55.5%. (Pág. 477, Col. 1, último párrafo). En el primer paso de pretratamiento, el material impregnado tenía un contenido de 30% de materia seca (Pág. 478, Col. 1, Párr. 1). En el segundo paso de pretratamiento, el material sólido lavado, con un contenido de materia seca de 37%, fue reimpregnado con H₂SO₄ (Pág. 478, Col. 1, Párr. 2).

Por otra parte, la reivindicación 23 es afectada con el conocimiento del técnico, *“el experto medio deberá poseer experiencia y contar con un saber general en la materia y con una serie de conocimientos en el campo específico de la invención”*, el cual conoce que:

En las reivindicación 23 se habla de que el proceso es continuo, pero el proceso descrito en la parte experimental es por lotes. Según lo anterior, la reivindicación 23 no menciona características inventivas adicionales, pues la selección de hacer el proceso por lotes o continuo no demuestra tener un efecto técnico sobre la invención, por lo cual no se considera inventiva. Cabe decir, que la solución al anterior problema técnico objetivo se encuentra dentro de un proceso de optimización, lo cual hace parte de la práctica habitual de la persona versada en la materia que trabaje en el campo de la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica.

Las reivindicaciones dependientes 18 y 22 a 26 no mencionan alguna característica que hagan inventivo el proceso de la reivindicación 16, por lo cual se considera que tampoco son inventivas.

La reivindicación 27 consiste en: *“Un proceso para incrementar la recuperación de glucosa de una biomasa lignocelulósica pretratada, que comprende los pasos de...”* (Pág. 109, Radicado N°. 14-157243-00000-0000).

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:

Características esenciales	D1	D2
Un proceso para incrementar la recuperación de glucosa de una biomasa	Se considera una hidrólisis en dilución ácida de madera blanda, bien sea como un proceso	Antes de la hidrólisis enzimática de la madera suave, se necesita un pretratamiento. En el estudio se

lignocelulósica pretratada, que comprende los pasos de	independiente o como pretratamiento antes de la hidrólisis enzimática, que resulta en mayores rendimientos de azúcar que un proceso con una etapa de hidrólisis ácida (Resumen).	hace un pretratamiento con vapor en dos etapas, por impregnación en H ₂ SO ₄ diluido para mejorar la obtención de azúcares totales y etanol (Resumen).
A) Exponer una composición a una condición de vacío	Una fracción de los sólidos de la primera hidrólisis ácida fue filtrada en vacío para separar los residuos sólidos y líquidos (Métodos, Primer paso de hidrólisis ácida). La lechada pretratada obtenida de la segunda hidrólisis ácida fue presionada en un filtro de vacío para separar los líquidos y los sólidos (Métodos, Segundo paso de hidrólisis ácida).	No lo menciona
Donde la composición tiene un contenido de materia seca, y la composición comprende una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, y un líquido libre.	La madera blanda fue impregnada con SO₂ y sujeta a un primer paso de hidrólisis ácida usando vapor a alta temperatura. El material obtenido fue separado en dos fracciones: una fue presionada y la otra fue filtrada en vacío para separar los residuos líquidos y sólidos. La fracción sólida fue re-impregnada con SO₂ y pretratada nuevamente con vapor (Métodos, segundo paso de hidrólisis ácida). Las condiciones de ambas hidrólisis ácidas se realizaron bajo lo establecido en estudios anteriores, como el de Söderström Johanna et al. Biomass and Bioenergy, 2003, 24, 6, 475-486. (Métodos, Primer y segundo paso de hidrólisis ácida).	El material usado para la impregnación con H₂SO₄ en el primer paso tenía un contenido de materia seca (DM, por sus siglas en inglés) de 55.5%. (Pág. 477, Col. 1, último párrafo). En el primer paso de pretratamiento, la materia prima fue impregnada con H₂SO₄ diluido (...) y pretratada a 180°C por 10 minutos. El material impregnado tenía un contenido de 30% de materia seca. El material fue separado por centrifugación en un residuo sólido y un líquido. El material sólido fue lavado con agua para remover todas las sustancias solubles (Pág. 478, Col. 1, Párr. 1). En el segundo paso de pretratamiento, el material sólido lavado, con un contenido de materia seca de 37%, fue reimpregnado con H₂SO₄ (Pág. 478, Col. 1, Párr. 2).
En donde el por ciento en peso del contenido de materia seca de la composición en peso de la cantidad total de la composición, está en el intervalo de 1 a 60 por ciento en peso	No lo menciona.	El material usado para la impregnación con H₂SO₄ en el primer paso tenía un contenido de materia seca (DM, por sus siglas en inglés) de 55.5%. (Pág. 477, Col. 1, último párrafo). En el primer paso de pretratamiento, el material impregnado tenía un contenido de 30% de materia seca (Pág. 478, Col. 1, Párr. 1). En el segundo paso de pretratamiento, el material sólido lavado, con un contenido de materia seca de 37%, fue reimpregnado con H₂SO₄ (Pág. 478, Col. 1, Párr. 2).
B) Dejar de exponer la composición a la condición de vacío	La composición pretratada fue presionada o filtrada al vacío para separar los líquidos y los sólidos. Las fracciones líquidas fueron analizadas (...), y las fracciones sólidas fueron sujetas a hidrólisis enzimática (Segundo paso de hidrólisis ácida).	No lo menciona

C) Agregar un catalizador a la composición, en donde el catalizador es capaz de hidrolizar la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua en la composición	La hidrólisis enzimática fue llevada a cabo sobre los sólidos lavados del segundo paso de hidrólisis ácida para alcanzar la máxima digestibilidad de los pedazos de madera, usando enzimas (Métodos, Hidrólisis Enzimática).	La hidrólisis enzimática se realizó usando una mezcla de celulasa comercial, Celluclast 1.5 1, suplementada con una preparación de β -glucosidade (Pág. 478, Col. 2, último párrafo).
D) Realizar una hidrólisis catalítica de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua en la composición	El residuo sólido del segundo paso fue lavado y sujeto a hidrólisis enzimática para determinar el rendimiento de azúcar del proceso enzimático (Métodos, párr. 1).	Se realizó hidrólisis enzimática al material sólido lavado (Pág. 479, Col 1, Párr. 2).

El documento D1 se considera el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 27 porque divulga la investigación de la influencia de someter a presión la biomasa, junto con los efectos de no lavar el material, en el rendimiento del azúcar obtenida de una hidrólisis en dilución ácida de dos pasos, con o sin la subsecuente digestión enzimática de los sólidos (Resumen).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 27 y el procedimiento divulgado de D1 consiste en que éste último no divulga el porcentaje en peso del contenido de materia seca de la composición, ni que la composición tenga líquido libre.

No se evidencia un efecto técnico inesperado entre el método de la presente solicitud que incluye exponer a una condición de vacío, previa a la hidrólisis enzimática, la composición de biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, cuyo porcentaje en peso de materia seca está entre 1% y 60% de la cantidad total de la composición, que tiene líquido libre, y el método divulgado en el documento D1 en el que se realiza un proceso de hidrólisis enzimática de sólidos insolubles en agua cuyo pretratamiento consiste en que primero son lavados y luego son sometidos a presión o filtración en vacío, dado que ambas invenciones solucionan el mismo problema técnico, que consiste en proporcionar un método para obtener azúcares a través de hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica que involucra el pretratamiento de la materia prima en una condición de vacío.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: “¿Cómo obtener un proceso para la obtención de azúcares a partir de la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica que involucra el pretratamiento de la materia prima en una condición de vacío, alternativo al revelado en el documento D1?

Sin embargo, la utilización de materia seca con un contenido de entre 1% y 60% de la cantidad total de la composición ya está divulgada en D2, donde se evidencia que el contenido de materia seca de las composiciones empleadas en los pasos de pretratamiento de biomasa lignocelulósica es de 30% en el primer paso (Pág. 478, Col. 1, Párr. 1), y de 37% en el segundo paso (Pág. 478, Col. 1, Párr. 2).

Por otra parte, a pesar de que ni el documento D1 ni el D2 mencionan explícitamente que la composición tenga líquido libre, que queda presente en la composición luego del pretratamiento, la persona normalmente versada en la materia reconoce que los pasos de activación, extracción, hidrólisis, autohidrólisis e impregnación dejan en la materia seca pretratada un líquido libre que, de no ser retirado por algún método, estará presente en la composición. Por lo tanto, se considera obvia. Cabe decir, que la solución al anterior problema técnico objetivo se encuentra dentro de un proceso de optimización, lo cual hace parte de la práctica habitual de la persona versada en la materia que trabaje en el campo de la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica.

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia teniendo como documentos de partida D1 y D2 junto con su conocimiento técnico, estaría en capacidad de seleccionar que el contenido de materia seca de la composición en peso

de la cantidad total de la composición esté en el intervalo de 1 a 60% en peso, y que la composición tenga líquido libre, como una alternativa a las reveladas en el documento D1, y llegar así al objeto de la reivindicación 27 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia.

De igual manera el documento D1 divulga las características de las reivindicaciones dependientes así:

Reivindicación 33: la hidrólisis enzimática no se hace bajo condición de vacío, dado que no lo especifica en el documento.

Reivindicaciones 35 y 36: La impregnación de la materia celulósica se hace con SO₂ (Métodos, párr. 1), por lo cual no utilizan amoníaco en el pretratamiento y, por ende, la composición expuesta a la condición de vacío carece de amoníaco.

Reivindicación 37: La hidrólisis enzimática fue realizada sobre los sólidos lavados del segundo paso de hidrólisis ácida para alcanzar la máxima digestibilidad de las astillas de madera, usando enzimas (Métodos, Hidrólisis Enzimática).

Asimismo, el documento D2 divulga las características de las reivindicaciones dependientes así:

Reivindicación 29: El material usado para la impregnación con H₂SO₄ en el primer paso tenía un contenido de materia seca (DM, por sus siglas en inglés) de 55.5%. (Pág. 477, Col. 1, último párrafo). En el primer paso de pretratamiento, el material impregnado tenía un contenido de 30% de materia seca (Pág. 478, Col. 1, Párr. 1). En el segundo paso de pretratamiento, el material sólido lavado, con un contenido de materia seca de 37%, fue reimpregnado con H₂SO₄ (Pág. 478, Col. 1, Párr. 2).

Por otra parte, la reivindicación 34 es afectada con el conocimiento del técnico, “*el experto medio deberá poseer experiencia y contar con un saber general en la materia y con una serie de conocimientos en el campo específico de la invención*”, el cual conoce que:

En las reivindicación 34 se habla de que el proceso es continuo, pero el proceso descrito en la parte experimental es por lotes. Según lo anterior, la reivindicación 34 no menciona características inventivas adicionales, pues la selección de hacer el proceso por lotes o continuo no demuestra tener un efecto técnico sobre la invención, por lo cual no se considera inventiva. Cabe decir, que la solución al anterior problema técnico objetivo se encuentra dentro de un proceso de optimización, lo cual hace parte de la práctica habitual de la persona versada en la materia que trabaje en el campo de la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica.

