

  
**Industria y Comercio**  
**SUPERINTENDENCIA**

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

SOLICITUD

**PATENTE DE INVENCION**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-157243- -00000-0000

Fecha: 2014-07-21 14:52:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 119

21. EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

54. TITULO \_\_\_\_\_

UN PASO DE PREHIDRÓLISIS MEJORADO QUE INVOLUCRA VACÍO

51.CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL. \_\_\_\_\_

C12P 19/02 (2006.01); D21C 1/10 (2006.01); D21C 9/00 (2006.01)

71. SOLICITANTE BETA RENEWABLES S.P.A.

DOMICILIO. TORTONA (Alessandria) (ITALIA)

74. APODERADO Jesús M. Méndez

22. BOGOTÁ D.C. Julio 21 de 2014

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES  
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

|                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                               |                                                                                                                                   |                                                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                                                                                                                                                                  | TIPO DE SOLICITUD                                                                                                                             | <input checked="" type="checkbox"/> Patente de invención<br><input checked="" type="checkbox"/> Capítulo I                        | <input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad<br><input type="checkbox"/> Capítulo II |
| 2                                                                                                                                                                  | DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)                                                                                                        |                                                                                                                                   |                                                                                                |
| Solicitud Internacional No.                                                                                                                                        |                                                                                                                                               | PCT/EP2012/076419                                                                                                                 | Fecha 20.12.2012                                                                               |
| Publicación Internacional No.                                                                                                                                      |                                                                                                                                               | WO2013/092881                                                                                                                     | Fecha 27.06.2013                                                                               |
| 3                                                                                                                                                                  | TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)                                                                                    |                                                                                                                                   |                                                                                                |
| UN PASO DE PREHIDRÓLISIS MEJORADO QUE INVOLUCRA VACÍO                                                                                                              |                                                                                                                                               |                                                                                                                                   |                                                                                                |
| 4                                                                                                                                                                  | CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)                                                                                                             |                                                                                                                                   |                                                                                                |
| C12P 19/02 (2006.01); D21C 1/10 (2006.01); D21C 9/00 (2006.01)                                                                                                     |                                                                                                                                               |                                                                                                                                   |                                                                                                |
| 5                                                                                                                                                                  | SOLICITANTE (S) <input type="checkbox"/> Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria |                                                                                                                                   |                                                                                                |
| APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL                                                                                                                                           |                                                                                                                                               | NOMBRE<br>BETA RENEWABLES S.P.A.                                                                                                  | IDENTIFICACIÓN<br>TIPO                                                                         |
| 6                                                                                                                                                                  | DATOS DEL SOLICITANTE                                                                                                                         |                                                                                                                                   |                                                                                                |
| DIRECCIÓN: Strada Ribrocca 11 I-15057<br>TORTONA (Alessandria) (ITALIA)<br>CIUDAD: (Alessandria) (ITALIA)<br><br>DEPARTAMENTO/ESTADO<br>PAÍS DE RESIDENCIA: ITALIA |                                                                                                                                               | No. TELÉFONO - 6235828<br><br>CORREO ELECTRÓNICO –<br>notificaciones@wolfmendez.com<br>NACIONALIDAD O<br>LUGAR DE<br>CONSTITUCIÓN |                                                                                                |
| 7                                                                                                                                                                  | INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria                                                              |                                                                                                                                   |                                                                                                |
| APELLIDOS                                                                                                                                                          |                                                                                                                                               | NOMBRES                                                                                                                           | NACIONALIDAD                                                                                   |
| 1. SISSON,                                                                                                                                                         |                                                                                                                                               | Edwin Andrew                                                                                                                      | Americano                                                                                      |
| 2. FERRERO,                                                                                                                                                        |                                                                                                                                               | Simone                                                                                                                            | Italiano                                                                                       |
| 3. TORRE,                                                                                                                                                          |                                                                                                                                               | Paolo                                                                                                                             | Italiano                                                                                       |
| 4. OTTONELLO,                                                                                                                                                      |                                                                                                                                               | Piero                                                                                                                             | Italiano                                                                                       |
| 5. CHERCHI,                                                                                                                                                        |                                                                                                                                               | Francesco                                                                                                                         | Italiano                                                                                       |
| 6. GRASSANO,                                                                                                                                                       |                                                                                                                                               | Giuseppe                                                                                                                          | Italiano                                                                                       |
| 7. ORIANI,                                                                                                                                                         |                                                                                                                                               | Luis                                                                                                                              | Italiano                                                                                       |
| 8. GIORDANO,                                                                                                                                                       |                                                                                                                                               | Dario                                                                                                                             | Italiano                                                                                       |
| DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO: notificaciones@wolfmendez.com                                                                                                     |                                                                                                                                               |                                                                                                                                   |                                                                                                |
| 8                                                                                                                                                                  | DATOS INVENTOR (ES)                                                                                                                           |                                                                                                                                   |                                                                                                |
| PAÍS RESIDENCIA                                                                                                                                                    | DEPARTAMENTO/ESTADO                                                                                                                           | CIUDAD                                                                                                                            | DIRECCIÓN                                                                                      |
| 1. Estados Unidos                                                                                                                                                  |                                                                                                                                               | Ohio                                                                                                                              | 1. 2845 Woodhaven Drive Medina, Ohio 44256 (US)                                                |
| 2. Italia                                                                                                                                                          |                                                                                                                                               | Alessandria                                                                                                                       | 2. Via Emilia 26 I-15057 TORTONA (Alessandria) (IT)                                            |
| 3. Italia                                                                                                                                                          |                                                                                                                                               | Alessandria                                                                                                                       | 3. Via Terrarossa 37 I-16011 ARENZANO (Genova) (IT)                                            |
| 4. Italia                                                                                                                                                          |                                                                                                                                               | Alessandria                                                                                                                       | 4. Via Teodoro II di Monferrato 22/8 I-16156 Genova (IT)                                       |
| 5. Italia                                                                                                                                                          |                                                                                                                                               | Alessandria                                                                                                                       | 5. Via della Ferriera 37 I-15067 NOVI LIGURE (Alessandria) (IT)                                |

|           |  |             |                                                                    |
|-----------|--|-------------|--------------------------------------------------------------------|
| 6. Italia |  | Alessandria | 6. Via Grassano 38 I-15122 SAN GIULIANO VECCHIO (Alessandria) (IT) |
| 7. Italia |  | Alessandria | 7. Via Vittorio Alfieri 7 I-15057 TORTONA (Alessandria) (IT)       |
| 8. Italia |  | Alessandria | 8. Strada per Villaromagnano 23 I-15057 TORTONA (Alessandria) (IT) |

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.

9

☐ REPRESENTANTE LEGAL

☒ APODERADO

|                 |          |                             |
|-----------------|----------|-----------------------------|
| APELLIDOS       | NOMBRES  | IDENTIFICACIÓN              |
| Méndez Bermúdez | Jesús M. | C.C. 13.491.525 T.P. 99.678 |

|           |                        |                                              |                               |
|-----------|------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------|
| DIRECCIÓN | Calle 83 A No. 23 - 90 | No. TELÉFONO                                 | 6235828                       |
| CIUDAD    | Bogotá D.C.            | CORREO ELECTRÓNICO                           | notificaciones@wolfmendez.com |
| PAÍS      | Colombia               | No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL | -----                         |

10

DECLARACIONES DE PRIORIDAD

☒ SI

☐ NO

|                     |             |               |                         |
|---------------------|-------------|---------------|-------------------------|
| (33) PAÍS DE ORIGEN | CÓDIGO PAÍS | (31) NÚMERO   | (32) FECHA (AAAA/MM/DD) |
| 1. Estados Unidos   | US          | 61/578,281    | 2011/12/21              |
| 2. Italia           | IT          | TO2012A000012 | 2012/01/11              |
| 3. Estados Unidos   | US          | 61/672,956    | 2012/07/18              |
| 4. Estados Unidos   | US          | 61/736,639    | 2012/12/13              |

11

DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

*Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.*

☐ SI

☒ NO

**Nota:** En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12

DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

*Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.*

☐ SI

☒ NO

**Nota:** En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13

REDUCCIÓN DE TASAS

*Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.*

☐ SI

☒ NO

**Nota:** En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas

☐

Universidades públicas o privadas

☐

Entidades sin ánimo de lucro

☐

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

14

AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA

☒ SI

☐ NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

15

COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO

Nº

Fecha

16

FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL

Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)

PI02-F06 vr4 (2012-04-19)

Jesús M. Méndez Bermúdez

17 ANEXOS

Documentación Técnica  
Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción

2. ☒ Reivindicaciones

3. ☒ Dibujos y/o figuras

4. ☒ Resumen.

5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.

6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.

7. ☐ Arte final 12 x 12.

8. ☐ Anexo formato digital.
- N° de folios:

N° Reivindicaciones:

N° folios:

Documentación Jurídica

9. ☒ Poderes, si fuera el caso.

10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.

11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.

12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.

13. Reducción de tasas

Micro, pequeñas o medianas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.

☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.

Universidades públicas o privadas

☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación

Entidades sin ánimo de lucro

☐ Copia de registro vigente en Cámara de Comercio.

☐ Hoja de información complementaria.

☐ Otros, especificar

14. ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.

16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.

17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.



|                                                                       |                        |                                           |                               |                                                          |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------|
| 1                                                                     | (12) TIPO DE SOLICITUD |                                           | NUMERO DE RADICACIÓN          |                                                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> Patente de invención              |                        | FECHA DE PRESENTACIÓN<br>Julio 21 de 2014 |                               |                                                          |
| <input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad                |                        |                                           |                               |                                                          |
| 4                                                                     | (71) SOLICITANTE (S)   |                                           |                               |                                                          |
| APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL                                              |                        | NOMBRE                                    | IDENTIFICACIÓN                | TIPO                                                     |
|                                                                       |                        | BETA RENEWABLES S.P.A.                    |                               |                                                          |
| 5                                                                     | DATOS DEL SOLICITANTE  |                                           |                               |                                                          |
| PAÍS DE RESIDENCIA                                                    |                        | DEPARTAMENTO/ESTADO                       | CIUDAD                        | DIRECCIÓN                                                |
| 2. Italia                                                             |                        |                                           | Alessandria                   | Strada Ribrocca 11 I-15057<br>TORTONA (Alessandria) (IT) |
| TELÉFONO                                                              |                        | FAX                                       | E-MAIL                        | NACIONALIDAD                                             |
| 2.6235828                                                             |                        | 6235828 Ext. 123                          | notificaciones@wolfmendez.com | Italiano                                                 |
| 6                                                                     | (72) INVENTOR (ES)     |                                           |                               |                                                          |
| APELLIDOS                                                             |                        | NOMBRE                                    | NACIONALIDAD                  |                                                          |
| 1. SISSON,                                                            |                        | Edwin Andrew                              | Americano                     |                                                          |
| 2. FERRERO,                                                           |                        | Simone                                    | Italiano                      |                                                          |
| 3. TORRE,                                                             |                        | Paolo                                     | Italiano                      |                                                          |
| 4. OTTONELLO,                                                         |                        | Piero                                     | Italiano                      |                                                          |
| 5. CHERCHI,                                                           |                        | Francesco                                 | Italiano                      |                                                          |
| 6. GRASSANO,                                                          |                        | Giuseppe                                  | Italiano                      |                                                          |
| 7. ORIANI,                                                            |                        | Luis                                      | Italiano                      |                                                          |
| 8. GIORDANO,                                                          |                        | Dario                                     | Italiano                      |                                                          |
| 7                                                                     | DATOS INVENTOR (ES)    |                                           |                               |                                                          |
| DIRECCIÓN                                                             |                        | CIUDAD                                    | DEPARTAMENTO/ESTADO           | PAÍS RESIDENCIA                                          |
| 1. 2845 Woodhaven Drive Medina, Ohio<br>44256 (US)                    |                        | Ohio                                      |                               | 1. Estados Unidos                                        |
| 2. Via Emilia 26 I-15057 TORTONA<br>(Alessandria) (IT)                |                        | Alessandria                               |                               | 2. Italia                                                |
| 3. Via Terrarossa 37 I-16011 ARENZANO<br>(Genova) (IT)                |                        | Alessandria                               |                               | 3. Italia                                                |
| 4. Via Teodoro II di Monferrato 22/8 I-<br>16156 Genova (IT)          |                        | Alessandria                               |                               | 4. Italia                                                |
| 5. Via della Ferriera 37 I-15067 NOVI<br>LIGURE (Alessandria) (IT)    |                        | Alessandria                               |                               | 5. Italia                                                |
| 6. Via Grassano 38 I-15122 SAN<br>GIULIANO VECCHIO (Alessandria) (IT) |                        | Alessandria                               |                               | 6. Italia                                                |

|                                                                       |                                 |             |               |                         |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------|---------------|-------------------------|
| 7. Via Vittorio Alfieri 7 I-15057 TORTONA<br>(Alessandria) (IT)       |                                 | Alessandria |               | 7. Italia               |
| 8. Strada per Villaromagnano 23 I-15057<br>TORTONA (Alessandria) (IT) |                                 | Alessandria |               | 8. Italia               |
| 9                                                                     | (30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD |             |               |                         |
| (33) PAÍS DE ORIGEN                                                   |                                 | CÓDIGO PAÍS | (31) NÚMERO   | (32) FECHA (AAAA/MM/DD) |
| 1. Estados Unidos                                                     |                                 | US          | 61/578,281    | 2011/12/21              |
| 2. Italia                                                             |                                 | IT          | TO2012A000012 | 2012/01/11              |
| 3. Estados Unidos                                                     |                                 | US          | 61/672,956    | 2012/07/18              |
| 4. Estados Unidos                                                     |                                 | US          | 61/736,639    | 2012/12/13              |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |                                                                                                       |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  <b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |  | SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO<br>DIVISION DE NUEVAS CREACIONES<br>TARJETA ARCHIVO TEMATICO |  |
| PATENTE DE INVENCION <input checked="" type="checkbox"/> PCT <input checked="" type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD <input type="checkbox"/> DISEÑO INDUSTRIAL <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |                                                                                                       |  |
| (21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: Julio 21, 2014<br>(51) Clasificación Internacional: C12P 19/02 (2006.01); D21C 1/10 (2006.01); D21C 9/00 (2006.01)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |  |                                                                                                       |  |
| (71) Solicitante (s): <b>BETA RENEWABLES S.P.A.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |                                                                                                       |  |
| (72) Inventor (es):<br>1. SISSON, Edwin Andrew<br>2. FERRERO, Simone<br>3. TORRE, Paolo<br>4. OTTONELLO, Piero<br>5. CHERCHI, Francesco<br>6. GRASSANO, Giuseppe<br>7. ORIANI, Luis<br>8. GIORDANO, Dario                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  |                                                                                                       |  |
| (74) Apoderado: JESUS M. MÉNDEZ BERMÚDEZ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |                                                                                                       |  |
| (30) Prioridad: Si (31) 1.61/578,281 32) 21/12/2011 (33) US<br>2.TO2012A000012 11/01/2011 IT<br>3. 61/672,956 18/07/2012 US<br>4. 61/736,639 13/12/2012 US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  |                                                                                                       |  |
| (85) Fecha límite inicio fase nacional: Julio 21 de 2014.<br>(86) Datos relativos a la presentación de la PCT<br>Fecha de presentación de la solicitud: (20.12.2012)<br>No. de solicitud: PCT/EP2012/076419.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  | (87) Publicación internacional:<br>Fecha: (27.06.2013)<br>No. Publicación: WO2013/092881              |  |
| (54) Título: UN PASO DE PREHIDRÓLISIS MEJORADO QUE INVOLUCRA VACÍO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |  |                                                                                                       |  |
| (57) Resumen:<br>Se describe un paso de prehidrólisis mejorado que involucra exponer una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua a condiciones de vacío, con y sin enzimas. Después de exponer la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua a condiciones de vacío, la hidrólisis enzimática se realiza en el material pretratado. El resultado es un rendimiento incrementado de glucosa y con frecuencia xilosa después de la hidrólisis enzimática, cuando se compara con una composición que no se ha expuesto a condiciones de vacío. |  |                                                                                                       |  |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                  |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|                                                                                                                                                                                                                                     | <p align="center"><b>EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN</b></p> <p> <input type="checkbox"/> Patente de Invención                <input type="checkbox"/> Patente modelo de utilidad                <input checked="" type="checkbox"/> PCT         </p>                  |  |
| (21) No. De solicitud:                                                                                                                                                                                                                                                                                               | (51) int. Cl:<br>C12P 19/02 (2006.01); D21C 1/10 (2006.01); D21C 9/00 (2006.01)                                                                                                                                                                                  |  |
| (22) Fecha de solicitud: Julio 21, 2014                                                                                                                                                                                                                                                                              | (71) Solicitante: <b>BETA RENEWABLES S.P.A.</b>                                                                                                                                                                                                                  |  |
| (30) Prioridad: Si<br><br>(31) No. Prioridad: 1. 61/578,281 (US)<br>2. TO2012A000012 (IT)<br>3. 61/672,956 (US)<br>4. 61/736,639 (US)<br><br>(32) Fecha: 1. 2011/12/21<br>2. 2012/01/11<br>3. 2012/07/18<br>4. 2012/12/13<br><br>(33) Pais: 1. Estados Unidos<br>2. Italia<br>3. Estados Unidos<br>4. Estados Unidos | (72) Interventor (es):<br>1. SISSON, Edwin Andrew<br>2. FERRERO, Simone<br>3. TORRE, Paolo<br>4. OTTONELLO, Piero<br>5. CHERCHI, Francesco<br>6. GRASSANO, Giuseppe<br>7. ORIANI, Luis<br>8. GIORDANO, Dario<br><br>(74) Apoderado (s): JESÚS M. MÉNDEZ BERMÚDEZ |  |
| (54) Título: UN PASO DE PREHIDRÓLISIS MEJORADO QUE INVOLUCRA VACÍO                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                  |  |
| <p><i>Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT</i></p>                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                  |  |
| (85) Fecha límite inicio Fase Nacional: Julio 21 de 2014.<br><br>(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud<br>PCT Fecha de presentación de la solicitud: <b>Fecha</b><br><b>(20.12.2012)</b> <b>No. de solicitud</b> <b>PCT:</b><br>PCT/EP2012/076419.                                                  | (87) Publicación internacional<br>Fecha: <b>Fecha (27.06.2013)</b><br>No. Publicación: WO2013/092881                                                                                                                                                             |  |