Las reivindicaciones dependientes 29 y 33 a 37 no mencionan alguna característica que hagan inventivo el proceso de la reivindicación 27, por lo cual se considera que tampoco son inventivas.

7. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente solicitud están afectados así:

Ítem	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	Art 1*	1, 2, 7, 11 a 16, 22 a 27, 33 a 37.	Nivel inventivo
D2	Art 2*	1, 4, 16, 18, 27, 29.	Nivel inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir del día siguiente de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Si como respuesta a este requerimiento el solicitante llegara a modificar: i) el capítulo reivindicatorio, ii) la descripción de la invención a proteger, iii) o presente un nuevo capítulo reivindicatorio, no deberá pagar la tasa de modificación voluntaria pero sí la correspondiente a la tasa de examen de patentabilidad para que se estudie la materia modificada. En todo caso, el número de requerimientos por no patentabilidad estará supeditado a que el término del estudio de patentabilidad no sea superior a 18 meses, contados desde la publicación de la solicitud de patente de invención. Adicionalmente, se le recuerda al solicitante que si como respuesta a este requerimiento llegara a modificar el capítulo reivindicatorio y éste contenga más de diez (10) reivindicaciones deberá pagar la tasa por reivindicación adicional.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante de sesenta (60) días para dar respuesta a este requerimiento y presentarla por escrito.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.



JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 2016-03-15

Elaboró: Monica Liliana Sarmiento Romero
Revisó: Alba Rocio Lemus Quiroga

Monica Sarmiento

Search history

Search 1: TAC=(lignocellulosic and biomass and pretreatment and vacuum) (Results 30)
Search 2: TAC=(lignocellulosic and biomass and prehydrolys* and vacuum) (Results 5)
Search 3: TAC=(lignocellulo* and biomass and prehydrolys* and vacuum) (Results 6)
Search 4: TAC=(lignocellulose and biomass and prehydrolys* and vacuum) (Results 1)
Search 5: TAC=(lignocellulo* and prehydrolys* and vacuum) (Results 6)

Title: PROCESS FOR CARRYING OUT PRE-HYDROLYSIS OF A BIOMASS

Abstract: Source: US2005161038A A process wherein biomass is compacted at 300 kg/m³ by a helical feeder, degassed, flooded, heated, stirred, and pre-hydrolyzed. The sugar being recovered at a first washing within the reactor with values higher than 90 percent. The control of the process enables one to produce cellulignin with a high specific surface, 2 m²/g (measured by BET), compared with the value of 0.4 m²/g of non-hydrolyzed biomass, maintain crystallinity of the cellulose fibers, aiming at grinding it into fine particles (f<250 mm), globulizing the lignin, exposing the cellulose to attacks by micro-organisms from cud of ruminants, fungi, bacteria or enzymes in microbiological or enzymatic fermentation.

Classifications:

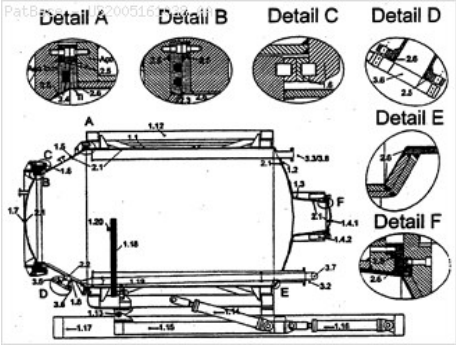
International (IPC 8-9): B01J19/02 B01J19/28 B01J3/00 B01J3/02 B01J3/04 B01J8/00 B09B3/00 C07G1/00 C07H1/08 C07H3/00 C08H5/04 C08H7/00 C08H8/00 C08L9/02 C10L5/40 C10L5/44 C12N1/22 C12P7/10 C13D1/14 C13K1/02 C13K1/04 C13K13/00 C22B3/02 D21B1/02 D21C1/00 D21C1/04 (Advanced/Invention); B01J3/00 B01J3/02 B01J3/04 B09B3/00 (Advanced/Non-invention); B01J C13K (Subclass/Invention)

International (IPC 1-7): B01J19/02 B01J19/28 B01J3/00 B01J3/02 B01J3/04 B09B3/00 C07G1/00 C12N1/22 C12P7/10 C13D1/14 C13K1/02 C13K13/00 F16J12/00

CPC: B01J2219/00256 B01J19/02 B01J19/0073 B01J19/285 B01J2219/0236 B01J2219/0286 C13K1/02 C13K13/002 Y02E50/16 Y02E50/30

European: B01J19/00D6 B01J19/02 B01J19/28B C13K1/02 C13K13/00B L01J219/02B10 L01J219/02D10D Y02E50/16 Y02E50/30

US: 127/1 127/2 127/2P 127/34 127/34S 127/37 127/42 127/42S 220/592.27 422/129 422/129S 422/198



Family:

Publication number	Publication date	Application number	Application date
AR023267 AA	20020904	AR2000P103159	20000623
AR059078 AA	20080312	AR2007P100228	20070118
AT274998 E	20040915	AT20000940076T	20000623
AT499153 E	20110315	AT20000002158T	20000623
AU200055160 A5	20010109	AU20000055160	20000623
BRPI9902607 A	20010109	BR1999PI02607	19990623
BRPI9902607 B1	20100824	BR1999PI02607	19990623
CA2377710 AA	20001228	CA20002377710	20000623
CA2377710 C	20071030	CA20002377710	20000623
CA2588501 AA	20001228	CA20002588501	20000623
CA2588501 C	20111101	CA20002588501	20000623
CN100384526 C	20080430	CN200510134049	20000623
CN1243610 C	20060301	CN20008011525	20000623
CN1399577 A	20030226	CN20008011525	20000623
CN1824379 A	20060830	CN200510134049	20000623
CO5280144 A1	20030530	CO20000047560	20000623
DE00940076 T1	20040422	DE20000940076T	20000623
DE03002158 T1	20040422	DE20030002158T	20000623
DE60013447 D1	20041007	DE20006013447	20000623
DE60013447 T2	20050915	DE20006013447T	20000623
DE60045667 D1	20110407	DE20006045667	20000623
DK1194226 T3	20050117	DK20000940076T	20000623
EA004080 B1	20031225	EA20030000069	20000623
EA004438 B1	20040429	EA20020000070	20000623
EA006758 B1	20060428	EA20030001226	20000623
EP1194226 A2	20020410	EP20000940076	20000623
EP1194226 B1	20040901	EP20000940076	20000623
EP1316620 A2	20030604	EP20030002158	20000623
EP1316620 A3	20040303	EP20030002158	20000623
EP1316620 B1	20110223	EP20030002158	20000623
ES2204353 T1	20040501	ES20000940076T	20000623
ES2204353 T3	20050401	ES20000940076T	20000623
ES2204361 T1	20040501	ES20030002158T	20000623
ES2204361 T3	20110609	ES20030002158T	20000623
HK1043954 A1	20050324	HK20020105604	20020730
HK1054249 A1	20110812	HK20030106361	20020730
JP2003502395 T2	20030121	JP20010504500T	20000623
JP2007289961 A2	20071108	JP20070165281	20070622
JP4664330 B2	20110406	JP20070165281	20070622
JP4870297 B2	20120208	JP20010504500T	20000623
MX255489 B	20080319	MX2002PA00137	20020107
MX255489 B	20080319	MX2002PA00137	20000623
MXPA02000137 A1	20040910	MX2002PA00137	20020107
MXPA02000137 A1	20040910	MX2002PA00137	20000623
OA11977 A	20060417	OA20011000344	20000623
PE04952001 A1	20010426	PE20000000628	20000623
PT1194226 T	20050131	PT20000940076T	20000623
PT1316620 T	20110518	PT20030002158T	20000623
US2005161038 AA	20050728	US20050079313	20050315
US6878212 BA	20050412	US20020018360	20020519
US7238242 BB	20070703	US20050079313	20050315
WO0078446 A2	20001228	WO2000BR00065	20000623
WO0078446 A3	20011108	WO2000BR00065	20000623
ZA200110394 A	20021219	ZA20010010394	20011219

Priority:

BR1999PI02607 19990623	BR1926PI07499 19990623	WO2000BR00065 20000623
CA20002377710 20000623	JP20010504500 20000623	EP20000940076 20000623
US20020018360 20020519	US20050079313 20050315	HK20020105604 20020730
CA20002588501 20000623	JP20010504500T 20000623	

Probable Assignee: RM MATERIAIS REFRATARIOS LTDA

Assignee(s): (std): ALVARO GUEDES SOARES ; DALTRO GARCIA PINATTI ; GARCIA PINATTI DALTRO ; GUEDES SOARES ALVARO ; RM

MATERIAIS REFRATARIOS LTDA ; RM MATERIAIS REFRATORIOS LTDA ; RM MATERIALS REFRATARIOS LTDA ; SOARES ALVARO G ; RM MATERIAIS REFRAT RIOS LTDA ; RM MATERIAIS REFRATSRIOS LTDA

Assignee(s): RM MATERIAIS REFRATARIOS LTDA LORENA ; RM MATERIAIS REFRAT RIOS LTDA LORENA ; RM MATERIALS REFRATARIOS LTD ; PINATTI DALTRO G

Inventor(s): (std): GUEDES SOARES ALVARO ; PINATTI D GARCIA ; PINATTI DALTRO G ; PINATTI DALTRO GARCIA ; SOARES A GUEDES ; SOARES ALVARO G ; SOARES ALVARO GUEDES ; SOARES D GARCIA PINATTI A GUED ; ALVARO GARCIA PINATTI DALTRO G ; ALVARO GUEDES SOARES ; DALTRO GARCIA PINATTI ; GARCIA PINATTI DALTRO

Inventor(s): GARCIA PINATTI DALTRO GUEDES SOARES ALVARO ; A GUEDES SOARES ; D GARCIA PINATTI ; D GARCIA PINATTI A GUEDES SOARES

Agent(s): OGILVY RENAULT LLP SENCRL SRL; NORTON ROSE OR SENCRL SRL LLP; ERNESTO CAVELIER; NETTLETON JOHN VICTOR; NISHIYAMA MASAYA; ISHIDA TAKASHI; TSURUTA JUNICHI; HIGUCHI SOTOJI; FUKUMOTO TSUMORU; SMITH GAMBRELL AND RUSSELL LLP