**Resumen:**

Se describe un paso de prehidrólisis mejorado que involucra exponer una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua a condiciones de vacío, con y sin enzimas. Después de exponer la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua a condiciones de vacío, la hidrólisis enzimática se realiza en el material pretratado. El resultado es un rendimiento incrementado de glucosa y con frecuencia xilosa después de la hidrólisis enzimática, cuando se compara con una composición que no se ha expuesto a condiciones de vacío.



|                                                                                |                                                          |                    |                          |                   |                          |
|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|
| SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO                                       |                                                          |                    |                          |                   |                          |
| PATENTE PCT                                                                    | <input checked="" type="checkbox"/>                      | MODELO DE UTILIDAD | <input type="checkbox"/> | DISEÑO INDUSTRIAL | <input type="checkbox"/> |
| SOLICITANTES, RAZON SOCIAL O APELLIDOS Y NOMBRES <b>BETA RENEWABLES S.P.A.</b> |                                                          |                    |                          |                   |                          |
| DOMICILIO                                                                      | Strada Ribocca 11 I-15057 TORTONA (Alessandria) (ITALIA) |                    |                          |                   |                          |
|                                                                                |                                                          |                    |                          |                   |                          |
|                                                                                |                                                          |                    |                          |                   |                          |
| APODERADO                                                                      | JESUS M. MÉNDEZ BERMÚDEZ                                 |                    |                          |                   |                          |
| TITULO                                                                         | UN PASO DE PREHIDRÓLISIS MEJORADO QUE INVOLUCRA VACÍO    |                    |                          |                   |                          |
|                                                                                | CLASIFICACION                                            |                    |                          |                   |                          |
| EXPEDIENTE No.                                                                 | FECHA DE SOLICITUD                                       |                    | Julio 21, 2014           | ROLLO MICROFILM   |                          |
| CERTIFICADO No.                                                                | FECHA DE CONCESION                                       |                    |                          | VIGENCIA DESDE    | HASTA                    |
| PRORROGA                                                                       |                                                          |                    |                          |                   |                          |
| TRASPASO A                                                                     |                                                          |                    |                          |                   |                          |
| INVENTOR (ES)                                                                  | SISSON, Edwin Andrew                                     |                    |                          |                   |                          |
|                                                                                | FERRERO, Simone                                          |                    |                          |                   |                          |
|                                                                                | TORRE, Paolo                                             |                    |                          |                   |                          |
|                                                                                | OTTONELLO, Piero                                         |                    |                          |                   |                          |
|                                                                                | CHERCHI, Francesco                                       |                    |                          |                   |                          |
|                                                                                | GRASSANO, Giuseppe                                       |                    |                          |                   |                          |
|                                                                                | ORIANI, Luis                                             |                    |                          |                   |                          |
|                                                                                | GIORDANO, Dario                                          |                    |                          |                   |                          |
| OTROS                                                                          |                                                          |                    |                          |                   |                          |

Sheet No. ....

Box No. VIII (iv) **DECLARATION: INVENTORSHIP** (only for the purposes of the designation of the United States of America)  
The declaration must conform to the following standardized wording provided for in Section 214; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iv). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

**Declaration of inventorship (Rules 4.17(iv) and 51bis.1(a)(iv))  
for the purposes of the designation of the United States of America:**

I hereby declare that I believe I am the original inventor or an original joint inventor of a claimed invention in the application.

This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application).

This declaration is directed to international application No. PCT/EP2012/076419 (if furnishing declaration pursuant to Rule 26ter).

I hereby declare that the above-identified international application was made or authorized to be made by me.

I hereby acknowledge that any willful false statement made in this declaration is punishable under 18 U.S.C. 1001 by fine or imprisonment of not more than five (5) years, or both.

Name: SISSON, Edwin Andrew

Residence: MEDINA, Ohio, U.S.A.  
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: 2845 Woodhaven Drive, MEDINA, Ohio 44256 (U.S.A.)

Inventor's Signature: Edwin A. Sisson Date: January 30, 2013  
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: FERRERO, Simone

Residence: TORTONA (Alessandria) Italy  
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: Via Emilia 26, I-15057 TORTONA (Alessandria) Italy

Inventor's Signature: Simone Ferrero Date: January 30, 2013  
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: TORRE, Paolo

Residence: ARENZANO (Genova) Italy  
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: Via Terrarossa 37, I-16011 ARENZANO (Genova) Italy

Inventor's Signature: Paolo Torre Date: January 30, 2013  
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

☒ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iv)".



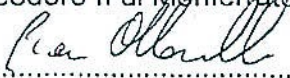
Sheet No. ....

Continuation of Box No. VIII (i) to (v) **DECLARATION**

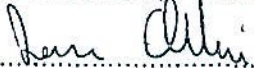
*If the space is insufficient in any of Boxes Nos. VIII (i) to (v) to furnish all the information, including in the case where more than two inventors are to be named in Box No. VIII (iv), in such case, write "Continuation of Box No. VIII ..." (indicate the item number of the Box) and furnish the information in the same manner as required for the purposes of the Box in which the space was insufficient. If additional space is needed in respect of two or more declarations, a separate continuation box must be used for each such declaration. If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.*

"Continuation of Box No. VIII (iv)"  
(International application No. PCT/EP2012/076419)

Name: OTTONELLO, Piero  
Residence: GENOVA (Italy)  
Mailing Address: Via Teodoro II di Monferrato 22/8, I-16156 GENOVA (Italy)

Inventor's Signature:  Date: January 30, 2013

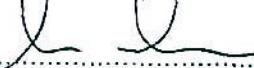
Name: CHERCHI, Francesco  
Residence: NOVI LIGURE (Alessandria) Italy  
Mailing Address: Via della Ferriera 37, I-15067 NOVI LIGURE (Alessandria) Italy

Inventor's Signature:  Date: January 30, 2013

Name: GRASSANO, Giuseppe  
Residence: SAN GIULIANO VECCHIO (Alessandria) Italy  
Mailing Address: Via Grassano 38, I-15122 SAN GIULIANO VECCHIO (Alessandria) Italy

Inventor's Signature:  Date: January 30, 2013

Name: ORIANI, Luis  
Residence: TORTONA (Alessandria) Italy  
Mailing Address: Via Vittorio Alfieri 7, I-15057 TORTONA (Alessandria) Italy

Inventor's Signature:  Date: January 30, 2013

Name: GIORDANO, Dario  
Residence: TORTONA (Alessandria) Italy  
Mailing Address: Strada per Villaromagnano 23, I-15057 TORTONA (Alessandria) Italy

Inventor's Signature:  Date: January 30, 2013

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property  
Organization  
International Bureau



(10) International Publication Number  
**WO 2013/092881 A2**

(43) International Publication Date  
27 June 2013 (27.06.2013)

- (51) International Patent Classification:  
C12P 19/02 (2006.01) D21C 1/10 (2006.01)
- (21) International Application Number:  
PCT/EP2012/076419
- (22) International Filing Date:  
20 December 2012 (20.12.2012)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
61/578,281 21 December 2011 (21.12.2011) US  
TO2012A000012 11 January 2012 (11.01.2012) IT  
61/672,956 18 July 2012 (18.07.2012) US  
61/736,639 13 December 2012 (13.12.2012) US
- (71) Applicant: BETA RENEWABLES S.P.A. [IT/IT]; Strada  
Ribrocca 11, I-15057 TORTONA (Alessandria) (IT).
- (72) Inventors: SISSON, Edwin Andrew; 2845 Woodhaven  
Drive, Medina, Ohio 44256 (US). FERRERO, Simone;  
Via Emilia 26, I-15057 TORTONA (Alessandria) (IT).  
TORRE, Paolo; Via Terrarossa 37, I-16011 ARENZANO  
(Genova) (IT). OTTONEILLO, Piero; Via Teodoro II di  
Monferrato 22/8, I-16156 Genova (IT). CHERCHI,  
Francesco; Via della Ferriera 37, I-15067 NOVI LIGURE  
(Alessandria) (IT). GRASSANO, Giuseppe; Via Grassano  
38, I-15122 SAN GIULIANO VECCHIO (Alessandria)  
(IT). ORIANI, Luis; Via Vittorio Alfieri 7, I-15057 TOR-  
TONA (Alessandria) (IT). GIORDANO, Dario; Strada per  
Villaromagnano 23, I-15057 TORTONA (Alessandria)  
(IT).
- (74) Agents: GERBINO, Angelo et al.; c/o Jacobacci & Part-  
ners S.p.A., Corso Emilia 8, I-10152 Torino (IT).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,  
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,  
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,  
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,  
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,  
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,  
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,  
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,  
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,  
ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,  
UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,  
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,  
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,  
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Declarations under Rule 4.17:**

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a  
patent (Rule 4.17(ii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

**Published:**

- without international search report and to be republished  
upon receipt of that report (Rule 48.2(g))

(54) Title: AN IMPROVED PRE-HYDROLYSIS STEP INVOLVING VACUUM

(57) Abstract: 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 vacu- um 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.



WO 2013/092881 A2



An improved pre-hydrolysis step involving vacuum

BACKGROUND

5 Both US 2009/0053777 A1 and WO 2009/046538 A1 both consider the use of vacuum in various parts of a biomass conversion process.

In order of the processing steps, US 2009/0053777 A1 discloses a Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis Reactor to which vacuum and pressure may be applied to the reaction vessel by  
10 attaching external sources to the lance-connected port in the cover.

US 2009/0053777 A1 further discloses a large barrel piston reactor of 5.1cm x 68.6 cm stainless steel barrel equipped with a piston, oriented horizontally. The 68.6cm barrel was equipped with eight multiple use ports allowing application of vacuum, injection of aqueous  
15 ammonia, injection of steam and insertion of thermocouples for measurement of temperature inside the barrel. The reactor barrel was directly attached to a 15.2cm x 61cm stainless steel flash tank, oriented vertically. The pre-treated solids were directed down into the bottom of the flash tank where the solids were easily removed by unbolting a domed end flange in the bottom of the tank.

20

The use of the vacuum is disclosed when a vacuum was applied to the reactor vessel and to the flash receiver to bring the pressure down <10kPa, and dilute ammonium hydroxide solution was injected in the reactor. Once the ammonia was charged, steam was injected into the reactor to bring the temperature to 145°C. The mixture was then discharged into the preheated  
25 flash tank by activating the piston. Vacuum was pulled on the flash tank until the flash receiver reached ~59°C. Upon harvest from the flash receiver, free liquid was separated from the pre-treated solids and not added back for saccharification.

WO 2009/046538 A1, titled ENZYMATIC TREATMENT UNDER VACUUM OF  
30 LIGNOCELLULOSIC MATERIALS, is self descriptive. The enzymatic hydrolysis of the

ligno-cellulosic biomass is done under vacuum so as to remove the inhibitors to further the enzymatic reaction.

The use of vacuum in these references is for very specific reasons and under very specific conditions. Neither of these references disclose or render non-inventive, the process and the efficiencies described in the description portion of this specification.

#### SUMMARY

Disclosed in this specification is an improved pre-hydrolysis step involving vacuum with one embodiment comprising the steps of

A) Exposing a composition to a vacuum condition,

wherein the composition has a dry matter content, and

the composition comprises a water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass produced from a ligno-cellulosic biomass processed in a pre-treatment process, and an added liquid which has been added to the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass after the pre-treatment process,

wherein the weight percent of the dry matter content of the composition by weight of the total amount of the composition is in the range of 1 to 60 weight percent;

B) Ceasing to expose the composition to the vacuum condition,

C) Adding at least one catalyst to the composition wherein the catalyst is capable of hydrolyzing the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass in the composition,

D) Conducting a catalytic hydrolysis of the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass in the composition.

In another embodiment, the composition is void of free liquid. In another embodiment, the composition comprises free liquid.

It is further disclosed that the step of exposing the composition to a vacuum condition and the step of conducting a catalytic hydrolysis are not conducted in the same vessel.

It is further disclosed that the vacuum condition can be less than an absolute pressure measured in millibar (mbar) selected from the group consisting of 950, 900, 850, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 30, 20, 10, 5, and 0.5 mBar.

It is further disclosed that the weight percent of dry matter of the composition by weight of the total amount of the composition can be in a range selected from the group consisting of 1 to 50, 1 to 40, 1 to 36, 1 to 30, 1 to 25, 1 to 20, 1 to 15, 1 to 10, and 5 to 40.

It is also disclosed that the step of exposing the composition to the vacuum condition may include maintaining the exposure of the composition to the vacuum condition for a minimum time selected from the group consisting of 5 minutes, 10 minutes, 20 minutes, 30 minutes, 45 minutes, and 60 minutes.

It is also disclosed that the exposure to the vacuum condition may be conducted in a temperature range consisting of a temperature range selected from the group consisting of 15 to 55 °C, 15 to 50 °C, 15 to 45 °C, 15 to 35 °C, and 15 to 30 °C.

It is further disclosed that the composition and/or the added liquid may be void of a catalyst capable of hydrolyzing the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass. It is also disclosed that the catalyst may comprise an enzyme and that the catalytic hydrolysis may be enzymatic hydrolysis.



It is further disclosed that the added liquid may comprise C5's which were separated from the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass as part of the pre-treatment of the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass.

- 5 It is also disclosed that the added liquid may also comprise a hydrolysis product made from the enzymatic hydrolysis of a similarly composed water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass.

It is further disclosed that the step of exposing the composition to the vacuum condition may  
10 be conducted using a cylinder with a screw inside the cylinder, also known as an extruder.

It is also disclosed that the conducting of the catalytic hydrolysis is not done under any vacuum condition.

- 15 That the process may be continuous is also disclosed and that the composition be void of ammonia and the pre-treatment process may be void of ammonia.

#### Brief Description of the Figures

- 20 Figure 1 compares the amount of xylose and glucose generated over time by the enzymatic hydrolysis of a composition comprising a water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass which has been exposed to a vacuum condition prior to enzymatic hydrolysis with a water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass of the same composition which has not been exposed to a vacuum condition prior to enzymatic hydrolysis at the specified enzyme  
25 concentration.

- Figure 2 compares the amount of xylose and glucose generated over time by the enzymatic hydrolysis of a composition comprising a water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass which has been exposed to a vacuum condition prior to enzymatic hydrolysis with a water  
30 insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass of the same composition which has not been



exposed to a vacuum condition prior to enzymatic hydrolysis at the specified enzyme concentration.

Figure 3 compares the amount of xylose and glucose generated over time by the enzymatic hydrolysis of a composition comprising a water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass which has been exposed to a vacuum condition prior to enzymatic hydrolysis with a water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass of the same composition which has not been exposed to a vacuum condition prior to enzymatic hydrolysis at the specified enzyme concentration.

10

Figure 4 compares the amount of xylose and glucose generated over time by the enzymatic hydrolysis of a composition comprising a water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass which has been exposed to a vacuum condition prior to enzymatic hydrolysis without enzymes with a water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass of the same composition has been exposed to a vacuum condition with enzymes prior to enzymatic hydrolysis at the specified enzyme concentration.

Figure 5 compares the relative amount of xylose and glucose generated over time by the enzymatic hydrolysis of a composition comprising a water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass which has been exposed to a vacuum condition prior to enzymatic hydrolysis without enzymes with a water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass of the same composition has not been exposed to a vacuum condition prior to enzymatic hydrolysis at the specified enzyme concentration.

25 Description

This specification discloses a process to increase the recovery of glucose from a water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass by applying vacuum to a composition comprising the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass for a short period of time. As disclosed below, the composition comprising the water insoluble ligno-cellulosic biomass

30

may further include an added liquid (also referred to as an added first liquid), free liquid, or be void of free liquid.

What has been discovered and discussed in the experimental section is that when a water  
5 insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass is exposed to a vacuum condition under a liquid,  
such as water, the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass swells and expands to  
about 140% of its original volume and then, once the entrained gas of the water insoluble pre-  
treated ligno-cellulosic biomass is released, it collapses back to about 80% of its original  
volume. While vacuum under liquid is a preferred embodiment, exposing the composition  
10 comprising the water insoluble ligno-cellulosic biomass, but void of free liquid or added liquid  
to a vacuum condition is another embodiment of the invention.

The experiments establish that, contrary to the previous art, catalysts, such as enzymes for  
enzymatic hydrolysis, are not necessary during the vacuum step to further penetrate the water  
15 insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass. The enzymes or other hydrolysis catalysts such  
as acids or bases can be added after the vacuum is broken. The yield of the sugars is the same,  
whether the vacuum is conducted under water or under water with enzymes.

The experiments also establish that the vacuum step is preferably conducted under or in a  
20 liquid, preferably water. Experiments performed on the water insoluble pre-treated ligno-  
cellulosic biomass without adding liquid, or in the absence of a free liquid, had much lower  
sugar yields than those experiments where the vacuum was applied on the water insoluble pre-  
treated ligno-cellulosic biomass in the presence of an amount of liquid. While it is preferred  
to expose the composition to the vacuum condition in the presence of liquid, or under a liquid,  
25 the exposure of the composition without liquid is still better than not exposing the composition  
to vacuum at all.



The experimental data also establishes that the step of conducting catalytic hydrolysis such as enzymatic hydrolysis under vacuum can be avoided if the vacuum is applied prior to catalytic hydrolysis, such as enzymatic hydrolysis, even if only for 10 minutes.

- 5 With this knowledge experimentally established, the process therefore comprises first, exposing a composition to a vacuum condition. A suitable composition comprises a water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass. To be a water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass means that at least a portion of the biomass is water insoluble and that the original naturally occurring ligno-cellulosic biomass used to derive the water insoluble pre-  
 10 treated ligno-cellulosic biomass has undergone processing (pre-treatment) to change its chemical or physical characteristics from that found in nature.

The first step of creating a water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass is to use a ligno-cellulosic biomass . A preferred ligno-cellulosic biomass can be described as follows:

- 15 Apart from starch, the three major constituents in plant biomass are cellulose, hemicellulose and lignin, which are commonly referred to by the generic term lignocellulose. Polysaccharide-containing biomasses as a generic term include both starch and lignocellulosic biomasses. Therefore, some types of feedstocks can be plant biomass, polysaccharide containing biomass, and ligno-cellulosic biomass.

20

Polysaccharide-containing biomasses according to the present invention include any material containing polymeric sugars e.g. in the form of starch as well as refined starch, cellulose and hemicellulose.

- 25 Relevant types of naturally occurring biomasses for deriving the claimed invention may include biomasses derived from agricultural crops selected from the group consisting of starch containing grains, refined starch: corn stover, bagasse, straw e.g. from rice, wheat, rye, oat, barley, rape, sorghum; softwood e.g. *Pinussylvestris*, *Pinus radiate*; hardwood e.g. *Salix spp.* *Eucalyptus spp.*; tuberse.g. beet, potato; cereals from e.g. rice, wheat, rye, oat, barley, rape,  
 30 sorghum and corn; waste paper, fiber fractions from biogas processing, manure, residues from

oil palm processing, municipal solid waste or the like. Although the experiments are limited to a few examples of the enumerated list above, the invention is believed applicable to all because the characterization is primarily to the unique characteristics of the lignin and surface area.

5

The ligno-cellulosic biomass feedstock used in the process is preferably from the family usually called grasses. The proper name is the family known as Poaceae or Gramineae in the Class Liliopsida (the monocots) of the flowering plants. Plants of this family are usually called grasses, or, to distinguish them from other graminoids, true grasses. Bamboo is also included.

10 There are about 600 genera and some 9,000–10,000 or more species of grasses (Kew Index of World Grass Species).

Poaceae includes the staple food grains and cereal crops grown around the world, lawn and forage grasses, and bamboo. Poaceae generally have hollow stems called culms, which are plugged (solid) at intervals called *nodes*, the points along the culm at which leaves arise. Grass leaves are usually alternate, *distichous* (in one plane) or rarely spiral, and parallel-veined. Each leaf is differentiated into a lower *sheath* which hugs the stem for a distance and a *blade* with margins usually entire. The leaf blades of many grasses are hardened with silica phytoliths, which helps discourage grazing animals. In some grasses (such as sword grass) this makes the edges of the grass blades sharp enough to cut human skin. A membranous appendage or fringe of hairs, called the ligule, lies at the junction between sheath and blade, preventing water or insects from penetrating into the sheath.

25 Grass blades grow at the base of the blade and not from elongated stem tips. This low growth point evolved in response to grazing animals and allows grasses to be grazed or mown regularly without severe damage to the plant.

Flowers of Poaceae are characteristically arranged in *spikelets*, each spikelet having one or more florets (the spikelets are further grouped into panicles or spikes). A spikelet consists of two (or sometimes fewer) bracts at the base, called *glumes*, followed by one or more florets. A

30



floret consists of the flower surrounded by two bracts called the *lemma* (the external one) and the *palea* (the internal). The flowers are usually hermaphroditic (maize, monoecious, is an exception) and pollination is almost always anemophilous. The perianth is reduced to two scales, called *lodicules*, that expand and contract to spread the lemma and palea; these are  
 5 generally interpreted to be modified sepals.

The fruit of Poaceae is a caryopsis in which the seed coat is fused to the fruit wall and thus, not separable from it (as in a maize kernel).

10 There are three general classifications of growth habit present in grasses: bunch-type (also called caespitose), stoloniferous and rhizomatous.

The success of the grasses lies in part in their morphology and growth processes, and in part in their physiological diversity. Most of the grasses divide into two physiological groups, using  
 15 the C3 and C4 photosynthetic pathways for carbon fixation. The C4 grasses have a photosynthetic pathway linked to specialized Kranz leaf anatomy that particularly adapts them to hot climates and an atmosphere low in carbon dioxide.

C3 grasses are referred to as "cool season grasses" while C4 plants are considered "warm  
 20 season grasses". Grasses may be either annual or perennial. Examples of annual cool season are wheat, rye, annual bluegrass (annual meadowgrass, *Poa annua* and oat). Examples of perennial cool season are orchard grass (cocksfoot, *Dactylis glomerata*), fescue (*Festuca* spp), Kentucky Bluegrass and perennial ryegrass (*Lolium perenne*). Examples of annual warm season are corn, sudangrass and pearl millet. Examples of Perennial Warm Season are big  
 25 bluestem, indiagrass, bermuda grass and switch grass.

One classification of the grass family recognizes twelve subfamilies: These are 1) anomochlooideae, a small lineage of broad-leaved grasses that includes two genera (*Anomochloa*, *Streptochaeta*); 2) Pharoideae, a small lineage of grasses that includes three  
 30 genera, including *Pharus* and *Leptaspis*; 3) Puelioideae a small lineage that includes the

African genus *Puelia*; 4) Pooideae which includes wheat, barley, oats, brome-grass (Bronnus) and reed-grasses (*Calamagrostis*); 5) Bambusoideae which includes bamboo; 6) Ehrhartoideae, which includes rice, and wild rice; 7) Arundinoideae, which includes the giant reed and common reed 8) Centothecoideae, a small subfamily of 11 genera that is sometimes  
 5 included in Panicoideae; 9) Chloridoideae including the lovegrasses (*Eragrostis*, ca. 350 species, including teff), dropseeds (*Sporobolus*, some 160 species), finger millet (*Eleusinecoracana* (L.) Gaertn.), and the muhly grasses (*Muhlenbergia*, ca. 175 species); 10) Panicoideae including panic grass, maize, sorghum, sugar cane, most millets, fonio and bluestem grasses; 11) Micrairoideae; 12) Danthonioidae including pampas grass; with Poa  
 10 which is a genus of about 500 species of grasses, native to the temperate regions of both hemispheres.

Agricultural grasses grown for their edible seeds are called cereals. Three common cereals are rice, wheat and maize (corn). Of all crops, 70% are grasses.

15

Sugarcane is the major source of sugar production. Grasses are used for construction. Scaffolding made from bamboo is able to withstand typhoon force winds that would break steel scaffolding. Larger bamboos and *Arundo donax* have stout culms that can be used in a manner similar to timber, and grass roots stabilize the sod of sod houses. *Arundo* is used to  
 20 make reeds for woodwind instruments, and bamboo is used for innumerable implements.

The ligno-cellulosic biomass feedstock may also be from woody plants or woods. A woody plant is a plant that uses wood as its structural tissue. These are typically perennial plants whose stems and larger roots are reinforced with wood produced adjacent to the vascular  
 25 tissues. The main stem, larger branches, and roots of these plants are usually covered by a layer of thickened bark. Woody plants are usually either trees, shrubs, or lianas. Wood is a structural cellular adaptation that allows woody plants to grow from above ground stems year after year, thus making some woody plants the largest and tallest plants.



These plants need a vascular system to move water and nutrients from the roots to the leaves (xylem) and to move sugars from the leaves to the rest of the plant (phloem). There are two kinds of xylem: primary that is formed during primary growth from procambium and secondary xylem that is formed during secondary growth from vascular cambium.

- 5 What is usually called "wood" is the secondary xylem of such plants.

The two main groups in which secondary xylem can be found are:

1) conifers (*Coniferae*): there are some six hundred species of conifers. All species have secondary xylem, which is relatively uniform in structure throughout this group. Many conifers become tall trees: the secondary xylem of such trees is marketed as softwood.

- 10 2) angiosperms (*Angiospermae*): there are some quarter of a million to four hundred thousand species of angiosperms. Within this group secondary xylem has not been found in the monocots (e.g. *Poaceae*). Many non-monocot angiosperms become trees, and the secondary xylem of these is marketed as hardwood.

- 15 The term softwood is used to describe wood from trees that belong to gymnosperms. The gymnosperms are plants with naked seeds not enclosed in an ovary. These seed "fruits" are considered more primitive than hardwoods. Softwood trees are usually evergreen, bear cones, and have needles or scale like leaves. They include conifer species e.g. pine, spruces, firs, and cedars. Wood hardness varies among the conifer species.

- 20 The term hardwood is used to describe wood from trees that belong to angiosperm family. Angiosperms are plants with ovules enclosed for protection in an ovary. When fertilized, these ovules develop into seeds. The hardwood trees are usually broad-leaved; in temperate and boreallatitudes they are mostly deciduous, but in tropics and subtropics mostly evergreen. These leaves can be either simple (single blades) or they can be compound with leaflets attached to a leaf stem. Although variable in shape all hardwood leaves have a distinct  
25 network of fine veins. The hardwood plants include e.g. Aspen, Birch, Cherry, Maple, Oak and Teak.



Therefore a preferred ligno-cellulosic biomass may be selected from the group consisting of the grasses and woods. A preferred ligno-cellulosic biomass may be selected from the group consisting of the plants belonging to the conifers, angiosperms, Poaceae and/or Gramineae families. Another preferred lignocellulosic biomass may also be that biomass having at least  
5 10% by weight of its dry matter as cellulose, or more preferably at least 5% by weight of its dry matter as cellulose.

The ligno-cellulosic biomass will also comprise carbohydrate(s) selected from the group of carbohydrates based upon the glucose, xylose, and mannose monomers. Being derived from ligno-cellulosic biomass, means that the ligno-cellulosic biomass of the feed stream will  
10 comprise glucans and xylans and lignin.

Glucans include the monomers, dimers, oligomers and polymers of glucan in the ligno-cellulosic biomass. Of particular interest is 1,4 beta glucan which is particular to cellulose, as opposed to 1,4 alpha glucan. The amount of 1,4 beta glucan(s) present in the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass should be at least 5% by weight of the water insoluble  
15 pre-treated ligno-cellulosic biomass on a dry basis, more preferably at least 10% by weight of the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass on a dry basis, and most preferably at least 15% by weight of the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass on a dry basis. Xylans include the monomers, dimers, oligomers and polymers of xylan in the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass composition.

20

While the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass can be free of starch, substantially free of starch, or have a starch content of 0. Starch, if present, can be less than 75% by weight of the dry content. There is no preferred starch range as its presence is not believed to affect the hydrolysis to glucose. Ranges for the starch amount, if present, are  
25 between 0 and 75% by weight of the dry content, 0 to 50% by weight of the dry content, 0 to 30% by weight of the dry content and 0 to 25% by weight of the dry content.

Because this invention is to hydrolysis of glucose, the specification and inventors believe that any ligno-cellulosic biomass with 1,4 beta glucans can be used as a feed stock for this

improved hydrolysis process.

The pre-treatment process used on the naturally occurring ligno-cellulosic biomass can be any pre-treatment process known in the art and those to be invented in the future, or the pre-treatment can be a series of processes.

The ligno-cellulosic biomass feedstock may also be from woody plants. A woody plant is a plant that uses wood as its structural tissue. These are typically perennial plants whose stems and larger roots are reinforced with wood produced adjacent to the vascular tissues. The main stem, larger branches, and roots of these plants are usually covered by a layer of thickened bark. Woody plants are usually either trees, shrubs, or lianas. Wood is a structural cellular adaptation that allows woody plants to grow from above ground stems year after year, thus making some woody plants the largest and tallest plants.