Designated states: AE AL AM AT AU AZ BA BB BE BF BG BJ BR BY CA CF CG CH CI CM CN CR CU CY CZ DE DK DM EE ES FI FR GA GB GD GE GH GM GN GR GW HR HU ID IE IL IN IS IT JP KE KG KP KR KZ LC LI LK LR LS LT LU LV MA MC MD MG MK ML MN MR MW MX MZ NE NL NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL SN SZ TD TG TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW

Title: AN IMPROVED PRE-HYDROLYSIS STEP INVOLVING **VACUUM**

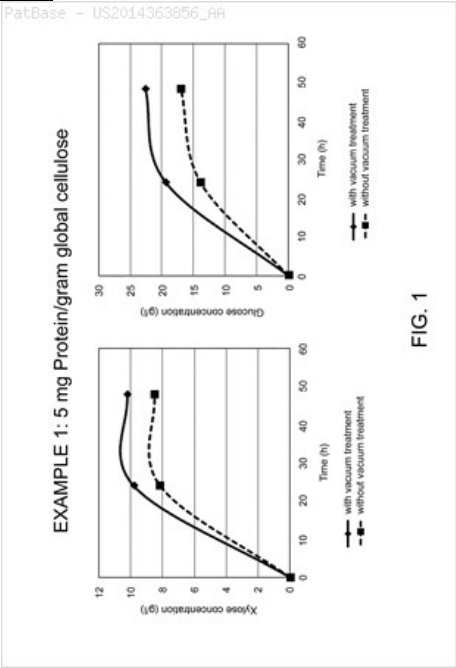
Abstract: Source: US2014363856A An improved pre-hydrolysis step involving exposing water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass to **vacuum** conditions, with and without enzymes is disclosed. After exposing the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass to **vacuum** conditions, enzymatic hydrolysis is conducted on the pre-treated material. The result is an increased yield of glucose and often xylose after the enzymatic hydrolysis when compared to a composition which has not been exposed to **vacuum** conditions.

Classifications:

International (IPC 8-9): C12P19/02 C13K1/02 D21C1/10 D21C9/00 (Advanced/Invention)

CPC: C12P2201/00 D21C9/007 D21C9/002 D21C1/10 C12P19/02

US: 435/105



Family:

Publication number	Publication date	Application number	Application date
AR089404 AA	20140820	AR2012P104908	20121221
AU2012356975 AA	20130627	AU20120356975	20121220
CA2860138 AA	20140620	CA20122860138	20121220
CN104136619 A	20141105	CN201280070367	20121220
CO7111308 A2	20141110	CO20140157243	20140721
EP2794901 A2	20141029	EP20120806478	20121220
IN01324MN2014 A	20150313	IN2014MN01324	20140701
ITTO20120012 A1	20130712	IT2012TO000012	20120111
JP2015500657 T2	20150108	JP20140548021T	20121220
KR20140127222 A	20141103	KR20147020021	20121220
MX2014007487 A1	20141024	MX20140007487	20140619
MX2014007487 A1	20141024	MX20140007487	20121220
RU2014125903 A	20160210	RU20140125903	20121220
TW201333211 A	20130816	TW20120148956	20121221
US2014363856 AA	20141211	US20120362986	20121220
WO13092881 A2	20130627	WO2012EP76419	20121220
WO13092881 A3	20130815	WO2012EP76419	20121220

Priority:
US20110578281P 20111221 IT2012TO000012 20120111 US20120672956P 20120718
US20120736639P 20121213 WO2012EP76419 20121220

Probable Assignee: BETA RENEWABLES SPA

Assignee(s): (std): BETA RENEWABLES S P A ; BETA RENEWABLES SPA

Assignee(s): BETA RENEWABLES SPASTRADA RIBROCCA 111-15057ALESSANDRIATORTONAIT ; CHERCHI FRANCESCO ; GIORDANO DARIO ; TORRE PAOLO ; ORIANI LUIS ; GRASSANO GIUSEPPE ; FERRERO SIMONE ; OTTONELLO PIERO ; SISSON EDWIN ANDREW

Inventor(s): (std): DARIO GIORDANO ; EDWIN ANDREW SISSON ; FERRERO SIMONE ; CHERCHI FRANCESCO ; FRANCESCO CHERCHI ; GIORDANO DARIO ; GIUSEPPE GRASSANO ; GRASSANO GIUSEPPE ; LUIS ORIANI ; ORIANI LUIS ; PAOLO TORRE ; PIERO OTTONELLO ; SIMONE FERRERO ; SISSON EDWIN ANDREW ; OTTONELLO PIERO ; TORRE PAOLO

Inventor(s): TORRE PAOLOIT ; OTTONELLO PIEROIT ; SISSON EDWIN ANDREWUS ; ORIANI LUISIT ; GRASSANO GIUSEPPEIT ; GIORDANO DARIOIT ; CHERCHI FRANCESCOIT ; FERRERO SIMONEIT

Agent(s): CHRYSILIOU IP; MACRAE AND CO; ZAMBARDINO UMBERTO; GERBINO ANGELO ET AL

Designated states: AE AG AL AM AO AT AU AZ BA BB BE BF BG BH BJ BN BR BW BY BZ CA CF CG CH CI CL CM CN CO CR CU CY CZ DE DK DM DO DZ EC EE EG ES FI FR GA GB GD GE GH GM GN GQ GR GT GW HN HR HU ID IE IL IN IS IT JP KE KG KM KN KP KR KZ LA LC LI LK LR LS LT LU LV LY MA MC MD ME MG MK ML MN MR MT MW MX MY MZ NA NE NG NI NL NO NZ OM PA PE PG PH PL PT QA RO RS RU RW SC SD SE SG SI SK SL SM SN ST SV SY SZ TD TG TH TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN ZA ZM ZW

Title: RAPID AND LOW COST ENZYMATIC FULL CONVERSION OF **LIGNOCELLULOSIC** BIOMASS

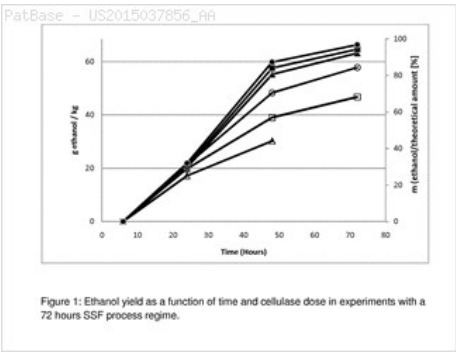
Abstract: Source: US2015037856A Methods are provided for improved processing of **lignocellulosic** biomass. Hydrothermally pretreated **lignocellulosic** biomass is subject to separate hydrolysis and fermentation (SHF) or **prehydrolysed** and subject to simultaneous saccharification and fermentation (SSF) at high initial loadings of cellulase enzymes, at least 15 FPU/g DM. The cellulase enzymes are subsequently recycled and used in subsequent hydrolysis cycles along with a lower dose supplementation of fresh enzyme. Loss of enzyme activity between hydrolysis cycles is offset by improved overall process advantage.

Classifications:

International (IPC 8-9): C12P19/00 C12P7/00 C12P7/06 C12P7/14 (Advanced/Invention)

CPC: Y02E50/17 C12P7/06 C12P19/00 C12P7/14 C12P7/00

US: 435/162



Family:

Publication number	Publication date	Application number	Application date
CA2851045 AA	20140403	CA20112851045	20111006
CN103930553 A	20140716	CN201180074749	20111006
EP2764109 A1	20140813	EP20110779223	20111006
IN02813DN2014 A	20150227	IN2014DN02813	20140409
US2015037856 AA	20150205	US20110350081	20111006
WO13050806 A1	20130411	WO2011IB54406	20111006

Priority:

WO2011IB54406 20111006

Probable Assignee: INBICON A S

Assignee(s): (std): INBICON AS ; JEPPESEN MARTIN DAN ; LARSEN JAN

Assignee(s): INBICON A S

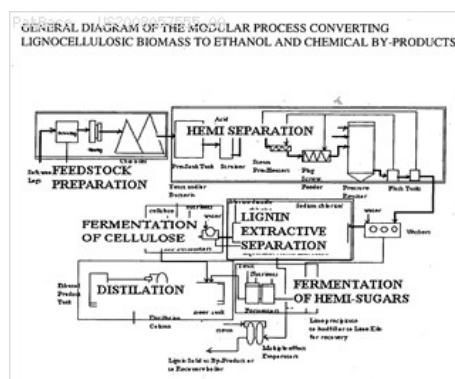
Inventor(s): (std): JEPPESEN MARTIN DAN ; LARSEN JAN

Agent(s): BENOIT AND COTE INC; PLOUGMANN AND VINGTOFT A S; PLOUGMANN AND VINGTOFT A/S

Designated states: AE AG AL AM AO AT AU AZ BA BB BE BF BG BH BJ BR BW BY BZ CA CF CG CH CI CL CM CN CO CR CU CY CZ DE DK DM DO DZ EC EE EG ES FI FR GA GB GD GE GH GM GN GQ GR GT GW HN HR HU ID IE IL IN IS IT JP KE KG KM KN KP KR KZ LA LC LI LK LR LS LT LU LV LY MA MC MD ME MG MK ML MN MR MT MW MX MY MZ NA NE NG NI NL NO NZ OM PE PG PH PL PT QA RO RS RU RW SC SD SE SG SI SK SL SM SN ST SV SY SZ TD TG TH TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN ZA ZM ZW

Abstract: Source: US2008057555A A continuous and modular process converts **lignocellulosic** materials for the production of ethanol principally and/or chemicals such as methanol, butanediol, propanediol, hydrocarbon fuel, etc. Renewable **lignocellulosic** biomass such as but not all inclusive hardwoods (gum, beech, oak, sweet gum, poplar, eucalyptus, etc.), soft woods (pines, fir, spruce, etc.), corn stovers, straws, grasses, recycled papers, waste products from pulp and paper mills, etc. can be used as feedstock. The process is designed to be modular and the feed entry point can be selected to adapt to different biomass feedstock. **Lignocellulosic** biomass such as hardwood and softwood are subjected to chemical/pressure treatment stages using potent and selective chemicals such as sodium chlorite/acetic acid (anhydrous) and chlorine/chlorine dioxide to separate the main components-lignin, cellulose (glucose) and hemicelluloses (xylose, arabinose, galactose)-into three process streams. The separated carbohydrates are further subjected to washing, cleaning, neutralization, and/or mild hydrolysis and subsequently fermented to produce ethanol. Residual lignin and extractives remained with the cellulose are removed by chemical treatment steps to enhance the fermentations of cellulose. Pre-hydrolysate after neutralization to neutralize and remove toxic components such as acetic acid, furfural, phenolics, etc. containing (xylose, arabinose, galactose) and hexoses (glucose) can be either separately or together with the purified cellulose fraction fermented to produce ethanol. Approximately 100 gallons of ethanol, suitable to be used as a fuel, can be produced from one dried ton of wood. Significant amount of lignin are separated as a by-product and can be converted to hydrocarbon fuel, surfactant, drilling aid, or can be incinerated for generation of power and steam.