These plants need a vascular system to move water and nutrients from the roots to the leaves (xylem) and to move sugars from the leaves to the rest of the plant (phloem). There are two kinds of xylem: primary that is formed during primary growth from procambium and secondary xylem that is formed during secondary growth from vascular cambium.

What is usually called "wood" is the secondary xylem of such plants.

The two main groups in which secondary xylem can be found are:

1) conifers (*Coniferae*): there are some six hundred species of conifers. All species have secondary xylem, which is relatively uniform in structure throughout this group. Many conifers become tall trees: the secondary xylem of such trees is marketed as softwood.

2) angiosperms (*Angiospermae*): there are some quarter of a million to four hundred thousand species of angiosperms. Within this group secondary xylem has not been found in the monocots (e.g. *Poaceae*). Many non-monocot angiosperms become trees, and the secondary xylem of these is marketed as hardwood.



The term softwood is used to describe wood from trees that belong to gymnosperms. The gymnosperms are plants with naked seeds not enclosed in an ovary. These seed "fruits" are considered more primitive than hardwoods. Softwood trees are usually evergreen, bear cones, and have needles or scalelike leaves. They include conifer species e.g. pine, spruces, firs, and cedars. Wood hardness varies among the conifer species.

The term hardwood is used to describe wood from trees that belong to angiosperm family. Angiosperms are plants with ovules enclosed for protection in an ovary. When fertilized, these ovules develop into seeds. The hardwood trees are usually broad-leaved; in temperate and boreallatitudes they are mostly deciduous, but in tropics and subtropics mostly evergreen. These leaves can be either simple (single blades) or they can be compound with leaflets attached to a leaf stem. Although variable in shape all hardwood leaves have a distinct network of fine veins. The hardwood plants include e.g. Aspen, Birch, Cherry, Maple, Oak and Teak.

As an example, the pre-treatment process may include soaking followed by steam explosion. For example, the pre-treatment process may include any process or processes other than steam explosion. The pre-treatment process may not include steam explosion. The pre-treatment process may include steam explosion. Steam explosion may be the last step of the pre-treatment process. Steam explosion into a flash receiver, cooling down the contents of the receiver and separating the free liquid may be the last step of the pre-treatment process. The pre-treatment process may include super-critical extraction.

The pre-treatment process used to pre-treat the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass is used to ensure that the structure of the ligno-cellulosic content is rendered more accessible to the catalysts, such as enzymes, and at the same time the concentrations of harmful inhibitory by-products such as acetic acid, furfural and hydroxymethyl furfural remain substantially low.

Some of the current strategies of pre-treatment are subjecting the ligno-cellulosic material to



temperatures between 110-250°C for 1-60 min e.g.:

Hot water extraction

- 5 Multistage dilute acid hydrolysis, which removes dissolved material before inhibitory substances are formed

Dilute acid hydrolysis at relatively low severity conditions

- 10 Alkaline wet oxidation

Steam explosion

Almost any pre-treatment with subsequent detoxification

15

If a hydrothermal pre-treatment is chosen, the following conditions are preferred:

- Pre-treatment temperature: 110-250°C, preferably 120-240°C, more preferably 130-230°C, more preferably 140-220°C, more preferably 150-210°C, more preferably 160-200°C, even  
20 more preferably 170-200°C or most preferably 180-200°C.

- Pre-treatment time: 1-60min, preferably 2-55min, more preferably 3-50min, more preferably 4-45min, more preferably 5-40min, more preferably 5-35min, more preferably 5-30min, more preferably 5-25min, more preferably 5-20min and most preferably 5-15min.

25

Dry matter content after pre-treatment is preferably at least 20% (w/w). Other preferable higher limits are contemplated as the amount of biomass to water in the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic feedstock be in the ratio ranges of 1:4 to 9:1; 1:3.9 to 9:1, 1:3.5 to 9:1, 1:3.25 to 9:1, 1:3 to 9:1, 1:2.9 to 9:1, 1:2 to 9:1, 1:1.5 to 9:1, 1:1 to 9:1, and 1:0.9 to 9:1.

30

Polysaccharide-containing biomasses according to the present invention include any material containing polymeric sugars e.g. in the form of starch as well as refined starch, cellulose and hemicellulose. However, as discussed earlier, the starch is not a primary component.

- 5 A preferred pre-treatment process is the two steps of soaking to extract C5's followed by steam explosion as describe below.

A preferred pretreatment of a naturally occurring ligno-cellulosic biomass includes a soaking of the naturally occurring ligno-cellulosic biomass feedstock followed by a steam explosion of  
10 at least a part of the soaked naturally occurring ligno-cellulosic biomass feedstock.

The soaking occurs in a substance such as water in either vapor form, steam, or liquid form or liquid and steam together, to produce a product. The product is a soaked biomass containing a first liquid, with the first liquid usually being water in its liquid or vapor form or some  
15 mixture.

This soaking can be done by any number of techniques that expose a substance to water, which could be steam or liquid or mixture of steam and water, or, more in general, to water at high temperature and high pressure. The temperature should be in one of the following ranges: 145 to 165°C, 120 to 210°C, 140 to 210°C, 150 to 200°C, 155 to 185°C, 160 to 180°C.  
20 Although the time could be lengthy, such as up to but less than 24 hours, or less than 16 hours, or less than 12 hours, or less than 9 hours or less than 6 hours; the time of exposure is preferably quite short, ranging from 1 minute to 6 hours, from 1 minute to 4 hours, from 1 minute to 3 hours, from 1 minute to 2.5 hours, more preferably 5 minutes to 1.5 hours, 5 minutes to 1 hour, 15 minutes to 1 hour.

25 If steam is used, it is preferably saturated, but could be superheated. The soaking step can be batch or continuous, with or without stirring. A low temperature soak prior to the high temperature soak can be used. The temperature of the low temperature soak is in the range of 25 to 90°C. Although the time could be lengthy, such as up to but less than 24 hours, or less than 16 hours, or less than 12 hours, or less than 9 hours or less than 6 hours; the time of



exposure is preferably quite short, ranging from 1 minute to 6 hours, from 1 minute to 4 hours, from 1 minute to 3 hours, from 1 minute to 2.5 hours, more preferably 5 minutes to 1.5 hours, 5 minutes to 1 hour, 15 minutes to 1 hour.

While it is preferred to avoid acid or bases, either soaking step could also include the addition  
 5 of other compounds, e.g.  $H_2SO_4$ ,  $NH_3$ , in order to achieve higher performance later on in the process.

The product comprising the first liquid is then passed to a separation step where the first liquid is separated from the soaked biomass. The liquid will not completely separate so that at least a portion of the liquid is separated, with preferably as much liquid as possible in an economic  
 10 time frame. The liquid from this separation step is known as the first liquid stream comprising the first liquid. The first liquid will be the liquid used in the soaking, generally water and the soluble species of the feedstock. These water soluble species are glucan, xylan, galactan, arabinan, glucolymers, xyloolymers, galactolymers and arabinolymers. The solid biomass is called the first solid stream as it contains most, if not all, of the solids.

15 The separation of the liquid can again be done by known techniques and likely some which have yet been invented. A preferred piece of equipment is a press, as a press will generate a liquid under high pressure.

It is also known to pre-soak the ligno-cellulosic biomass before soaking to remove the C5's.

The first solid stream is then steam exploded to create a steam exploded stream, comprising  
 20 solids and a second liquid. Steam explosion is a well known technique in the biomass field and any of the systems available today and in the future are believed suitable for this step. The severity of the steam explosion is known in the literature as  $Ro$ , and is a function of time and temperature and is expressed as

$$Ro = t \exp[(T-100)/14.75]$$

25 with temperature,  $T$  expressed in Celsius and time,  $t$ , expressed in common units.

The formula is also expressed as  $\text{Log}(Ro)$ , namely



$$\text{Log}(\text{Ro}) = \text{Ln}(t) + [(T-100)/14.75].$$

Log(Ro) is preferably in the ranges of 2.8 to 5.3, 3 to 5.3, 3 to 5.0 and 3 to 4.3.

The steam exploded stream may be optionally washed at least with water and there may be other additives used as well. It is conceivable that another liquid may be used in the future, so  
5 water is not believed to be absolutely essential. At this point, water is the preferred liquid and if water is used, it is considered the third liquid. The liquid effluent from the optional wash is the third liquid stream. This wash step is not considered essential and is optional.

The washed exploded stream is then processed to remove at least a portion of the liquid in the washed exploded material. This separation step is also optional. The term at least a portion is  
10 removed, is to remind one that while removal of as much liquid as possible is desirable (pressing), it is unlikely that 100% removal is possible. In any event, 100% removal of the water is not desirable since water is needed for the subsequent hydrolysis reaction. The preferred process for this step is again a press, but other known techniques and those not invented yet are believed to be suitable. The products separated from this process are solids in  
15 the second solid stream and liquids in the second liquid stream.

The composition for the invented process will have a dry matter content which is the material after the removal of the water and other volatiles by drying to a level of at least less than 50ppm moisture. The dry matter content is measured by procedures disclosed in "*Preparation of Samples for Compositional Analysis*", Laboratory Analytical Procedure (LAP), Issue Date:  
20 9/28/2005, *Technical Report NREL/TP-510-42620*, January 2008.

In one embodiment the composition prior to vacuum will have an amount of free liquid from the pre-treatment of the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass which has not been separated from the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass after the pre-  
25 treatment of the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass. For example, in some steam explosion processes, it is known that there may be free liquid from the condensed vapors. By free liquid, it is meant a liquid which can be separated from the solids of the composition by decanting the composition. If the free liquid is removed from the water

insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass after pre-treatment, some, if not all of the free liquid can be re-added to the composition and still be within the scope of the invention.

5 The composition will also further comprise at least one gas, which may be air or a gas or mixture of gases used in the pre-treatment process prior to the vacuum treatment. This gas, usually air, is entrained in the solid matrix of the composition. It is this gas which is removed by the exposure of the composition to the vacuum conditions. As noted in the experimental, the expansion of the gas is substantial and is believed to open or break the pores holding the gas. The volume of the composition at atmospheric conditions after exposure to the vacuum  
10 will be less than 95% of the volume prior to exposure, with less than 90% of the volume being more preferred, and less than 85% of the volume prior to exposure even more preferred with less than 80% of the volume prior to exposure being the most preferred. One skilled in the art can control the amount of the gas removed, with 95 to 100% of the gas removal being the most preferred amount. Thus, the final composition after vacuum exposure can be void of  
15 gas, which is more than 95% of the gas having been removed.

The composition will also comprise an amount of water insoluble carbohydrates known as the amount of water insoluble carbohydrates prior to the vacuum exposure. Because the exposure to vacuum occurs before hydrolysis, the amount of the water insoluble carbohydrates prior to  
20 exposure to vacuum is expected to be the same as the amount of water insoluble carbohydrates after exposure to the vacuum.

In another embodiment the composition will be void of free liquid, in particular free liquid generated or used during the pre-treatment process. For example, a batch steam explosion  
25 may have free liquids, while a continuous steam explosion does not usually have free liquids. In another embodiment, the composition will have an amount of free liquid, but the pre-treatment process will not include a steam explosion step. The composition of this embodiment could further comprise free liquid and an added liquid as discussed below.



The composition in another embodiment further comprises an added liquid. Usually the added liquid comprises water, or is water. The amount of the added liquid depends upon the amount needed to reduce the dry matter content to the specified percentage of the total mass. The dry matter content should be the weight percent of dry matter of the composition by weight of the total amount of the composition and should be in the range of 1 to 60. Other suitable dry matter contents of the composition is a weight percent of dry matter of the composition by weight of the total amount of the composition is in a range selected from the group consisting of 1 to 50, 1 to 40, 1 to 36, 1 to 30, 1 to 25, 1 to 20, 1 to 15, 1 to 10, and 5 to 40, all expressed in weight percent of the dry matter compared to the total composition.

10

It is noted that the dry matter content is not just the weight of the composition less the water composition, as during the drying test, volatiles such as furfural, hydroxymethyl furfural (HMF) and acetic acid will be removed.

15 It is preferable that the composition be free of ammonia, added acids and/or added bases or other process reactants which have been added or used during the pre-treatment of the ligno-cellulosic biomass as they are not necessary in a properly designed pre-treatment process and create problems for downstream processing. It is also preferred that the pre-treatment process not use ammonia, added acids and/or added bases or other process reactants which have been  
20 added or used during the pre-treatment of the ligno-cellulosic biomass.

After securing the composition, the composition is exposed to a vacuum condition which could occur in any type of equipment capable of holding a vacuum. The source of vacuum could be vacuum jet(s), vacuum pump(s), ejector(s), aspirator(s), and any other vacuum source  
25 known and those to be invented yet.

One preferred method of exposing the composition to the vacuum condition is to conduct the exposure in an extruder, often called a vacuum extruder. This piece of equipment uses a screw, often called a conveying screw and/or screw, inside a cylinder to convey the composition through the vacuum zone of the cylinder apparatus.



The vacuum condition is less than atmospheric pressure which is an absolute pressure measured in millibar (mbar) less 1013.25 millibar, and can be selected from the group consisting of 950, 900, 850, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 30, 20, 10, 5, and 0.5mBar,

- 5 The exposure of the composition to the vacuum condition may also be conducted in a temperature range consisting of a temperature range selected from the group consisting of 15 to 55 °C, 15 to 50 °C, 15 to 45 °C, 15 to 35 °C, and 15 to 30 °C.

The step of exposing the composition to the vacuum condition may further include maintaining the exposure of the composition to the vacuum condition for a minimum time  
10 selected from the group consisting of 5 minutes, 10 minutes, 20 minutes, 30 minutes, 45 minutes, and 60 minutes. If a maximum exposure time is desired, the time should not be more than 600 minutes.

Because it is not necessary to conduct the catalytic hydrolysis, in particular the enzymatic hydrolysis, under a vacuum condition, the composition is preferably substantially void, or void  
15 of catalysts capable of catalytically hydrolyzing the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass. To be substantially void, means that any catalytic activity is 5% or less than the catalytic activity used in the catalytic hydrolysis step. Enzymes are known hydrolysis catalysts and in the case of enzymes, the catalytic hydrolysis is known as enzymatic hydrolysis.

20 It is also preferred that the added liquid comprise C5's which were separated from the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass as part of the pre-treatment of the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass prior to steam explosion. In some pre-treatment processes it is known to soak or otherwise extract the C5's, which are the arabinan and xylan components and include the monomers, dimers, oligomers and polymers of arabinose  
25 and xylose. This C5 removal is often done prior to steam explosion.

As it is also known to combine the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass with a product which has been previously hydrolyzed having a similar hydrolysis composition, the

process may further comprise a hydrolysis product made from the enzymatic hydrolysis of a similarly composed water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass, if not the hydrolysis product of the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass.

5 After the exposure to the vacuum condition, the vacuum is broken which is the step of ceasing to expose the composition to the vacuum condition. This can be done by isolating the vacuum source from the composition and removing the vacuum from the composition, or in the case of the extruder, moving the composition out of the vacuum zone of the extruder cylinder and into a different zone which is not under vacuum conditions or even discharging from the extruder to a tank or other vessel.

10 After the exposure to the vacuum condition is broken, catalytic, in particular enzymatic hydrolysis is conducted on the composition by adding at least one enzyme capable of conducting an enzymatic hydrolysis of the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass in the composition.

15 It is preferred that the catalytic hydrolysis is not conducted in the same vessel that the vacuum condition is conducted in. On an industrial scale the catalytic hydrolysis vessel is a large vessel. Conducting catalytic hydrolysis under vacuum would therefore require a large vessel having many moving parts for agitating the hydrolysis broth and capable of sustaining vacuum. By performing hydrolysis under vacuum additional costs would incur.