International (IPC 8-9): C12P7/00 C12P7/10 (Advanced/Invention);
C12N9/42 C12P1/00 C12P7/06 (Advanced/Non-invention);
C12P7/00 C12P7/02 (Core/Invention);
C12N9/42 C12P1/00 C12P7/02 (Core/Non-invention)
CPC: C12P7/10 Y02E50/16 Y02E50/17
European: C12P7/10 Y02E50/16 Y02E50/17
US: 435/161 435/165 435/209 435/41



Publication number	Publication date	Application number	Application date
US2008057555 AA	20080306	US20070700718	20070201
US7666637 BB	20100223	US20070700718	20070201

US20060842225P 20060905 US20070700718 20070201

Assignee(s): (std): NGUYEN XUAN NGHINH

Inventor(s): (std): NGUYEN XUAN NGHINH

Agent(s): XUAN N NGUYEN

Title: CONTINUOUS PROCESS FOR THE PRODUCTION OF ETHANOL FROM **LIGNOCELLULOSIC** BIOMASS

Abstract: Source: US2012115200A A continuous process for the recovery of ethanol from hemicellulose and cellulose from **lignocellulosic** biomass. Yield of fermentable sugars can be maximized by continuous operation of the pre-treatment system and careful selection of pretreatment conditions including the addition of only small amounts of dilute mineral acid and low pressure. With this approach, the xylose component that is mainly present in its unfermentable oligomeric form in known pre-hydrolysis Kraft processes can be recovered more efficiently and as a monomer that can be fermented by xylose fermenting yeasts and bacteria. Due to the use of only dilute acids, there is a very low loss of glucose and xylose hence very low production of toxic chemicals (e.g. HMF, furfural) in the pretreatment step. The resulting overall fermentation efficiency of both hexose and pentose sugars is 90 percent of the theoretical maximum.

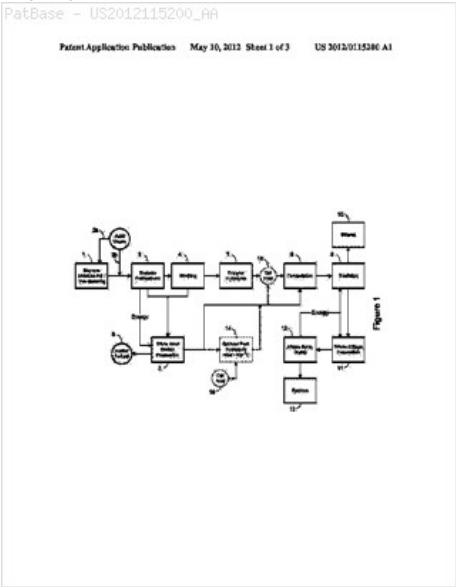
Classifications:

International (IPC 8-9): C08H8/00 C12P19/00 C12P7/10 (Advanced/Invention)

CPC: C12P7/10 Y02E50/16

European: C12P7/10

US: 435/165 435/165P



Family:

Publication number	Publication date	Application number	Application date
CN103221547 A	20130724	CN201180053733	20111108
CN103221547 B	20151209	CN201180053733	20111108
US2012115200 AA	20120510	US20110291659	20111108
WO12061939 A1	20120518	WO2011CA50692	20111108
WO12061939 A8	20120802	WO2011CA50692	20111108

Priority:

US20100411858P 20101109 US20110291659 20111108 WO2011CA50692 20111108

Probable Assignee: GREENFIELD SPECIALTY ALCOHOLS INC

Assignee(s): (std): BENECH REGIS OLIVIER ; BENSON ROBERT ASHLEY COOPER ; DOTTORI FRANK A ; GREENFIELD ETHANOL INC

Assignee(s): GREENFIELD SPECIALTY ALCOHOLS INC

Inventor(s): (std): BENECH REGIS OLIVIER ; BENSON ROBERT ASHLEY COOPER ; DOTTORI FRANK A

Agent(s): FRITZ JOACHIM T ET AL

Designated states: AE AG AL AM AO AT AU AZ BA BB BE BF BG BH BJ BR BW BY BZ CA CF CG CH CI CL CM CN CO CR CU CY CZ DE DK DM DO DZ EC EE EG ES FI FR GA GB GD GE GH GM GN GQ GR GT HW HN HR HU ID IE IL IN IS IT JP KE KG KM KN KP KR KZ LA LC LK LR LS LT LU LV LY MA MC MD ME MG MK ML MN MR MT MW MX MY MZ NA NE NG NI NL NO NZ OM PE PG PH PL PT QA RO RS RU RW SC SD SE SG SI SK SL SM SN ST SV SY SZ TD TG TH TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN ZA ZM ZW

Title: RAPID AND LOW COST ENZYMATIC FULL CONVERSION OF LIGNOCELLULOSETIC BIOMASS

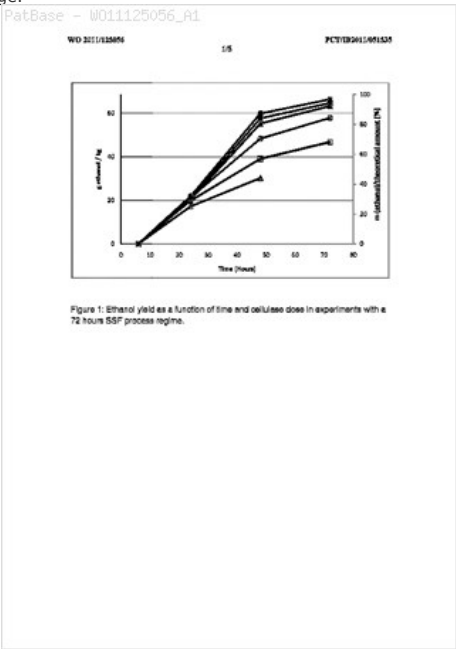
Abstract: Methods are provided for improved processing of lignocellulosic biomass in bioethanol production. Fiber fraction of hydrothermally pretreated lignocellulosic biomass is subject to separate hydrolysis and fermentation (SHF) or prehydrolysed and subject to simultaneous saccharification and fermentation (SSF) at high initial loadings of cellulase enzymes, > 15 FPU/g DM or preferably > 17 FPU/ g DM. The cellulase enzymes are subsequently recycled and used in subsequent hydrolysis cycles along with a lower dose supplementation of fresh enzyme. Loss of enzyme activity between hydrolysis cycles is offset by improved overall process advantage.

Classifications:

International (IPC 8-9): C12P19/02 C12P19/14 C12P7/10 (Advanced/Invention)

CPC: C12P7/10 C12P19/02 C12P19/14 Y02E50/16

European: C12P19/02 C12P19/14 C12P7/10 Y02E50/16



Family:

Publication number	Publication date	Application number	Application date
WO11125056 A1	20111013	WO2011IB51535	20110408

Priority:

US20100321890P 20100408 US20100425247P 20101221

Probable Assignee: INBICON AS

Assignee(s): (std): INBICON AS ; JEPPESEN MARTIN DAN ; LARSEN JAN

Assignee(s): INBICON A S

Inventor(s): (std): JEPPESEN MARTIN DAN ; LARSEN JAN

Agent(s): PLOUGMANN AND VINGTOFT A S

Designated states: AE AG AL AM AO AT AU AZ BA BB BE BF BG BH BJ BR BW BY BZ CA CF CG CH CI CL CM CN CO CR CU CY CZ DE DK DM DO DZ EC EE EG ES FI FR GA GB GD GE GH GM GN GQ GR GT GW HN HR HU ID IE IL IN IS IT JP KE KG KM KN KP KR KZ LA LC LK LR LS LT LU LV LY MA MC MD ME MG MK ML MN MR MT MW MX MY MZ NA NE NG NI NL NO NZ OM PE PG PH PL PT RO RS RU SC SD SE SG SI SK SL SM SN ST SV SY SZ TD TG TH TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN ZA ZM ZW



PERGAMON

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Biomass and Bioenergy 24 (2003) 475–486

BIOMASS &
BIOENERGY

www.elsevier.com/locate/biombioe

Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H₂SO₄ impregnation for ethanol production

Johanna Söderström, Linda Pilcher, Mats Galbe, Guido Zacchi*

Department of Chemical Engineering 1, Lund University, P.O. Box 124, SE-221 00 Lund, Sweden

Received 1 January 2002; received in revised form 21 October 2002; accepted 22 October 2002

Abstract

Fuel ethanol can be produced from softwood through hydrolysis in an enzymatic process. Prior to enzymatic hydrolysis of the softwood, pretreatment is necessary. In this study two-step steam pretreatment by dilute H₂SO₄ impregnation to improve the overall sugar and ethanol yield has been investigated. The first pretreatment step was performed under conditions of low severity (180°C, 10 min, 0.5% H₂SO₄) to optimise the amount of hydrolysed hemicellulose. In the second step the washed solid material from the first pretreatment step was impregnated again with H₂SO₄ and pretreated under conditions of higher severity to hydrolyse a portion of the cellulose, and to make the cellulose more accessible to enzymatic attack. A wide range of conditions was used to determine the most favourable combination. The temperatures investigated were between 180°C and 220°C, the residence times were 2, 5 and 10 min and the concentrations of H₂SO₄ were 1% and 2%.

The effects of pretreatment were assessed by both enzymatic hydrolysis of the solids and with simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of the whole slurry, after the second pretreatment step. For each set of pretreatment conditions the liquid fraction was fermented to determine any inhibiting effects. The ethanol yield using the SSF configuration reached 65% of the theoretical value while the sugar yield using the SHF configuration reached 77%. Maximum yields were obtained when the second pretreatment step was performed at 200°C for 2 min with 2% H₂SO₄. This form of two-step steam pretreatment is a promising method of increasing the overall yield in the wood-to-ethanol process.

© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Steam pretreatment; H₂SO₄; Softwood; Ethanol; Enzymatic hydrolysis; SSF

1. Introduction

During the past decades, global warming from the increased amount of greenhouse gases, mainly carbon dioxide, has become a major political and scientific issue. The main cause of global warming is believed to be the carbon dioxide formed by burning fossil fuels.

By using biofuels, the net emission of carbon dioxide to the atmosphere can be reduced. Ethanol, a biofuel, which can be produced from various cellulosic materials, has been proposed as an alternative fuel. It can be manufactured from numerous natural materials containing cellulose or starch.

Softwood is an abundant feedstock in Sweden and can be used to produce fuel ethanol through, for example, enzymatic hydrolysis and fermentation [1–4]. Softwood is mainly comprised of three polymers: natural cellulose, a crystalline polymer that is associated in a matrix with the two other polymers, lignin and

* Corresponding author. Tel.: +46-46-222-8297; fax: +46-46-222-4526.

E-mail address: guido.zacchi@kat.lth.se (G. Zacchi).

hemicellulose. Because of the high lignin content, this material is very resistant to enzymatic attack. To improve the yield it is necessary to perform pretreatment prior to the enzymatic hydrolysis step.

The production cost must be competitive with that of fossil fuels for the commercial introduction of fuel ethanol. The highest costs in the conversion of biomass to ethanol are the cost of the raw material [1], and that of the enzymes. Consequently, it is very important to ensure a high degree of utilisation of all the carbohydrate components in the feedstock [5]. The overall yield has been found to be the most important parameter when evaluating the production cost of bioethanol [6].

Steam pretreatment of softwood by either H_2SO_4 or SO_2 impregnation constitutes an effective way of hydrolysing hemicellulose and softening the structure of cellulose to facilitate enzymatic attack [2,7,8]. Steam pretreatment can be evaluated with the severity correlation [9], which describes the severity of the pretreatment as a function of treatment time (minutes) and temperature ($^{\circ}\text{C}$), where $T_{\text{ref}} = 100^{\circ}\text{C}$.

$$\text{Log}(Ro) = \text{Log} \left(t \exp \left(\frac{(T - T_{\text{ref}})}{14.75} \right) \right). \quad (1)$$

When the pretreatment is performed under acidic conditions, the effect of pH can be taken into consideration by the combined severity [10] defined as

$$\text{Combined severity (CS)} = \text{Log}(Ro) - \text{pH}. \quad (2)$$

The pH can be calculated from the amount of sulphuric acid added to the material and the water content of the material. The utilisation of the severity factor and the combined severity factor for evaluation are approximate methods as they assume that a first-order reaction is taking place. However, this is not the case in steam pretreatment of wood.

During steam pretreatment, the pentoses and hexoses formed from the hydrolysed hemicellulose and cellulose may be further degraded to furfural, 5-hydroxymethylfurfural (HMF), levulinic acid and formic acid, together with other substances. Three major groups of potential inhibitors can be found in the liquid after dilute acid steam pretreatment: aliphatic acids, furan derivatives and phenolic compounds [11]. These compounds may cause inhibition in the fermentation step.

It is well known that more severe conditions during steam pretreatment will cause greater degradation of hemicellulosic sugars [1,5,12,13]. However, a high degree of severity is required to promote the enzymatic digestibility of the cellulose fibres, especially in softwood [7]. The formation of degradation products reduces the yield during the steam pretreatment step and the products may also cause inhibition in the following downstream process steps.

It is important to maximise the total sugar yield in the process and consequently it is desirable to have high yields of both glucose and hemicellulosic sugars. We have focused on hexoses, as they can be fermented by *Saccharomyces cerevisiae*, the yeast used in this study. Previous studies have shown that maximum hydrolysis of glucose and mannose is not obtained at the same pretreatment severity. Glucan demands pretreatment of higher severity than mannan to be completely hydrolysed. This suggests two-step steam pretreatment, with the first step performed at low severity to hydrolyse the hemicellulose and the second step, where the solid material from the first step is pretreated again, at higher severity. This approach can result in higher sugar yields than one-step steam pretreatment and has been proposed in the literature several times [2,7,12,14,15].

In the present study a two-step steam pretreatment process has been investigated. The conditions in the first pretreatment step were chosen to give a high recovery of hemicellulose-derived fermentable sugars in the liquid. The solid material in the slurry was thoroughly washed with water and then pretreated in the second pretreatment step. The effect of pretreatment was assessed using both separate hydrolysis and fermentation (SHF) and simultaneous saccharification and fermentation (SSF). The second pretreatment step was optimised with respect to the total ethanol yield after SSF and, for SHF, to the total yield of fermentable sugars after enzymatic hydrolysis.

2. Materials and methods

The experimental procedure employed in this study is shown schematically in Fig. 1. The softwood was impregnated with dilute H_2SO_4 and then steam pretreated. The resulting material was separated into a solid residue and a liquid. The liquid was analysed

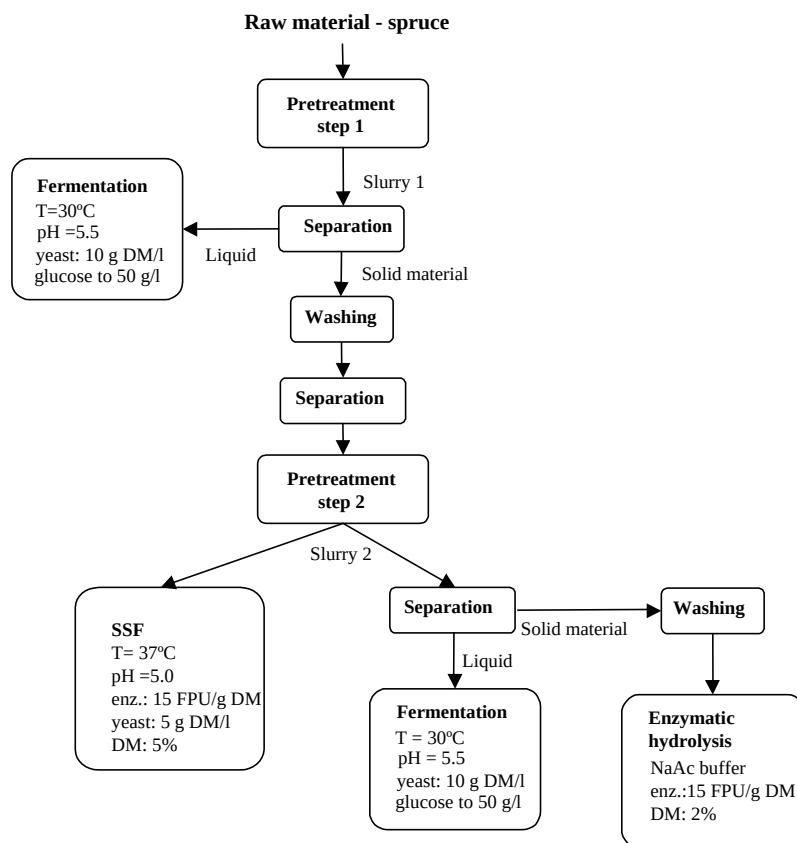


Fig. 1. The experimental set-up used for two-step steam pretreatment evaluation.

with regard to sugars and also fermented. The solid material was washed with water and then impregnated again with dilute H_2SO_4 and steam pretreated in the second pretreatment step. The resulting material was evaluated by SSF of the slurry, by enzymatic hydrolysis of the washed solid material and by fermentation of the liquid.

2.1. Raw material

Fresh softwood, *Picea abies*, free from bark, was used in this study. The sawdust was supplied by local sawmills. The composition was determined according to the Hägglund method [16] and is presented in Table 1. The raw material used for impregnation with H_2SO_4 in the first step had a dry matter (DM) content of 55.5%.

Table 1

Composition of the raw material and the material after the first pretreatment step

Composition	Raw material (% of DM)	After 1st pretreatment step (% of DM)
Glucan	49.9	53.7
Mannan	12.3	2.1
Lignin	28.7	38.4
Xylan	5.3	1.6
Galactan	2.3	0
Arabinan	1.7	0.6

2.2. Pretreatment

2.2.1. First pretreatment step

The first steam pretreatment step was optimised and performed at the Mid Sweden University in a 250-l

batch reactor located in Rundvik, Sweden [17]. The sawdust was impregnated with dilute H_2SO_4 (0.5% (w/w) based on the water content of the wood) and pretreated at 180°C for 10 min. The impregnated material had a DM content of 30%. The material was separated by centrifugation into a solid residue and a liquid. The liquid was analysed with regard to soluble sugars, and their degradation products. The composition of the solid material was determined with the Hågglund method [16]. The solid material was washed thoroughly with water to remove all soluble substances and the yield and composition of the solid material were determined [16].

2.2.2. Second pretreatment step

The second steam pretreatment step was performed at Lund University in a steam-explosion unit with a 2-l reactor [14]. The washed solid material, with a DM content of 37%, was re-impregnated with H_2SO_4 . Impregnation was performed with either 1% or 2% H_2SO_4 (w/w, based on the water content of the wood) in plastic bags overnight at room temperature. The impregnated material was steam pretreated in the second pretreatment step at various temperatures (180°C, 190°C, 200°C, 210°C, 220°C) and residence times (2, 5 and 10 min) (see Table 2). A portion of the pretreated material was separated by filtration into a solid residue and a liquid for evaluation with separate enzymatic hydrolysis and fermentation, and some was kept intact for evaluation with SSF. The liquid was analysed with respect to soluble sugars and their degradation products. The amount of insoluble solids in the pretreated material was determined.

2.3. Determination of oligosaccharides by acid hydrolysis

Acid hydrolysis of the liquid after the first pretreatment step was performed to determine the amount of oligomers. It was performed in two ways; autohydrolysis using the acetic acid present in the liquid or by the addition of H_2SO_4 . To a 2-ml sample of the liquid either 10.6 ml H_2O and 1.4 ml, 1.0 mol l^{-1} H_2SO_4 or 12 ml H_2O were added in 25-ml flasks. The flasks were autoclaved at 121°C for 4 h. After hydrolysis, $\text{Ba}(\text{OH})_2$ was added to increase the pH and to precipitate sulphate ions. The neutralised liquid was

Table 2

Experimental design of the second pretreatment step

Experiment #	Temp. (°C)	Time (min)	% H_2SO_4	CS = Log Ro-pH
1	180	5	1	2.36
2	180	10	1	2.67
3	190	2	1	2.26
4	190	5	1	2.66
5	190	10	1	2.96
6	200	2	1	2.56
7	200	5	1	2.95
8	200	10	1	3.25
9	210	2	1	2.85
10	210	5	1	3.25
11	210	10	1	3.55
12	220	2	1	3.14
13	220	5	1	3.54
14	190	5	2	2.96
15	190	10	2	3.26
16	200	2	2	2.86
17	200	5	2	3.25
18	200	10	2	3.56
19	210	2	2	3.15
20	210	5	2	3.55
21	210	10	2	3.85
22	220	2	2	3.45
23	220	5	2	3.84

filtered using 0.20- μm filters (MFS-13, Advantec MFS, Inc., USA) before the sugar content was analysed. Duplicate hydrolysis experiments were performed. During acid hydrolysis some sugar degradation may occur. This was not compensated for, as it is difficult to determine accurately. However, the degradation is negligible judging from the concentrations of HMF and furfural obtained (data not shown) and will result in a slightly conservative estimate of the overall yield.

2.4. Enzymatic hydrolysis

Enzymatic hydrolysis was used to assay the second steam pretreatment step. This was performed using a commercial cellulase mixture, Celluclast 1.5 l (65 FPU g^{-1} and 17 β -glucosidase IU g^{-1}) supplemented with the β -glucosidase preparation Novozym 188 (376 β -glucosidase IU g^{-1}), both kindly donated by Novozymes (Bagsværd, Denmark). The filter paper activity was determined according to the

procedure of Mandels [18], and β -glucosidase activity by the procedure of Berghem [19].