20 The composition may be exposed to vacuum in separated equipment in which the composition is conveyed by a screw. A person skilled in the art will recognize that this equipment is less expensive than a large vessel capable of conducting catalytic hydrolysis under vacuum. It is also contemplated that the catalytic, and in particular enzymatic hydrolysis is not done under any vacuum condition.

#### Experimental

##### 25 Sample preparation

Sample preparation is common to all the examples reported, if not differently explicated.



Wheat straw was subjected to a hydrothermal treatment (soaked) at a temperature of 155°C for a time of 65 minutes and then separated into a liquid stream and a solid stream; the solid stream was steam exploded at a temperature of 190°C for a time of 4 minutes to obtain a steam exploded solid stream. The free liquids were not separated from the steam exploded stream.

5 Vacuum treatment

Vacuum treatment was performed according to the following procedure. The sample was inserted into a vacuum vessel and sealed. The vessel was evacuated by means of a vacuum pump. Pressure reached 30mbar in about 10 seconds and then was maintained at that level for 10 minutes.

10 After vacuum treatment, the vacuum was broke by venting the vessel to atmospheric pressure.

Enzymatic hydrolysis

Enzymatic hydrolysis is common to all examples reported, if not differently explicated.

Pretreated ligno-cellulosic biomass stream was inserted into a bioreactor, agitated by means of an impeller and heated until reaching a temperature of 50°C. pH was corrected to 5 by means  
15 of a KOH solution.

Enzymatic hydrolysis was conducted by inserting an enzymatic cocktail by Novozymes at a determined concentration of protein per gram of global cellulose contained in the pretreated stream of ligno-cellulosic biomass. In each experiment the same cocktail was used, but in different amounts.

20 Different enzymes concentrations were used in the experiments as indicated.

Enzymatic hydrolysis was conducted for 48 hours. Samplings were performed immediately before enzyme insertion and after a hydrolysis time of 24 hours and 48 hours from enzyme insertion.

Glucose and xylose concentration in the hydrolyzed stream was measured by means of  
25 standard HPLC.



## Example 1

A control sample was prepared at the temperature of 25°C by mixing the liquid stream from the first pre-treatment step and steam exploded solid stream at a ratio liquid/solid ratio of 0.8, then water was added until reaching a content of 10% of dry matter on the basis of the total composition to obtain a pretreated stream of ligno-cellulosic biomass.

An amount of 1.3Kg of pretreated stream of lignocellulosic biomass was subjected to enzymatic hydrolysis at a concentration of 5 mg of protein per gram of global cellulose contained in the pretreated stream.

A concentration of xylose of 0.956g/l, 8.152g/l and 8.50g/l were measured immediately before enzyme insertion, after 24 hours and 48 hours respectively.

A concentration of glucose of 0.113 g/l, 13.934 g/l and 17.00g/l were measured immediately before enzyme insertion, after 24 hours and 48 hours respectively.

An amount of 1.3Kg of the pretreated ligno-cellulosic biomass stream was subjected to vacuum treatment at the temperature of 25°C. During vacuum treatment, pretreated stream expanded until reaching approximately 130% of initial volume in about 100 seconds. Macroscopic bubbles of air were formed in the pretreated stream. Shaking by hand the vacuum vessel, bubbles were removed and the pretreated stream collapsed until reaching a volume of approximately 80% of the volume of the pretreated stream before vacuum treatment. After venting, the evacuated pretreated stream was subjected to enzymatic hydrolysis at a concentration of 5 mg of protein per gram of global cellulose contained in the pretreated stream.

A concentration of xylose of 0.321g/l, 9.800g/l and 10.203g/l were measured immediately before enzyme insertion, after 24 hours and 48 hours respectively. As the xylose comes from the liquid from the first pre-treatment step, its presence does not indicate enzymatic hydrolysis.

A concentration of glucose of 0g/l, 19.426g/l and 22.634g/l were measured immediately before enzyme insertion, after 24 hours and 48 hours respectively. The concentration of 0g/l after vacuum indicates that there was no hydrolysis occurring during vacuum and that water is not a process reactant.

- 5 Concentrations of xylose and glucose vs. hydrolysis time for control sample and vacuum treated sample are reported in Figure 1.

Example 2

Using the same material as in Example 1, a control sample was prepared at the temperature of 25°C by mixing liquid stream and steam exploded solid stream at a ratio liquid/solid ratio of 10 0.8, then water was added until reaching a content of 10% of dry matter to obtain a pretreated stream.

An amount of 1.3Kg of pretreated stream was subjected to enzymatic hydrolysis at a concentration of 7.5 mg of protein per gram of global cellulose contained in the pretreated stream.

- 15 A concentration of xylose of 0.956g/l, 9.601g/l and 10.402g/l were measured immediately before enzyme insertion, after 24 hours and 48 hours respectively.

A concentration of glucose of 0.113g/l, 22.3g/l and 28.231g/l were measured immediately before enzyme insertion, after 24 hours and 48 hours respectively.

An amount of 1.3Kg of pretreated stream was subjected to vacuum treatment at the 20 temperature of 25°C. During vacuum treatment, the pretreated stream expanded until reaching approximately 130% of initial volume in about 100 seconds. Macroscopic bubbles of air were formed in the pretreated stream. Shaking by hand the vacuum vessel, bubbles were removed and the pretreated stream collapsed until reaching a volume of approximately 80% of the volume of the pretreated stream before vacuum treatment. After venting, the evacuated 25 pretreated stream was subjected to enzymatic hydrolysis at a concentration of 7.5 mg of protein per gram of global cellulose contained in the pretreated stream.



A concentration of xylose of 0.451g/l, 11.185g/l and 12.052g/l were measured immediately before enzyme insertion, after 24 hours and 48 hours respectively.

A concentration of glucose of 0g/l, 28.201g/l and 33.293g/l were measured immediately before enzyme insertion, after 24 hours and 48 hours respectively.

- 5 Concentrations of xylose and glucose vs. hydrolysis time for control sample and vacuum treated sample are reported in Figure 2.

### Example 3

10 A control sample of the same ligno-cellulosic biomass as that used in Examples 1 and 2 was prepared at the temperature of 25°C by mixing liquid stream and steam exploded solid stream at a liquid/solid ratio of 0.8, then water was added until reaching a content of 10% of dry matter to obtain a pretreated stream.

An amount of 1.3Kg of pretreated material was subjected to enzymatic hydrolysis at a concentration of 10 mg of protein per gram of global cellulose contained in the pretreated stream.

- 15 A concentration of xylose of 0.956g/l, 10.495g/l and 11.31g/l were measured immediately before enzyme insertion, after 24 hours and 48 hours respectively.

A concentration of glucose of 0.113g/l, 27.325g/l and 33.731g/l were measured immediately before enzyme insertion, after 24 hours and 48 hours respectively.

- 20 An amount of 1.3Kg of pretreated stream was subjected to vacuum treatment at the temperature of 25°C. During vacuum treatment, the pretreated stream expanded until reaching approximately 130% of initial volume in about 100 seconds. Macroscopic bubbles of air were formed in the pretreated stream. Shaking by hand the vacuum vessel, bubbles were removed and the pretreated stream collapsed until reaching a volume of approximately 80% of the volume of the pretreated stream before vacuum treatment. After venting, the evacuated  
25 pretreated stream was subjected to enzymatic hydrolysis at a concentration of 10 mg of protein per gram of global cellulose contained in the pretreated stream.



A concentration of xylose of 0.418g/l, 12.698g/l and 13.504g/l were measured immediately before enzyme insertion, after 24 hours and 48 hours respectively.

A concentration of glucose of 0g/l, 34.851g/l and 39.596g/l were measured immediately before enzyme insertion, after 24 hours and 48 hours respectively.

- 5 Concentrations of xylose and glucose vs. hydrolysis time for control sample and vacuum treated sample are reported in Figure 3.

#### Example 4

The control experiment corresponds to the sample of example 3, where the pretreated stream is exposed to vacuum before enzyme insertion.

- 10 An amount of 1.3Kg of pretreated stream was added with the enzymatic cocktail by Novozymes at the concentration of 10mg of protein per gram of global cellulose contained in the pretreated stream at the temperature of 25°C and then subjected to vacuum treatment. During vacuum treatment, the pretreated stream expanded until reaching approximately 130% of initial volume in about 100 seconds. Macroscopic bubbles of air were formed in the  
15 pretreated stream. Shaking by hand the vacuum vessel, bubbles were removed and the pretreated stream collapsed until reaching a volume of approximately 80% of the volume of the pretreated stream before vacuum treatment. After venting, the pretreated stream with already added enzymatic cocktail was inserted into a bioreactor, agitated by means of an impeller and heated until reaching a temperature of 50°C. pH was corrected to 5 by means of a  
20 KOH solution.

Enzymatic hydrolysis was conducted for 48 hours. Samplings were performed immediately before the insertion into the bioreactor and after a hydrolysis time of 24 hours and 48 hours from enzyme insertion.

- 25 A concentration of xylose of 7.23g/l, 12.698g/l and 12.805g/l was measured immediately before insertion into the bioreactor, after 24 hours and 48 hours respectively.

A concentration of glucose of 3.373g/l, 31.498g/l and 35.971g/l was measured immediately before insertion into the bioreactor, after 24 hours and 48 hours respectively. Since the glucose concentration is not 0, it is indicative of enzymatic hydrolysis, but this hydrolysis has occurred after the addition of the enzymes at atmospheric pressure, indicating that the enzymatic hydrolysis does not need to be conducted under a vacuum condition as indicated in the art.

Concentrations of xylose and glucose vs. hydrolysis time for the sample exposed to vacuum before enzyme insertion and the sample exposed to vacuum after enzyme insertion (vacuum hydrolysis) are reported in Figure 4. These results show that exposing to vacuum the pretreated stream without the enzymes is superior to exposing to vacuum the pretreated stream with the enzymes already added; in other words, surprisingly, using vacuum to penetrate the reactant does not work as well as using vacuum, removing the air and then adding the process reactant.

#### Example 5

Experiment was conducted on a different source of wheat straw raw material with respect to previously reported experiments.

A control sample was prepared at the temperature of 25°C by mixing the liquid stream from the first pre-treatment and the steam exploded solid stream at a liquid/solid ratio of 0.8, then water was added until reaching a content of 10% of dry matter to obtain a pretreated stream.

An amount of 1.3Kg of pretreated material was subjected to enzymatic hydrolysis at a concentration of 10 mg of protein per gram of global cellulose contained in the pretreated stream.

An amount of 1.3Kg of pretreated stream was subjected to vacuum treatment at the temperature of 25°C. During vacuum treatment, the pretreated stream expands until reaching approximately 130% of initial volume in about 100 seconds. Macroscopic bubbles of air were formed in the pretreated stream. Shaking by hand the vacuum vessel, bubbles were removed and the pretreated stream collapsed until reaching a volume of approximately 80% of the volume of the pretreated stream before vacuum treatment. After venting, the evacuated

pretreated stream of ligno-cellulosic biomass was subjected to enzymatic hydrolysis at a concentration of 10 mg of protein per gram of global cellulose contained in the pretreated stream.

Enzymatic hydrolysis was conducted for a long run of 144 hours. Samplings were performed  
5 immediately before the insertion into the bioreactor and after a hydrolysis time of 6, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours from enzyme insertion.

Normalized concentrations of xylose and glucose vs. hydrolysis time for control sample and vacuum treated sample are reported in Figure 5.

This data shows the large relative amount of xylose and glucose which is converted when the  
10 material has only been exposed to vacuum in the presence of water and the liquid from the pre-treatment, and at least some of the free liquid after steam explosion has not been separated from the steam exploded stream.



CLAIMS

1. A process to increase the recovery of glucose from a pre-treated ligno-cellulosic biomass, comprising the steps of

5 A) Exposing a composition to a vacuum condition,

wherein the composition has a dry matter content, and

the composition comprises a water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass produced from a ligno-cellulosic biomass processed in a pre-treatment process, and

10 an added liquid which has been added to the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass after the pre-treatment process,

wherein the weight percent of the dry matter content of the composition by weight of the total amount of the composition is in the range of 1 to 60 weight percent;

15 B) Ceasing to expose the composition to the vacuum condition,

C) Adding at least one catalyst to the composition wherein the catalyst is capable of hydrolyzing the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass in the composition,

20 D) Conducting a catalytic hydrolysis of the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass in the composition.

2. The process of claim 1, wherein the step A) of exposing the composition to a vacuum condition and the step D) of conducting the catalytic hydrolysis are not conducted in the same vessel.

25

3. The process of any one of claims 1 and 2, wherein the vacuum condition is less than an absolute pressure measured in millibar (mbar) selected from the group consisting of 950, 900, 850, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 30, 20, 10, 5, and 0.5 mBar.

4. The process of any one of claims 1 to 3, wherein the weight percent of dry matter of the composition by weight of the total amount of the composition is in a range selected from the group consisting of 1 to 50, 1 to 40, 1 to 36, 1 to 30, 1 to 25, 1 to 20, 1 to 15, 1 to 10, and 5 to 40.
5. The process of any one of claims 1 to 4, wherein the step of exposing the composition to the vacuum condition includes maintaining the exposure of the composition to the vacuum condition for a minimum time selected from the group consisting of 5 minutes, 10 minutes, 20 minutes, 30 minutes, 45 minutes, and 60 minutes.
6. The process of any one of claims 1 to 5, wherein the exposure to the vacuum condition is conducted in a temperature range consisting of a temperature range selected from the group consisting of 15 to 55 °C, 15 to 50 °C, 15 to 45 °C, 15 to 35 °C, and 15 to 30 °C.
7. The process of any one of claims 1 to 6, wherein the added liquid is void of a catalyst capable of hydrolyzing the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass.
8. The process of any one of claims 1 to 7, wherein first added liquid comprises C5's which were separated from the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass as part of the pre-treatment process used to pre-treat the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass.
9. The process of any one of claims 1 to 8, wherein the added liquid further comprises a hydrolysis product made from the catalytic hydrolysis of a similarly composed pre-treated ligno-cellulosic biomass.
10. The process of any one of claims 1 to 9, wherein the step of exposing the composition to the vacuum condition is conducted while the composition is being conveyed with a screw.

11. The process of any one of claims 1 to 10, wherein the conducting of the catalytic hydrolysis is not done under any vacuum condition.

12. The process of any one of claims 1 to 11, wherein the process is a continuous process.

5

13. The process of any one of claims 1 to 12, wherein the composition prior to exposure to the vacuum condition is void of ammonia.

14. The process according to claims 1 to 13, wherein the catalyst comprises an enzyme and the catalytic hydrolysis comprises enzymatic hydrolysis.

10

15. The process of any one of claims 1 to 14, wherein the pre-treatment process did not use ammonia to pre-treat the ligno-cellulosic biomass.

16. A process to increase the recovery of glucose from a pre-treated ligno-cellulosic biomass, comprising the steps of

15

A) Exposing a composition to a vacuum condition,

wherein the composition has a dry matter content, and

the composition comprises water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass,

20

wherein the weight percent of the dry matter content of the composition by weight of the total amount of the composition is in the range of 1 to 60 weight percent, and

the composition is void of free liquid;

25

B) Ceasing to expose the composition to the vacuum condition;

C) Adding at least one catalyst to the composition wherein the catalyst is capable of hydrolyzing the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass in the composition;

30



D) Conducting a catalytic hydrolysis of the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass in the composition.

17. The process of claim 16 , wherein the vacuum condition is less than an absolute  
5 pressure measured in millibar (mbar) selected from the group consisting of 950, 900, 850, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 30, 20, 10, 5, and 0.5 mBar.

18. The process of any one of claims 16 and 17, wherein the weight percent of dry matter  
10 of the composition by weight of the total amount of the composition is in a range selected from the group consisting of 1 to 50, 1 to 40, 1 to 36, 1 to 30, 1 to 25, 1 to 20, 1 to 15, 1 to 10, and 5 to 40.