Enzymatic hydrolysis of the washed solid material was performed at 2% (w/w) DM to avoid end-product inhibition in the determination of the potential sugar yield. In the hydrolysis, 10 g DM, 2.32 g Celluclast and 0.52 g Novozym were immersed in 0.1 mol l⁻¹ sodium acetate buffer (pH = 4.8) to a total mass of 500 g under non-sterile conditions. The substrate was autoclaved (121°C for 20 min), but the enzyme solutions were not sterile. Hydrolysis was performed at 40°C for 96 h. Samples were withdrawn after 0, 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72 and 96 h and analysed regarding the sugar content. All hydrolysis experiments were performed in duplicate.

2.5. SSF

SSF of the slurry from the second pretreatment step was used as an alternative method to assess the steam pretreatment conditions. This was performed in 1-l fermentors (Belach AB, Stockholm, Sweden) using a total weight of 600 g, under non-sterile conditions. Nutrients were added to a final concentration of 0.5 g l⁻¹ (NH₄)₂HPO₄, 0.025 g l⁻¹ MgSO₄ · H₂O and 1 g l⁻¹ yeast extract. The substrate and the nutrients were autoclaved separately (121°C for 20 min), but the enzyme solutions were not sterile. The slurry was diluted with water to obtain a final insoluble solids concentration of 5% DM. 1.56 g Novozym 188 and 6.96 g Celluclast 1.5 l were used to give a final cellulase activity of 15 FPU g⁻¹ DM and a β -glucosidase activity of 23 IU g⁻¹ DM.

Compressed baker's yeast, *S. cerevisiae* (Jästbolaget AB, Rotebro, Sweden) was used at an initial concentration of 5 g DM l⁻¹. The pH was initially adjusted with solid Ca(OH)₂ to 4.95–5.00 and was then maintained by the addition of 10% (w/w) NaOH. Antibiotics were added to prevent infection and the formation of lactic acid. The concentrations used were 20,000 U l⁻¹ of penicillin and 20 mg l⁻¹ of streptomycin, (Sigma-Aldrich Co. Ltd, Irvine, UK). SSF was performed at 37°C for 72 h and samples were withdrawn at 0, 2, 4, 6, 8, 24, 28, 32, 48, 52, 56 and 72 h and analysed regarding ethanol, sugars and by-products. All the experiments were performed in duplicate.

2.6. Fermentation

Fermentation of the liquid was performed after the first and the second pretreatment steps to investigate the fermentability and the extent of inhibition. The pH of the liquids was adjusted to 5.5 with 20% (w/w) Ca(OH)₂. Fermentation was performed in 25-ml glass flasks with a working volume of 20 ml consisting of 18.5 ml of the liquid, 0.5 ml nutrients and 1 ml inoculum. The flasks were sealed with rubber stoppers through which hypodermic needles had been inserted for the removal of the CO₂ produced. The concentrations of fermentable sugars (glucose and mannose) were adjusted by the addition of glucose to a total concentration of 50 g l⁻¹ to obtain comparable fermentation results. The final concentration of nutrients was 0.5 g l⁻¹ (NH₄)₂HPO₄, 0.025 g l⁻¹ MgSO₄ · 7H₂O, 0.1 mol l⁻¹ NaH₂PO₄ and 1 g l⁻¹ yeast extract. A reference solution prepared from 30 g l⁻¹ glucose and 20 g l⁻¹ mannose was also fermented. *S. cerevisiae* was used at a concentration of 10 g DM l⁻¹. The flasks were incubated at 30°C for 24 h, and stirred with a magnetic stirrer. Samples were withdrawn at 0, 2, 4, 6, 8 and 24 h and analysed with regard to ethanol, sugars and sugar degradation products. Fermentation experiments were performed in duplicate.

2.7. Analysis

The liquids after the pretreatment steps and all samples from the acid and the enzymatic hydrolysis, fermentation and SSF were analysed with HPLC (Shimadzu LC-10AT, Kyoto, Japan) with a refractive index detector (Shimadzu, Kyoto, Japan). Glucose, mannose, arabinose, galactose and xylose were separated using an Aminex HPX-87P column (Bio-Rad, Hercules, USA) at 80°C, using water as eluent, at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹. Cellobiose, glucose, arabinose, lactic acid, glycerol, acetic acid, ethanol, HMF and furfural were separated on an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad, Hercules, USA) at 65°C using 5 mmol l⁻¹ H₂SO₄ as the eluent, at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹. All samples were filtered through a 0.20- μ m filter before HPLC analysis. Samples from the enzymatic hydrolysis and the liquid phases after the pretreatment steps were analysed on the HPX-87P column. However, because of interference between ethanol and mannose on that column, samples from

SSF and fermentation were analysed on the HPX-87H column. The analysis of glucose in the liquid phase after pretreatment was also carried out on the HPX-87H column.

3. Results and discussion

3.1. First pretreatment step

The composition of the dry raw material is presented in Table 1. Sixty-two percent of the dry raw material consisted of glucan and mannan that could be used for ethanol production.

Ninety-three percent of the glucan was recovered after the first pretreatment step. Eighty-one percent was still present in the solid, whereas 12% was hydrolysed and present in the liquid as either oligomeric or monomeric sugars. Of the solubilised glucan, 87% was recovered as monomeric sugar (glucose) and the rest, 13%, was recovered as oligomeric sugar. The yield of mannan was even higher than that of glucan. One hundred percent of the mannan was recovered after the first pretreatment step. Twelve percent was still present in the solid and the remaining part, 88%, was solubilised and present in the liquid. The mannan present in the liquid consisted of 88% monomeric sugar (mannose) and 12% oligomeric sugars (Table 3). The yields of solubilised glucose and mannose as monomeric and oligomeric sugars were about the same as those obtained by Nguyen et al. at 190°C, 3 min and 0.7% H₂SO₄ and by Kim et al. at 185°C, 4 min and 0.66% H₂SO₄ [13,20]. However, Kim et al. [20] observed a higher glucose yield. The rather low recovery of glucose (93%) in the present study may be due to the use of a large pretreatment reactor (250 l) and separation unit. Material may be lost in the equipment when only one batch is treated. The missing 7% could not be accounted for by the degradation of sugars as HMF was present only in very small amounts. Autohydrolysis and acid hydrolysis with the addition of H₂SO₄ to the liquid after the first pretreatment step yielded the same results.

In the liquid, only small amounts of furfural and HMF were present, at concentrations of 0.7 and 1.4 g l⁻¹, respectively. Acetic acid was present at a concentration of 3.7 g l⁻¹. The total amounts of these substances were 0.6 g HMF per 100 g dry raw

material, 0.3 g furfural per 100 g dry raw material and 1.6 g acetic acid per 100 g dry raw material. The amount of acetic acid corresponds well with the degree of acetyl substitution in galactoglucomannan.

The concentrations of sugars and other substances in the liquid after pretreatment depend on the amount of liquid obtained during pretreatment by the condensation of steam. This will depend on the residence time and the temperature used during the process. However, not only the concentration of by-products is of importance, but also the yield based on the amount of raw material, as a large amount of these substances may lead to a lower ethanol yield. Kim et al. showed that pretreatment at 185°C for 4 min with 0.66% H₂SO₄ resulted in 2.5 g HMF per 100 g dry raw material [20], which is slightly more than that obtained in this study.

The yield after fermentation of the liquid from the first pretreatment step was 94% of the theoretical fermentation yield (data not shown), which was the same as for the reference solution. This indicates that no inhibition occurred, which was expected, as the possible inhibitors were present at very low concentrations, due to the low degree of severity used in the pretreatment. The productivity of ethanol after 4 h of fermentation was about half of that of the reference solution, but after 24 h about the same yield was reached for both reference solution and the liquid from the first pretreatment step.

3.2. Second pretreatment step

The second pretreatment step was performed using the washed solid material from the first pretreatment step. This material contained mainly glucan (53.7%) and lignin (38.4%). Only small amounts of some of the hemicellulosic sugars were present: mannan (2.1%) arabinan (0.6%) and xylan (1.6%) (Table 1). The investigation covered a combined severity range of CS = 2.26–3.85 (Table 2). The second pretreatment step was evaluated using both SSF and enzymatic hydrolysis to determine the ethanol yield and the glucose yield, respectively.

The total yield of mannose and glucose in the second pretreatment step, expressed as the sum of monomers and oligomers in the liquid and polymers in the solid, varied between 20 and 68 g/100 g of the solid material from the first pretreatment step. This corresponds to a yield of 33–100% based on the

Table 3

Recovery of glucose and mannose in the liquid and solid after the first pretreatment step

Sugar recovery	(%) of theoretical yield	Present study	[2]	[13]	[20]
Glucose	Total	93	—	—	103
	Solid	81	—	—	91
	Liquid	12	23	16	12
	As oligomers (%)	13	5	12	9
	As monomers (%)	87	95	88	91
Mannose	Total	100	—	—	96
	Solid	12	—	—	10
	Liquid	88	63	87	86
	As oligomers (%)	12	11	21	14
	As monomers (%)	88	89	79	86

Present study—180°C, 10 min, 0.5% H₂SO₄. [2]—212°C, 105 s, 0.35% H₂SO₄. [13]—190°C, 3 min, 0.7% H₂SO₄. [20]—185°C, 4 min, 0.66% H₂SO₄.

theoretical amount in the solid material after the first pretreatment step. The yields during the second pretreatment step are based on the assumption that the lignin is not degraded during steam pretreatment. This assumption was employed to estimate the amount of carbohydrates in the solid material after the second pretreatment step.

During the pretreatment some carbohydrates may form pseudo-lignin causing the amount of available carbohydrates to be lower than assumed. On the other hand acid soluble lignin may be found in the liquid leaving the solid material with less lignin than predicted. This will influence the yields of the second pretreatment step and the enzymatic hydrolysis step, especially at high severity. However, the overall sugar yield and the yields calculated, as g per 100 g raw material for the individual steps, will not be affected.

Most of the mannan in the solid material after the first pretreatment step was obtained as monomeric sugar in the liquid after the second pretreatment step. The amount of glucan that was hydrolysed and recovered in the liquid as glucose varied between 14% and 77% of the theoretical (4–22 g per 100 g of the solid material from the first step) (Fig. 2). The amount of glucan hydrolysed to glucose in the second pretreatment step reached a maximum at a combined severity of CS = 3.1–3.2. At higher degrees of severity the glucose was further degraded to HMF and probably levulinic acid. Most of the remaining mannan from the first step was hydrolysed to mannose during the second pretreatment step. However, at high severity,

a low recovery of mannose was observed in the second step and mannose was probably degraded to HMF and levulinic acid.

At low severity, the mass balance, taking into account glucan, mannan, their monomers, by-products and lignin, was close to 100%. However, at high severity, less of the material could be accounted for after the pretreatment. For the highest degree of severity only 63% of the material was accounted for after the pretreatment. Handling losses cannot justify these losses of material. Other “losses” may be accounted for by by-products not analysed, gases, etc., and is a subject for further studies. Handling losses were determined by thoroughly washing the equipment with water and measuring the amount of solid material not recovered in the pretreated slurry. The average loss of solid material in the second pretreatment step was estimated to be 2.4% of the original dry material by weight.

The liquid after the second pretreatment step contained many by-products. At low severity the concentrations of acetic acid, HMF and furfural were very low, less than 2 g l⁻¹ (Fig. 3). The HMF concentration reached a maximum of 3.9 g l⁻¹ following pretreatment at moderate severity. After pretreatment at higher severity the amount of HMF was lower. This is probably due to further degradation of HMF. The furfural concentration never exceeded 1.5 g l⁻¹, which was expected as almost all the pentoses were recovered as monomeric sugars in the liquid from the first pretreatment step. Several other substances were seen as unidentified peaks in the chromatograms but

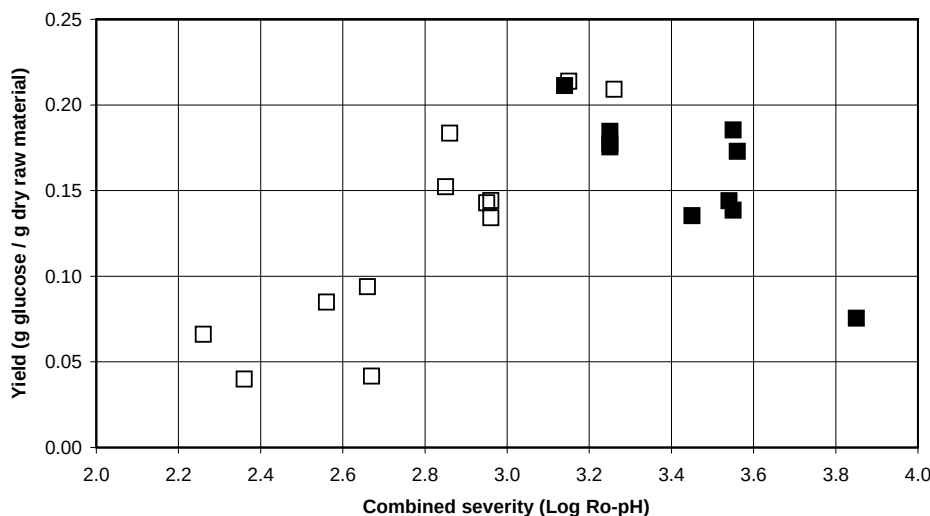


Fig. 2. The yield of monomeric glucose in the liquid after the second pretreatment step as a function of the combined severity. (□) Fermentable samples and (■) Non-fermentable samples.

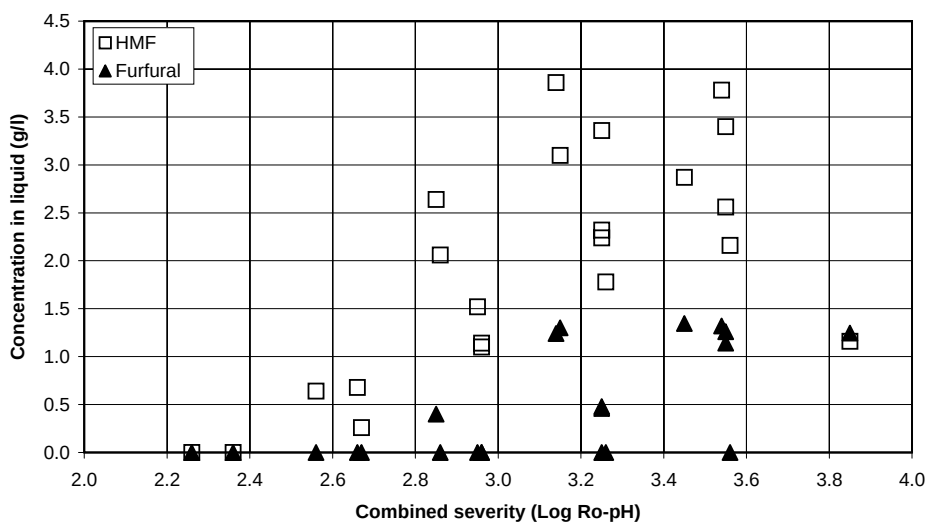


Fig. 3. Concentration of potential inhibitors in the liquid after the second pretreatment step as a function of the combined severity of the pretreatment.

not quantified. These substances are derived from the degradation of sugar and lignin. At least one unidentified peak made a major contribution and increased in size (amount) with the severity of the pretreatment and interfered with the acetic acid peak. This was probably levulinic acid. This assumption is supported

by the fact that the amount of HMF increased up to CS = 3.2 followed by a decrease and it is known that levulinic acid is obtained as a reaction product from the degradation of HMF.

Fermentation of the liquid derived from pretreatment at low severity showed good fermentability and

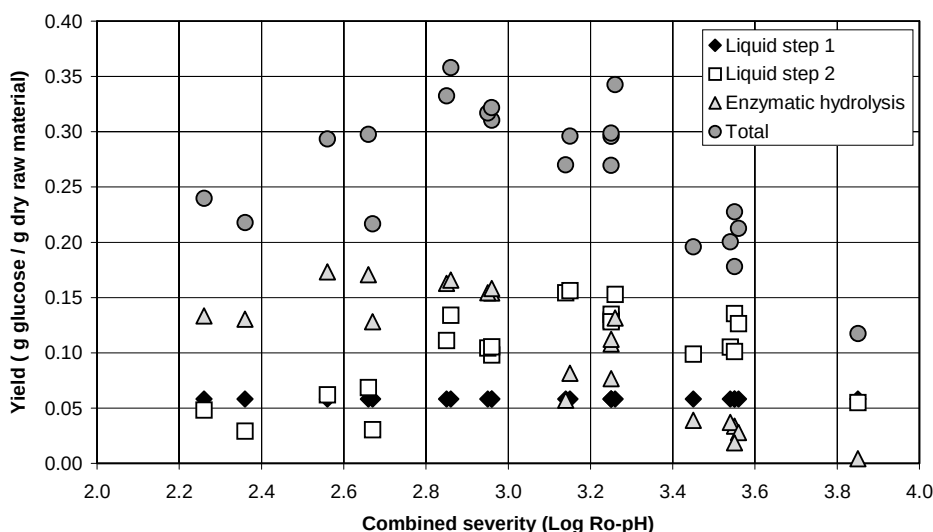


Fig. 4. The yield of glucose formed in each step as a function of the combined severity of the second pretreatment step.

no apparent inhibitory effects. However, when higher combined severity was used, (above $CS = 3.2$) the fermentation was poor (Fig. 2). The concentration of HMF, and other possibly inhibiting substances increased markedly at high severity. When good fermentability was obtained the final ethanol yield was as high as for the reference solution, i.e. 83–100% of the theoretical yield. The productivity during the first 4 h of the fermentation was about half of that of the reference solution, which was about 5 g ethanol l^{-1} h.

3.3. Enzymatic hydrolysis

For enzymatic hydrolysis to be successful the cellulose fibres must be accessible to the enzymes. More severe pretreatment results in a material that is more accessible to enzymatic attack. However, if the material is treated under very severe conditions much of the cellulose will be hydrolysed already during the second pretreatment step. When treated under very severe conditions sugar degradation during pretreatment causes a loss of substrate as well as undesirable production of inhibiting substances.

The solid material obtained after the second pretreatment step was washed and hydrolysed enzymatically to assess the effects of pretreatment. The yield was calculated assuming that no lignin was degraded during pretreatment. The solid material was assumed

to consist of lignin and cellulose only. As discussed earlier this assumption will not affect the overall yield, but may influence the yield of the enzymatic hydrolysis step. The sugar yields during the enzymatic hydrolysis step ranged from 6 to 99 g glucose per 100 g of the glucan in the material from the second pretreatment step, depending on the pretreatment conditions. No mannan was found in the material to be hydrolysed following the second pretreatment step.

Enzymatic hydrolysis gave the highest yields for pretreatment at a combined severity of $CS = 2.56$, corresponding to pretreatment conditions of 200°C, 2 min and 1% H_2SO_4 . This resulted in 17 g glucose per 100 g dry raw material (Fig. 4). Materials pretreated at a combined severity higher than 3.4 in the second pretreatment step resulted in very poor enzymatic hydrolysis, if any.

The highest overall yields of fermentable sugars from the two pretreatment steps, as well as the enzymatic hydrolysis step, were obtained when the combined severity in the second pretreatment step was around 2.8–3.0. The overall yield of glucose and mannose was about 75% and was obtained under several different pretreatment conditions with varying temperatures, residence times and H_2SO_4 concentrations. From 1 g of dry raw material 0.48 g of fermentable sugars were formed. The maximum yield of sugar, 77%, was obtained with second step

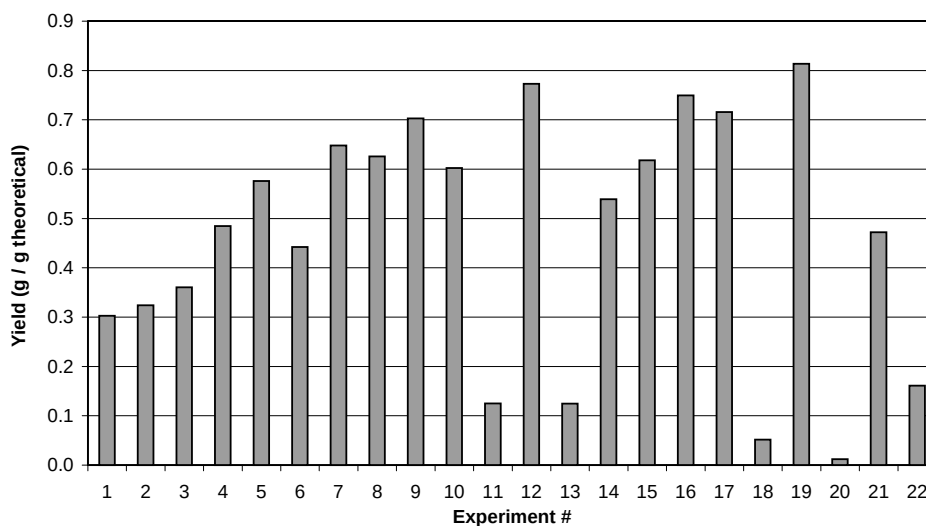


Fig. 5. The yield of ethanol in SSF for different conditions in the second pretreatment step. See Table 2 for details of experiments.

pretreatment conditions of 200°C, 2 min and a H₂SO₄ concentration of 2%.