19. The process of any one of claims 16 to 18, wherein the step of exposing the  
15 composition to the vacuum condition includes maintaining the exposure of the composition to the vacuum condition for a minimum time selected from the group consisting of 5 minutes, 10 minutes, 20 minutes, 30 minutes, 45 minutes, and 60 minutes.

20. The process of any one of claims 16 to 19, wherein the exposure to the vacuum  
20 condition is conducted in a temperature range consisting of a temperature range selected from the group consisting of 15 to 55 °C, 15 to 50 °C, 15 to 45 °C, 15 to 35 °C, and 15 to 30 °C.

21. The process of any one of claims 16 to 20, wherein the step of exposing the  
25 composition to the vacuum condition is conducted using a cylinder with a screw inside the cylinder.

22. The process of any one of claims 16 to 21, wherein the conducting of the catalytic  
hydrolysis is not done under any vacuum condition.

23. The process of any one of claims 16 to 22, wherein the process is a continuous process.  
30

24. The process of any one of claims 16 to 23, wherein the composition prior to exposure to the vacuum condition is void of ammonia.

25. The process of any one of claims 16 to 24, wherein the pre-treatment process did not use ammonia to pre-treat the ligno-cellulosic biomass.

26. The process of any one of claims 16 to 25, wherein the catalyst comprises an enzyme and the catalytic hydrolysis comprises enzymatic hydrolysis.

27. A process to increase the recovery of glucose from a pre-treated ligno-cellulosic biomass, comprising the steps of

A) Exposing a composition to a vacuum condition,

wherein the composition has a dry matter content, and

the composition comprises water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass, and a free liquid,

wherein the weight percent of the dry matter content of the composition by weight of the total amount of the composition is in the range of 1 to 60 weight percent;

B) Ceasing to expose the composition to the vacuum condition,

C) Adding at least one catalyst to the composition wherein the catalyst is capable of hydrolyzing the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass in the composition,

D) Conducting a catalytic hydrolysis of the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass in the composition.

28. The process of claim 27, wherein the vacuum condition is less than an absolute pressure measured in millibar (mbar) selected from the group consisting of 950, 900, 850, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 30, 20, 10, 5, and 0.5 mBar.

29. The process of any one of claims 27 and 28, wherein the weight percent of dry matter of the composition by weight of the total amount of the composition is in a range selected from the group consisting of 1 to 50, 1 to 40, 1 to 36, 1 to 30, 1 to 25, 1 to 20, 1 to 15, 1 to 10, and 5 to 40.

5

30. The process of any one of claims 27 to 29, wherein the step of exposing the composition to the vacuum condition includes maintaining the exposure of the composition to the vacuum condition for a minimum time selected from the group consisting of 5 minutes, 10 minutes, 20 minutes, 30 minutes, 45 minutes, and 60 minutes.

10

31. The process of any one of claims 27 to 30, wherein the exposure to the vacuum condition is conducted in a temperature range consisting of a temperature range selected from the group consisting of 15 to 55 °C, 15 to 50 °C, 15 to 45 °C, 15 to 35 °C, and 15 to 30 °C.

15

32. The process of any one of claims 27 to 31, wherein the step of exposing the composition to the vacuum condition is conducted using a cylinder with a screw inside the cylinder.

20

33. The process of any one of claims 27 to 32, wherein the conducting of the catalytic hydrolysis is not done under any vacuum condition.

34. The process of any one of claims 27 to 33, wherein the process is a continuous process.

25

35. The process of any one of claims 27 to 34, wherein the composition prior to exposure to the vacuum condition is void of ammonia.

36. The process of any one of claims 27 to 35, wherein the pre-treatment process did not use ammonia to pre-treat the ligno-cellulosic biomass.



37. The process of any one of claims 27 to 36, wherein the catalyst comprises an enzyme and the catalytic hydrolysis comprises enzymatic hydrolysis.
38. A product produced by a process to increase the recovery of glucose from a pre-treated  
5 ligno-cellulosic biomass, the process comprising the steps of
- A) Exposing a composition to a vacuum condition,
- wherein the composition has a dry matter content, and  
the composition comprises at least one gas and a water insoluble pre-treated  
ligno-cellulosic biomass comprised of an amount of water insoluble  
10 carbohydrates produced from a ligno-cellulosic biomass processed in a pre-treatment process, and  
an added liquid which has been added to the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass after the pre-treatment process,  
wherein the weight percent of the dry matter content of the composition by  
15 weight of the total amount of the composition is in the range of 1 to 60 weight percent;
- B) Ceasing to expose the composition to the vacuum condition so that the amount of  
the gas in the product is less than the amount of the gas present prior to the vacuum  
20 exposure and the amount of water insoluble carbohydrates prior to the vacuum exposure is the same as the amount of water insoluble carbohydrates after exposure to the vacuum.
39. The product of claim 38 , wherein the vacuum condition is less than an absolute  
25 pressure measured in millibar (mbar) selected from the group consisting of 950, 900, 850, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 30, 20, 10, 5, and 0.5 mBar.
40. The product of any one of claims 38 and 39, wherein the weight percent of dry matter of the composition by weight of the total amount of the composition is in a range selected

from the group consisting of 1 to 50, 1 to 40, 1 to 36, 1 to 30, 1 to 25, 1 to 20, 1 to 15, 1 to 10, and 5 to 40.

41. The product of any one of claims 38 to 40, wherein the step of exposing the composition to the vacuum condition includes maintaining the exposure of the composition to the vacuum condition for a minimum time selected from the group consisting of 5 minutes, 10 minutes, 20 minutes, 30 minutes, 45 minutes, and 60 minutes.

42. The product of any one of claims 38 to 41, wherein the exposure to the vacuum condition is conducted in a temperature range consisting of a temperature range selected from the group consisting of 15 to 55 °C, 15 to 50 °C, 15 to 45 °C, 15 to 35 °C, and 15 to 30 °C.

43. The product of any one of claims 38 to 42, wherein the added liquid is void of a catalyst capable of hydrolyzing the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass.

44. The product of any one of claims 38 to 43, wherein the added liquid comprises C5's which were separated from the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass as part of the pre-treatment of the water insoluble pre-treated ligno-cellulosic biomass.

45. The product of any one of claims 38 to 44, wherein the added liquid further comprises a hydrolysis product made from the catalytic hydrolysis of a similarly composed pre-treated ligno-cellulosic biomass.

46. The product of any one of claims 38 to 45, wherein the step of exposing the composition to the vacuum condition is conducted using a cylinder with a screw inside the cylinder.

47. The product of any one of claims 38 to 46, wherein the process is a continuous process.

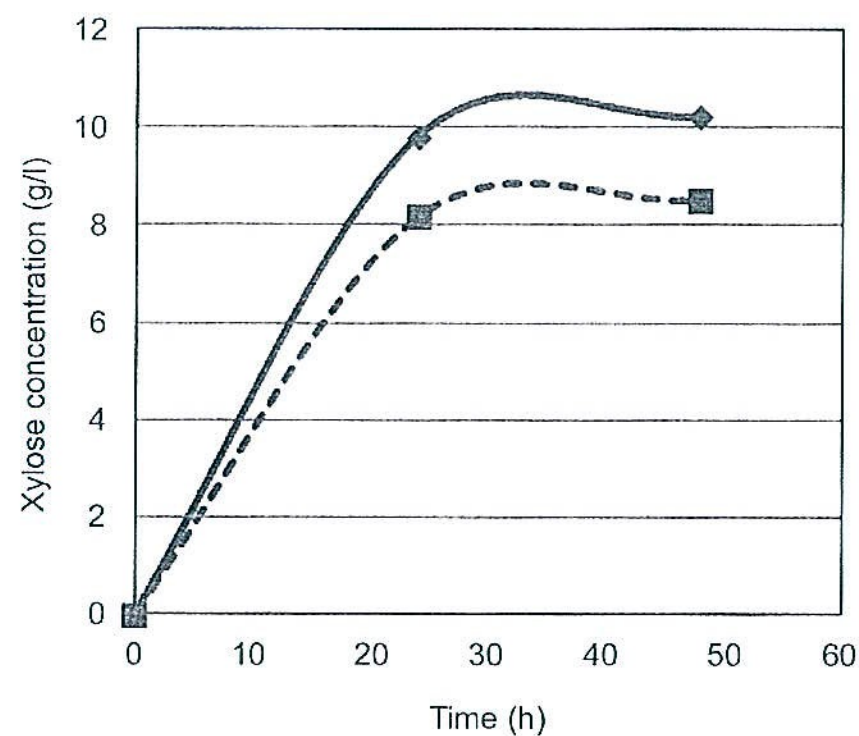
## 38

48. The product of any one of claims 38 to 47, wherein the composition prior to exposure to the vacuum condition is void of ammonia.

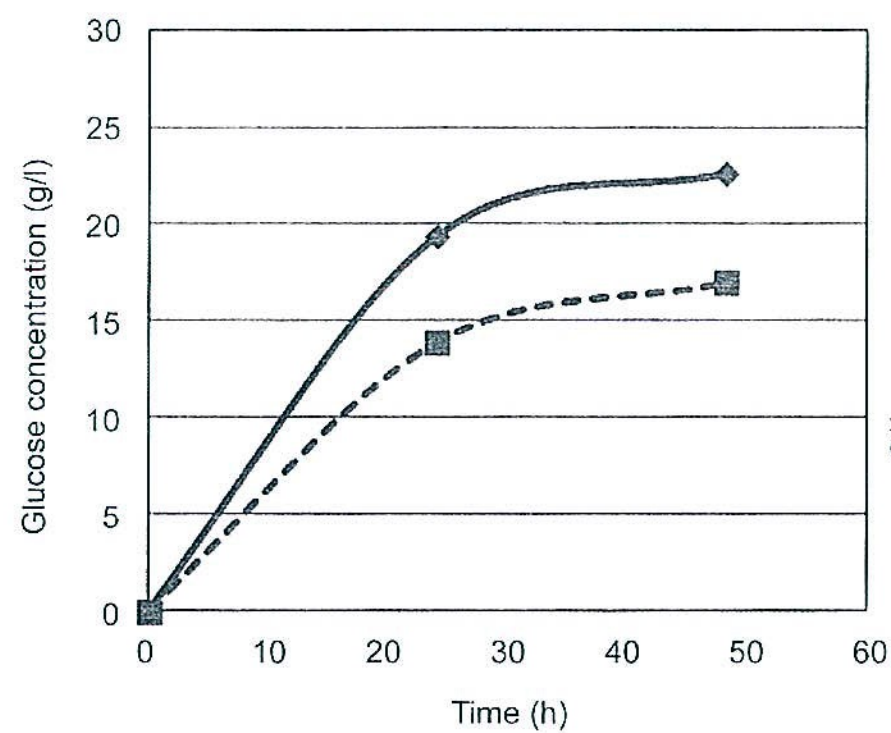
49. The product of any one of claims 38 to 47, wherein the pre-treatment process did not  
5 use ammonia to pre-treat the ligno-cellulosic biomass.



## EXAMPLE 1: 5 mg Protein/gram global cellulose



—◆— with vacuum treatment  
-■- without vacuum treatment

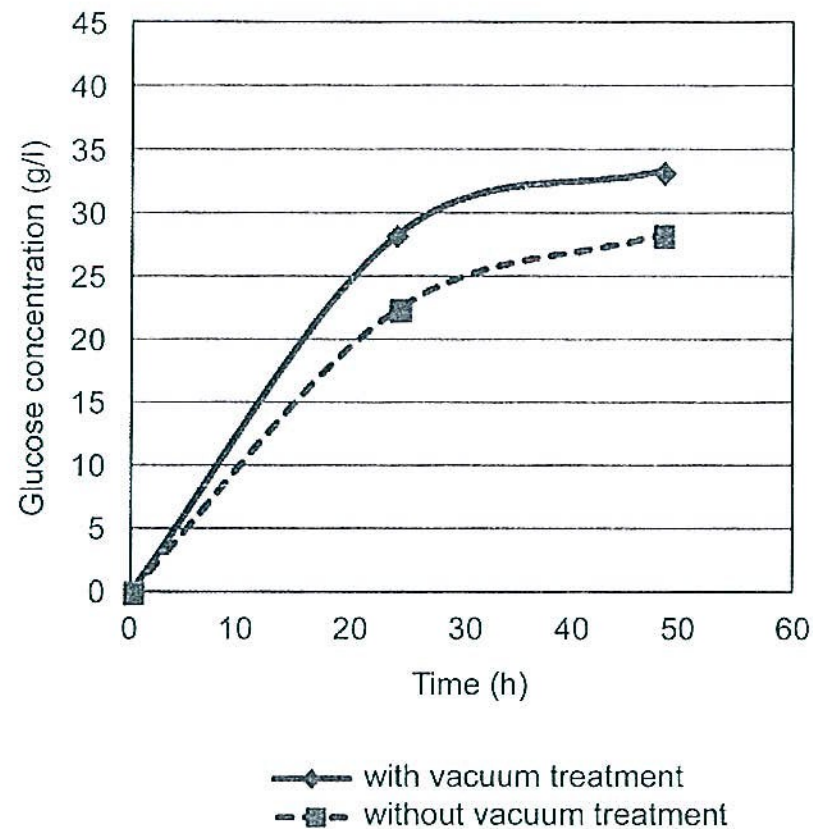
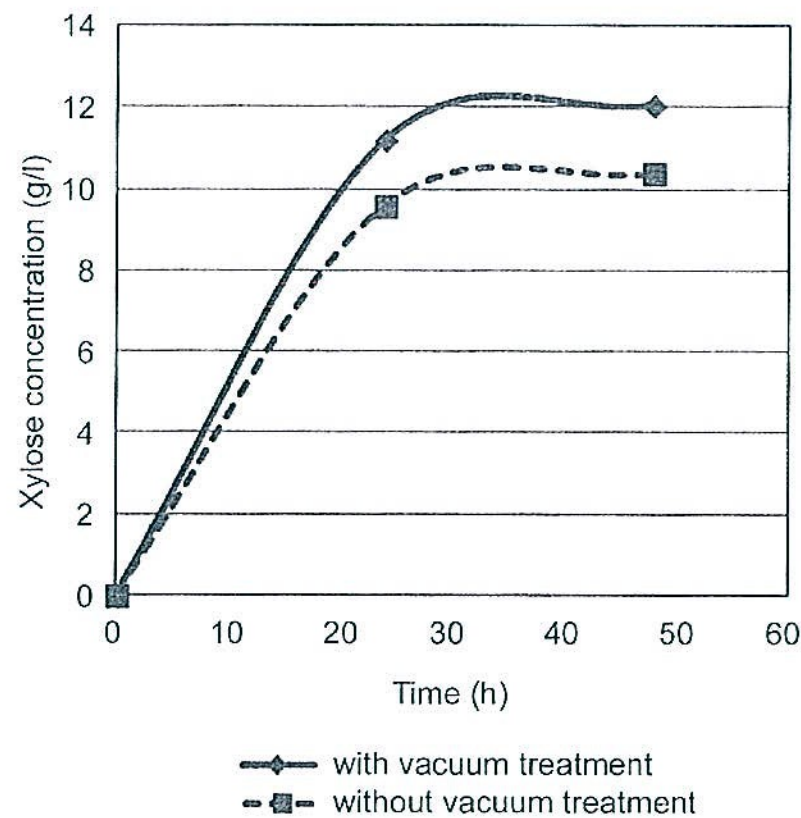