The maximum yield of sugar obtained in this study (77%) is slightly lower than that obtained by Nguyen et al. (82%) using two-step steam pretreatment followed by enzymatic hydrolysis [7]. However, in our study a much lower cellulase activity was used; 15 FPU g⁻¹ DM (25 FPU g⁻¹ cellulose) compared with the 60 FPU g⁻¹ cellulose used by Nguyen et al. About the same maximum yield (80%) was obtained in a previous study on two-step steam pretreatment with SO₂ impregnation in both steps, using the same raw material and evaluation methods as in the present study [15].

3.4. SSF

The outcome of SSF depends on the hydrolysis of the cellulose as well as the fermentation of sugar to ethanol. A material pretreated at low severity in the second pretreatment step will result in cellulose fibres that are not very accessible to enzymatic attack. However, if the material is treated at high severity inhibitors may form, which affect the fermentation and inhibit the yeast.

The yield of ethanol after SSF of the slurry from the second pretreatment step was calculated assuming that no lignin degradation occurred in the

pretreatment. Yields after SSF reached as high as 80% of the theoretical (Fig. 5). However, the overall ethanol yield, i.e. including both pretreatment steps and SSF did not result in yields higher than 65%. The highest yield was obtained at a combined severity of CS = 2.86 (200°C, 2 min and a H₂SO₄ concentration of 2%), which is the same as for the evaluation with enzymatic hydrolysis.

The highest yields of ethanol during SSF were obtained for experiments 12, 16 and 19, corresponding to a combined severity between 2.86 and 3.15 (Table 2). However, several experiments in the same severity range, but under different pretreatment conditions, did not result in as high ethanol yields. These results indicate that the concept of the severity factor and the combined severity are unreliable methods for the evaluation of SSF. They may only be used for rough estimates. The ethanol yield in SSF is mainly affected by the concentration of H₂SO₄ and the temperature during the second pretreatment step.

3.5. Overall yields

The formation of glucose and mannose, expressed as g/g theoretical amount in the dry raw material, occurred in different steps of the process. Mannose was mainly formed during the first pretreatment step with

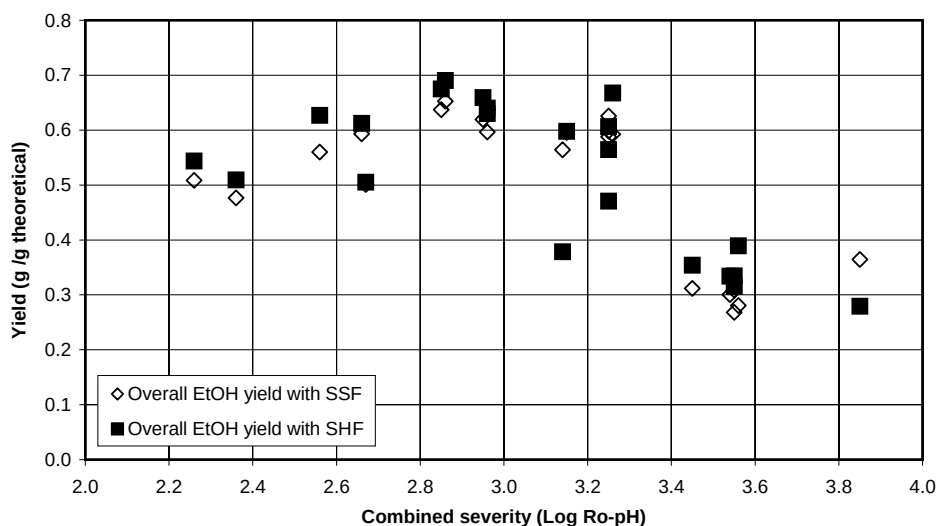


Fig. 6. The overall yields of ethanol in SSF and SHF as a function of the combined severity in the second pretreatment step. In SHF the fermentation yield after enzymatic hydrolysis was assumed to be 90%.

a yield of 88% of the theoretical amount. Oligomers constituted 12% of the liberated mannan fraction. In the second step 2–12% of the theoretical amount of mannan was obtained, depending on the pretreatment conditions. Thus, the total yield of mannose was 90–100% of the theoretical.

Glucose was mainly obtained in the second pretreatment step and during enzymatic hydrolysis. A maximum of 30% of the theoretical amount of glucose was obtained in the second pretreatment step and another 34% in the enzymatic hydrolysis. These maxima did not occur under the same pretreatment conditions; therefore, the maximum combined glucose yield was only 60%.

Fig. 6 shows a comparison between SSF and SHF, with an assumed yield from fermentation after the enzymatic hydrolysis of 90%, which was the yield obtained in the successful fermentation experiments. The material pretreated in two steps followed by SHF gave a higher ethanol yield than the SSF configuration. Previous results from one-step steam pretreatment showed that SSF gave higher ethanol yields. However, the two-step steam pretreatment with SO_2 impregnation also resulted in higher overall yields with SHF than SSF, [15].

Stenberg et al. have shown that, when using one-step steam pretreatment, the overall ethanol yield

with SSF was 67% while the overall hexose yield in SHF was 75%, [14,21]. In the present study two-step steam pretreatment with impregnation of H_2SO_4 in both steps resulted in an overall ethanol yield with SSF of 65% and an overall yield of glucose and mannose in SHF of 77%.

One reason for the lower yield in SSF than SHF when using two-step steam pretreatment could be the use of antibiotics in SSF to prevent random production of lactic acid and to give comparable results. The same conclusion, i.e. the SHF results in a higher overall yield than SSF, was drawn in a previous study of two-step steam pretreatment with SO_2 impregnation [15]. Stenberg et al. have shown that the use of antibiotics in SSF may cause a decrease in the ethanol yield [22].

4. Conclusions

The ethanol yield after two-step steam pretreatment followed by SSF reached 65% of the theoretical yield. However, when using SHF the yield was increased to 69%, when the fermentation yield after enzymatic hydrolysis was assumed to be 90%, which was the yield obtained in the fermentation experiments. The SHF configuration results in higher yields than the SSF configuration. This was not the case in one-step

steam pretreatment, where SSF showed the most promising results.

The severity factor and the combined severity are not accurate measures in the evaluation of steam pretreatment, and should only be used for rough estimates. The yield in SSF was better correlated with the temperature and the concentration of H_2SO_4 than with the combined severity.

The two-step steam pretreatment process with dilute H_2SO_4 impregnation shows attractive advantages, such as high ethanol yield, better utilisation of the raw material and lower consumption of enzymes. However, further evaluation is required to determine whether these advantages outweigh the disadvantages of adding another steam pretreatment step to the process.

Acknowledgements

The Swedish National Energy Administration is gratefully acknowledged for its financial support. We are grateful to Dr Robert Eklund at the Mid Sweden University, Örnsköldsvik, Sweden for providing the raw material and performing the first pretreatment step.

References

- [1] Boussaid A, Robinson J, Cai Y, Gregg DJ, Saddler JN. Fermentability of the hemicellulose-derived sugars from steam-exploded softwood (Douglas fir). *Biotechnology and Bioengineering* 1999;64(3):284–9.
- [2] Nguyen QA, Tucker MP, Boynton BL, Keller FA, Schell DJ. Dilute acid pretreatment of softwoods. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1998;70–72:77–87.
- [3] Tengborg C, Stenberg K, Galbe M, Zacchi G, Larsson S, Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Comparison of SO_2 and H_2SO_4 impregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1998;70–72:3–15.
- [4] Schell DJ, Ruth MF, Tucker MP. Modelling the enzymatic hydrolysis of dilute-acid pretreated Douglas fir. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1999;77–79:67–81.
- [5] Wu MM, Chang K, Gregg DJ, Boussaid A, Beatson RP, Saddler JN. Optimization of steam explosion to enhance hemicellulose recovery and enzymatic hydrolysis of cellulose in softwoods. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1999;77–79:47–54.
- [6] von Sivers M, Zacchi G. Ethanol from lignocellulosics: a review of the economy. *Bioresource Technology* 1996;56 (2&3):131–40.
- [7] Nguyen QA, Tucker MP, Keller FA, Eddy FP. Two-stage dilute-acid pretreatment of softwoods. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2000;84–86:561–76.
- [8] Saddler JN, Ramos LP, Breuil C. Steam pretreatment of lignocellulosic residues. *Biotechnology and Agriculture Series* 1993;9:73–91.
- [9] Overend RP, Chornet E. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A* 1987;321(1561):523–36.
- [10] Chum HL, Johnson DK, Black SK, Overend RP. Pretreatment-catalyst effects and the combined severity parameter. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1990; 24–25:1–14.
- [11] Tengborg C, Galbe M, Zacchi G. Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. *Enzyme and Microbial Technology* 2001;28:835–44.
- [12] Heitz M, Capek-Ménard E, Koeberle PG, Gagné J, Chornet E, Overend RP, Taylor JD, Yu E. Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scaled: optimization of steam pretreatment conditions using the STAKE II technology. *Bioresource Technology* 1991;35(1):23–32.
- [13] Nguyen QA, Tucker MP, Keller FA, Beaty DA, Connors KM, Eddy FP. Dilute acid hydrolysis of softwoods. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1999;77–79: 133–42.
- [14] Stenberg K, Tengborg C, Galbe M, Zacchi G. Optimisation of steam pretreatment of SO_2 -impregnated mixed softwoods for ethanol production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 1998;71:299–308.
- [15] Söderström J, Pilcher L, Galbe M, Zacchi G. Two-step steam pretreatment of softwood with SO_2 impregnation for ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2002; 98–100:5–21.
- [16] Hågglund E. The determination of lignin. In: *Chemistry of wood*. New York: Academic Press, 1951.
- [17] Eklund R, Petterson PO. Dilute-acid hydrolysis of softwood forest residue. 2000. ISAF XIII.
- [18] Mandels A, Andreotti R, Roche C. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* 1976;6:21–33.
- [19] Berghem LER, Petterson LG. The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Isolation and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma viride*. *European Journal of Biochemistry* 1974;46(2):295–305.
- [20] Kim KH, Tucker MP, Keller AA, Nguyen QA. Continuous countercurrent extraction of hemicellulose from pretreated wood residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2001;91–93:253–67.
- [21] Stenberg K, Bollók M, Réczey K, Galbe M, Zacchi G. The effect of substrate and cellulase concentration in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of steam-pretreated softwood for ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering* 2000;68(2):204–10.
- [22] Stenberg K, Galbe M, Zacchi G. The influence of lactic acid formation on the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of softwood to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology* 2000;26(1):71–9.