—◆— with vacuum treatment  
-■- without vacuum treatment

FIG. 1

# EXAMPLE 2: 7.5 mg Protein/gram global cellulose

WO 2013/092881

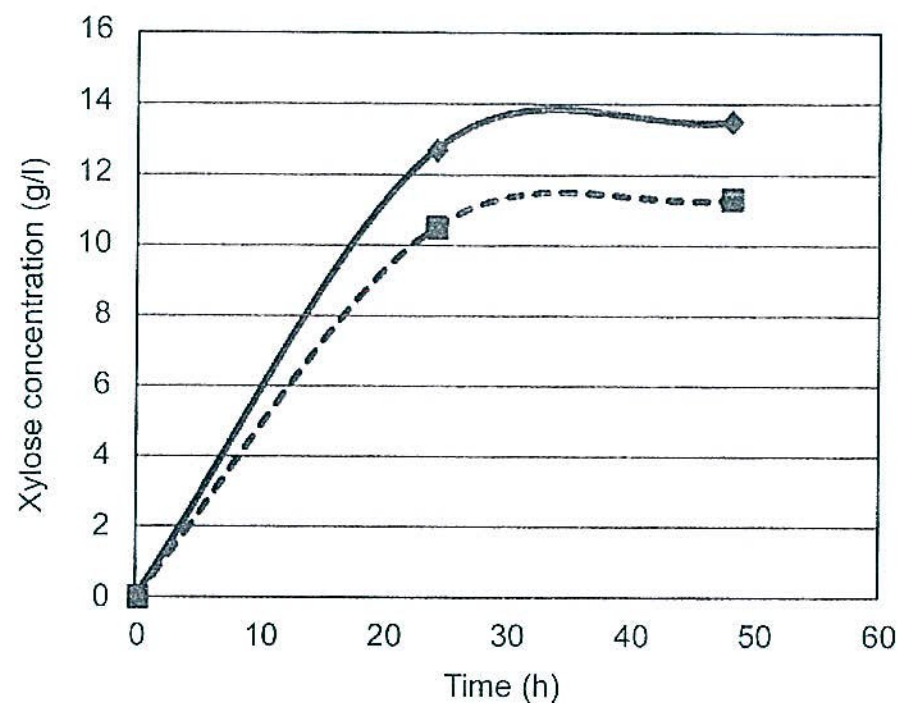


2/5

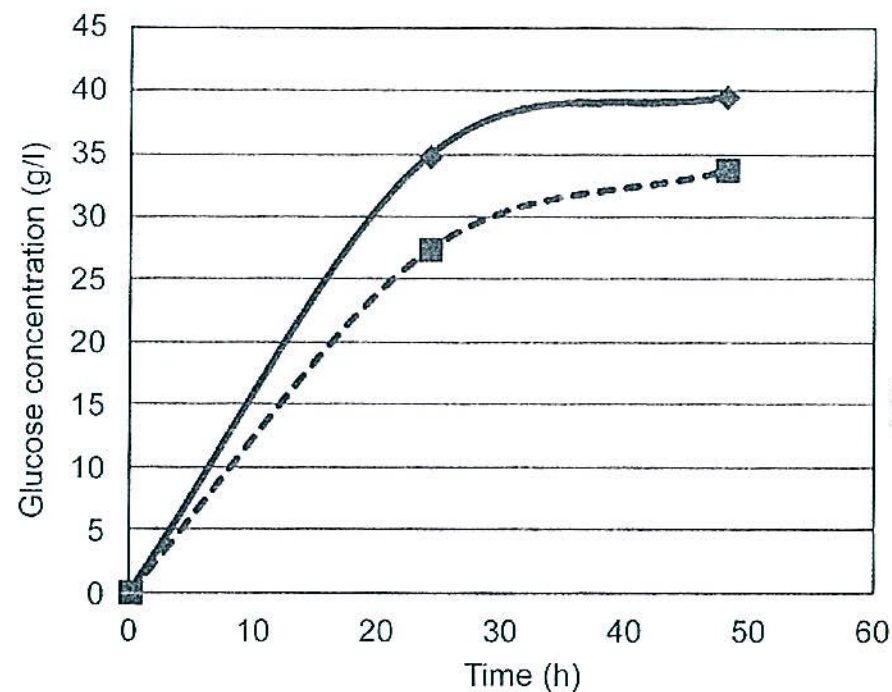
PCT/EP2012/076419

FIG. 2

# EXAMPLE 3: 10 mg Protein/gram global cellulose



—◆— with vacuum treatment  
 -■- without vacuum treatment



—◆— with vacuum treatment  
 -■- without vacuum treatment

FIG. 3



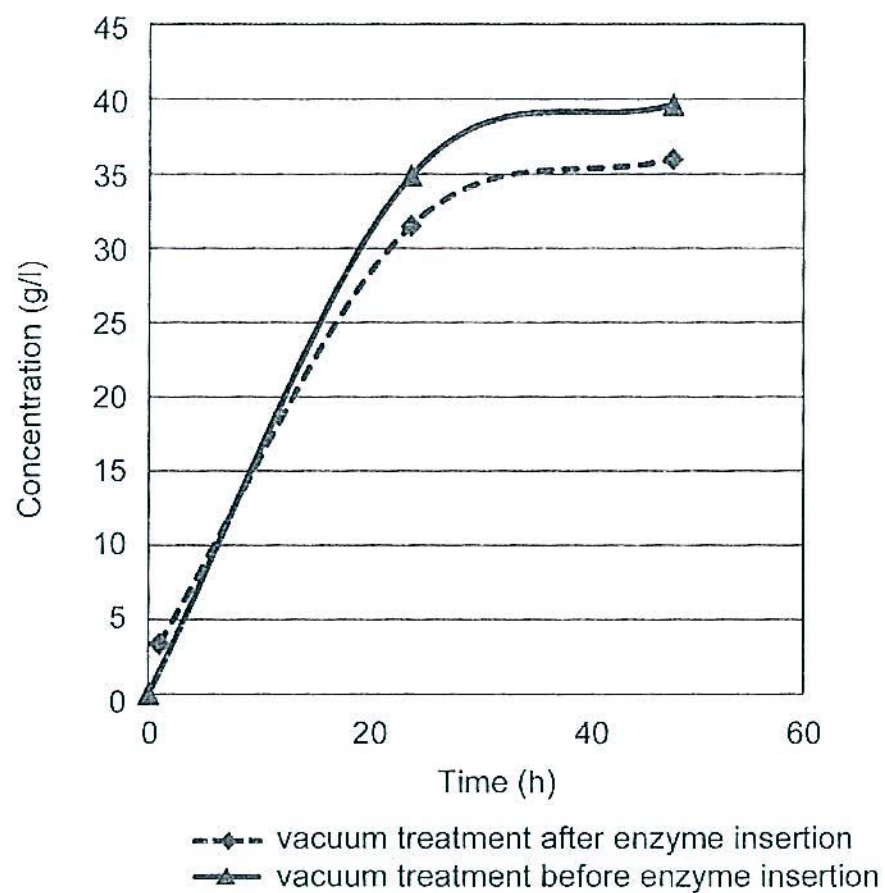
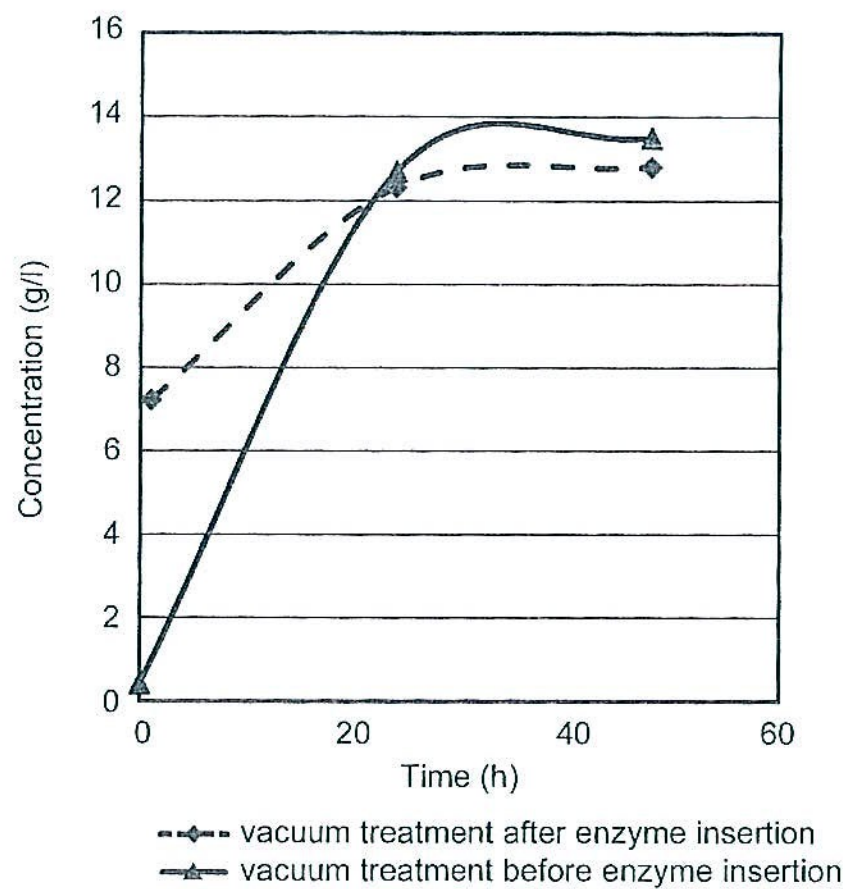


FIG. 4

# EXAMPLE 5: 10 mg Protein/gram global cellulose

WO 2013/092881

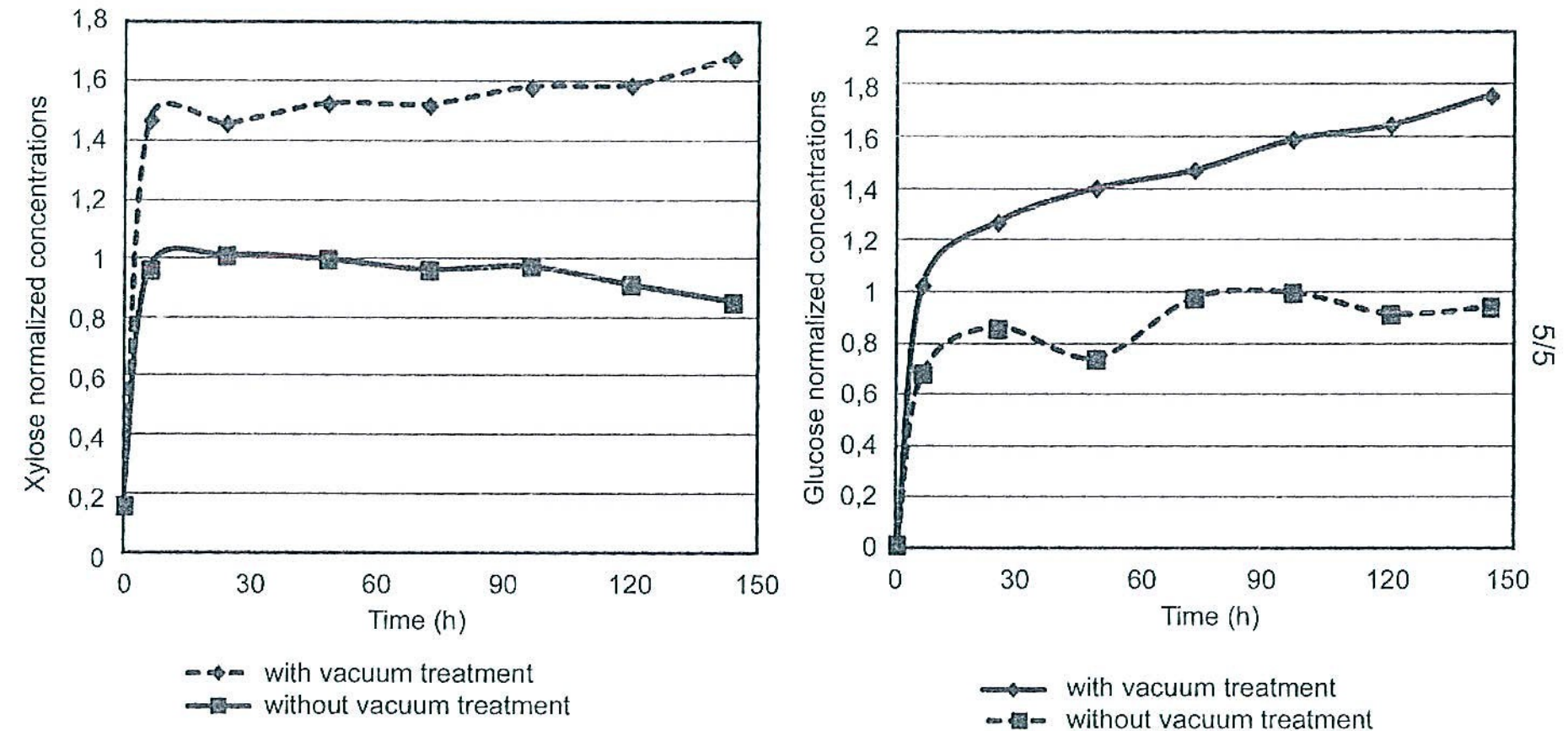


FIG. 5

PCT/EP2012/076419

# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

|                                                           |                                                                                               |                                                                |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br><b>PC1183AG</b>  | <b>FOR FURTHER ACTION</b><br>see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below. |                                                                |
| International application No.<br><b>PCT/EP2012/076419</b> | International filing date (day/month/year)<br><b>20/12/2012</b>                               | (Earliest) Priority Date (day/month/year)<br><b>21/12/2011</b> |
| Applicant<br><b>BETA RENEWABLES S.P.A.</b>                |                                                                                               |                                                                |

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

#### 1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed  
☐ a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant  
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant  
☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. \_\_\_\_\_  
☐ as suggested by the applicant  
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure  
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention  
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2012/076419

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>INV. C12P19/02 D21C1/10 D21C9/00<br>ADD.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                  |                                                                  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                  |                                                                  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C12P D21C                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                  |                                                                  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                  |                                                                  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, EMBASE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                  |                                                                  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                  |                                                                  |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                               | Relevant to claim No.                                            |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | WO 2009/046538 A1 (SUNOPTA BIOPROCESS INC [CA]; BURKE MURRAY J [CA]; SAVILLE BRADLEY [CA]) 16 April 2009 (2009-04-16)<br>cited in the application<br>claims 1-35 | 38-49                                                            |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | US 2009/053777 A1 (HENNESSEY SUSAN MARIE [US] ET AL HENNESSEY SUSAN M [US] ET AL) 26 February 2009 (2009-02-26)<br>cited in the application<br>claims 1-27       | 38-49                                                            |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | US 2009/098617 A1 (BRADLEY S; BURK M J; BURKE M; BURKE M J; CLAUDIA I; ISHIZAWA C; SAVILL) 16 April 2009 (2009-04-16)<br>claims 1-35                             | 38-49                                                            |
| -/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                  |                                                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                  |                                                                  |
| * Special categories of cited documents :<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                                                                                                  |                                                                  |
| Date of the actual completion of the international search<br>12 June 2013                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                  | Date of mailing of the international search report<br>24/06/2013 |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                  | Authorized officer<br>Siatou, Evangelia                          |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2012/076419

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                               |                       |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                            | Relevant to claim No. |
| X                                                    | WO 2009/046537 A1 (SUNOPTA BIOPROCESS INC [CA]; BURKE MURRAY J [CA]; SAVILLE BRADLEY [CA]) 16 April 2009 (2009-04-16)<br>claims 1-30<br>----- | 38-49                 |



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/076419

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 2009046538 A1                          | 16-04-2009          | AU 2008310260 A1           | 16-04-2009          |
|                                           |                     | CA 2701862 A1              | 16-04-2009          |
|                                           |                     | CN 101855359 A             | 06-10-2010          |
|                                           |                     | EP 2207888 A1              | 21-07-2010          |
|                                           |                     | JP 2012504937 A            | 01-03-2012          |
|                                           |                     | RU 2010116358 A            | 10-12-2011          |
|                                           |                     | US 2009098617 A1           | 16-04-2009          |
|                                           |                     | WO 2009046538 A1           | 16-04-2009          |
| -----                                     |                     |                            |                     |
| US 2009053777 A1                          | 26-02-2009          | AT 546542 T                | 15-03-2012          |
|                                           |                     | AU 2008307304 A1           | 09-04-2009          |
|                                           |                     | CA 2693125 A1              | 09-04-2009          |
|                                           |                     | CN 101849018 A             | 29-09-2010          |
|                                           |                     | EP 2179048 A2              | 28-04-2010          |
|                                           |                     | ES 2382575 T3              | 11-06-2012          |
|                                           |                     | JP 2010536375 A            | 02-12-2010          |
|                                           |                     | US 2009053777 A1           | 26-02-2009          |
|                                           |                     | WO 2009045651 A2           | 09-04-2009          |
| -----                                     |                     |                            |                     |
| US 2009098617 A1                          | 16-04-2009          | AU 2008310260 A1           | 16-04-2009          |
|                                           |                     | CA 2701862 A1              | 16-04-2009          |
|                                           |                     | CN 101855359 A             | 06-10-2010          |
|                                           |                     | EP 2207888 A1              | 21-07-2010          |
|                                           |                     | JP 2012504937 A            | 01-03-2012          |
|                                           |                     | RU 2010116358 A            | 10-12-2011          |
|                                           |                     | US 2009098617 A1           | 16-04-2009          |
|                                           |                     | WO 2009046538 A1           | 16-04-2009          |
| -----                                     |                     |                            |                     |
| WO 2009046537 A1                          | 16-04-2009          | AU 2008310259 A1           | 16-04-2009          |
|                                           |                     | CA 2701965 A1              | 16-04-2009          |
|                                           |                     | CN 101855360 A             | 06-10-2010          |
|                                           |                     | EP 2207889 A1              | 21-07-2010          |
|                                           |                     | JP 2012504936 A            | 01-03-2012          |
|                                           |                     | RU 2010117586 A            | 10-12-2011          |
|                                           |                     | US 2009098618 A1           | 16-04-2009          |
|                                           |                     | WO 2009046537 A1           | 16-04-2009          |
| -----                                     |                     |                            |                     |



# PATENT COOPERATION TREATY

From the  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

59  
118  
Form 2012/12/12

## PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY  
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing  
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference  
see form PCT/ISA/220

**FOR FURTHER ACTION**  
See paragraph 2 below

International application No.  
PCT/EP2012076419

International filing date (day/month/year)  
20.12.2012

Priority date (day/month/year)  
21.12.2011

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC  
INV. C12P19/02 D21C1/10 D21C9/00

Applicant  
BETA RENEWABLES S.P.A.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office  
Gitschiner Str. 103  
D-10958 Berlin  
Tel. +49 30 25901 - 0  
Fax: +49 30 25901 - 840

Date of completion of  
this opinion

see form  
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Siatou, Evangelia

Telephone No. +49 30 25901-327



60

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.  
PCT/EP2012/076419

**Box No. I Basis of the opinion**

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
  - ☒ the international application in the language in which it was filed
  - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
  - a. (means)
    - ☐ on paper
    - ☐ in electronic form
  - b. (time)
    - ☐ in the international application as filed
    - ☐ together with the international application in electronic form
    - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

|                               |             |              |
|-------------------------------|-------------|--------------|
| Novelty (N)                   | Yes: Claims | <u>1-37</u>  |
|                               | No: Claims  | <u>38-49</u> |
| Inventive step (IS)           | Yes: Claims | <u>1-37</u>  |
|                               | No: Claims  | <u>38-49</u> |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims | <u>1-49</u>  |
|                               | No: Claims  |              |

2. Citations and explanations

see separate sheet



Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

**1. Cited references**

Reference is made to the following documents:

- D1 WO 2009/046538 A1 (SUNOPTA BIOPROCESS INC [CA]; BURKE MURRAY J [CA]; SAVILLE BRADLEY [CA]) 16 April 2009 (2009-04-16)
- D2 US 2009/053777 A1 (HENNESSEY SUSAN MARIE [US] ET AL HENNESSEY SUSAN M [US] ET AL) 26 February 2009 (2009-02-26)
- D3 US 2009/098617 A1 (BRADLEY S; BURK M J; BURKE M; BURKE M J; CLAUDIA I; ISHIZAWA C; SAVILL) 16 April 2009 (2009-04-16)
- D4 WO 2009/046537 A1 (SUNOPTA BIOPROCESS INC [CA]; BURKE MURRAY J [CA]; SAVILLE BRADLEY [CA]) 16 April 2009 (2009-04-16)

**2. Novelty**

**2.1** The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 38-49 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

Claims directed to products which are defined in terms of a process for their manufacture are only allowable if there is no other information available in the application which could be used to define the product satisfactorily by reference to its composition, structure or some other testable parameter and if the products per se fulfil the requirements for patentability, (i.e. if they are new and inventive). A product is not rendered novel merely by the fact that it is produced by means of a novel process. In this case, it does not appear that the product is novel over documents D1-D4, all of which disclose a product comprising glucose and obtained by the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material (see relevant passages cited in the search report).

**2.2** Novel present claims 1-36 is acknowledged as none of the cited prior art documents discloses a process for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material to obtain a glucose containing product, wherein vacuum is applied before hydrolysis of the lignocellulosic material, then stopped, and hydrolysis follows.



### 3. Inventive step

**3.1** An inventive step (art. 33(3) PCT) can also be acknowledged for the subject matter of present claim 1. The reasons for that are the following.

Any one of documents D1-D4 can be considered to represent the prior art closest to the subject-matter of claim 1, and disclose a process for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material to obtain a glucose containing product. Vacuum is applied during enzymatic hydrolysis of the lignocellulosic material (see relevant passages cited in the search report).

The subject-matter of claim 1 therefore differs from this known process in that vacuum is applied before hydrolysis of the lignocellulosic material, then stopped, and hydrolysis follows. The subject matter of present claim 1 is therefore new.

The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as providing a process for hydrolysis of lignocellulosic material having increased yield of glucose in the product.

Example 4 and Fig 4 of the present application demonstrate a comparison of glucose yield between the process where vacuum is applied before (process claimed) and during hydrolysis (process of prior art). It is shown that application of vacuum before hydrolysis increases glucose yield in the product. An increase in glucose yield is demonstrated for the process presently claimed. Thus, the problem solved has indeed been solved.

**3.2** The same reasoning applies, *mutatis mutandis*, to the subject-matter of the corresponding independent claims 16 and 27, which therefore are also considered to be inventive.

**3.3.** Dependent claims 2-15, 17-26, 28-37 are dependent on claims 1, 16 and 27 respectively and thus also fulfill the requirements of novelty and inventive step.

### 4. Clarity

**a.** The term "added liquid" used in claim 1 is vague and unclear and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical feature to which it refers, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claim unclear.

**b.** The same objection applies to the term "free liquid" used in claims 16 and 27 of the present application.

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING  
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2012/076419

c. The term "catalyst .... capable of hydrolysing the water insoluble pre-treated lignocellulosic biomass" used in claims 1, 16 and 27 is vague and unclear and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical feature to which it refers, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claims unclear. Moreover, support in the description can only be found for the catalyst being an enzyme, and catalytic hydrolysis being enzymatic hydrolysis.



## UN PASO DE PREHIDRÓLISIS MEJORADO QUE INVOLUCRA VACÍO

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5            Tanto el documento US 2009/0053777 Al como el WO 2009/046538 Al consideran ambos el uso de vacío en varias partes de un proceso de conversión de una biomasa.

          En el orden de los pasos de procesamiento, el documento US 2009/0053777 Al describe un Reactor de  
10    Pretratamiento e Hidrólisis Enzimática al cual puede aplicarse vacío y presión al recipiente de reacción, uniendo fuentes externas a la abertura conectada a la lanceta.

          El documento US 2009/0053777 Al describe además, un reactor de pistón de cañón grande, de un cañón de acero  
15    inoxidable de 5.1 cm x 68.6 cm equipado con un pistón, orientado horizontalmente. El cañón de 68.6 cm estaba equipado con ocho aberturas de uso múltiple, permitiendo la aplicación de vacío, la inyección de amoníaco acuoso, inyección de vapor y la inserción de termopares para la  
20    medición de la temperatura dentro del cañón. El cañón del reactor se unió directamente a un tanque de evaporación instantánea de acero inoxidable, de 15.2 cm x 61 cm, orientado verticalmente. Los sólidos pretratados se dirigieron hacia abajo hacia el fondo del tanque de  
25    evaporación instantánea, en donde los sólidos se eliminaron fácilmente, retirando los pernos de una brida con extremo con forma de domo en el fondo del tanque.

          El uso de vacío se describe cuando se aplicó un vacío al recipiente del reactor y al receptor de evaporación  
30    instantánea para llevar la presión a <10 kPa, y una solución diluida de hidróxido de amonio se inyectó en el reactor. Una



vez que se cargó el amoniaco, se inyectó vapor en el reactor, para llevar la temperatura a 145°C. La mezcla se descargó a continuación en el tanque de evaporación instantánea precalentado, activando el pistón. El vacío se extrajo en el  
5 tanque de evaporación instantánea hasta que el receptor de evaporación instantánea alcanzó ~59°C. Tras la recolección del receptor de evaporación instantánea, el líquido libre se separó de los sólidos pretratados y no se agregaron nuevamente para la sacarificación.

10 El documento WO 2009/046538 A1, titulado TRATAMIENTO ENZIMÁTICO BAJO VACÍO, DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS, es autodescriptivo. La hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica se hace bajo vacío, para eliminar los inhibidores, para fomentar la reacción  
15 enzimática.

Es uso de vacío en estas referencias es por razones muy específicas y bajo condiciones muy específicas. Ninguna de estas referencias describe o vuelve no inventivo el proceso y las eficiencias descritas en la porción de la  
20 descripción de esta especificación.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Se describe en esta especificación, un paso de  
25 prehidrólisis mejorado que involucra vacío, con una modalidad que comprende los pasos de

A) Exponer una composición a una condición de vacío,

en donde la composición tiene un contenido de  
30 materia seca, y

la composición comprende una biomasa

lignocelulósica pretratada insoluble en agua, producida de una biomasa lignocelulósica procesada en un proceso de pretratamiento, y

un líquido agregado que es agregado a la biomasa  
5 lignocelulósica pretratada insoluble en agua, después del proceso de pretratamiento,

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  
10 en peso;

B) Dejar de exponer la composición a la condición de vacío,

C) Agregar al menos un catalizador a la composición, en donde el catalizador es capaz de hidrolizar  
15 la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua en la composición,

D) Realizar una hidrólisis catalítica de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua en la composición.

20 En otra modalidad, la composición carece de líquido libre. En otra modalidad, la composición comprende un líquido libre.

Se describe además, que el paso de exponer la composición a una condición de vacío y el paso de realizar  
25 una hidrólisis catalítica no se realizan en el mismo recipiente.

Se describe además, que la condición de vacío puede ser menor que una presión absoluta medida en milibar (mbar), seleccionada del grupo que consiste de 950, 900, 850, 800,  
30 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 30, 20, 10, 5 y 0.5 mBar.



Se describe además, que el por ciento en peso de la materia seca de la composición en peso de la cantidad total de la composición, puede estar en un intervalo seleccionado del grupo que consiste de 1 a 50, 1 a 40, 1 a 36, 1 a 30, 1 a 25, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10 y 5 a 40.

También se describe que el paso de exponer la composición a la condición de vacío puede incluir mantener la exposición de la composición a la condición de vacío, durante un tiempo mínimo seleccionado del grupo que consiste de 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 45 minutos y 60 minutos.

También se describe que la exposición a la condición de vacío puede realizarse en un intervalo de temperatura que consiste de un intervalo de temperatura seleccionado del grupo que consiste de 15 a 55°C, 15 a 50°C, 15 a 45°C, 15 a 35°C y 15 a 30°C.

Se describe además que la composición y/o el líquido agregado puede carecer de un catalizador capaz de hidrolizar la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua. También se describe que el catalizador puede comprender una enzima y que la hidrólisis catalítica puede ser una hidrólisis enzimática.

Se describe además que el líquido agregado puede comprender C5, que se separaron de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, como parte del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua.

También se describe que el líquido agregado puede comprender además, un producto de la hidrólisis, hecho de la hidrólisis enzimática de una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, compuesta de manera similar.

Se describe además que el paso de exponer la



composición a la condición de vacío, puede realizarse utilizando un cilindro con un tornillo dentro del cilindro, también conocido como un extrusor.

5 También se describe que la realización de la hidrólisis catalítica no se hace bajo ninguna condición de vacío.

También se describe que el proceso puede ser continuo y que la composición carece de amoníaco y que el proceso de pretratamiento puede carecer de amoníaco.

10

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 compara la cantidad de xilosa y glucosa generada con el tiempo, mediante la hidrólisis enzimática de una composición que comprende una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, que se ha expuesto a una condición de vacío antes de la hidrólisis enzimática con una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, de la misma composición, que no se ha expuesto a una condición de vacío antes de la hidrólisis enzimática a la concentración de la enzima especificada.

La Figura 2 compara la cantidad de xilosa y glucosa generada con el tiempo mediante la hidrólisis enzimática de una composición que comprende una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, que se ha expuesto a una condición de vacío antes de la hidrólisis enzimática con una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua de la misma composición, que no se ha expuesto a una condición de vacío antes de la hidrólisis enzimática a la concentración de la enzima especificada.

La Figura 3 compara la cantidad de xilosa y glucosa

generada con el tiempo mediante la hidrólisis enzimática de una composición que comprende una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, que se ha expuesto a una condición de vacío antes de la hidrólisis enzimática con una  
5 biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua de la misma composición, que no se ha expuesto a una condición de vacío antes de la hidrólisis enzimática a la concentración de la enzima especificada.

La Figura 4 compara la cantidad de xilosa y glucosa  
10 generada con el tiempo mediante la hidrólisis enzimática de una composición que comprende una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, que se ha expuesto a una condición de vacío antes de la hidrólisis enzimática sin enzimas con una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble  
15 en agua de la misma composición, que se ha expuesto a una condición de vacío con enzimas antes de la hidrólisis enzimática a la concentración de la enzima especificada.

La Figura 5 compara la cantidad relativa de xilosa y glucosa generada con el tiempo mediante la hidrólisis  
20 enzimática de una composición que comprende una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, que se ha expuesto a una condición de vacío antes de la hidrólisis enzimática sin enzimas con una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua de la misma composición, que no  
25 se ha expuesto a una condición de vacío antes de la hidrólisis enzimática a la concentración de la enzima especificada.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30

Esta especificación describe un proceso para



incrementar la recuperación de glucosa de una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, aplicando vacío a una composición que comprende la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, durante un corto periodo de tiempo. Como se describe a continuación, la composición que comprende la biomasa lignocelulósica insoluble en agua puede incluir además, un líquido agregado (también referido como un primer líquido agregado), líquido libre o carecer del líquido libre.

Lo que se ha descubierto y discutido en la sección experimental es que cuando una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua se expone a una condición de vacío bajo un líquido, tal como agua, la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua se hincha y expande a aproximadamente 140% de su volumen original y a continuación, una vez que se libera el gas atrapado de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, se colapsa nuevamente a aproximadamente 80% de su volumen original. Aunque el vacío bajo líquido es una modalidad preferida, la exposición de la composición que comprende la biomasa lignocelulósica insoluble en agua, pero que carece de líquido libre o líquido agregado, a una condición de vacío, es otra modalidad de la invención.

Los experimentos establecen que, de manera contraria a la técnica previa, los catalizadores, tales como enzimas para la hidrólisis enzimática, no son necesarios durante el paso de vacío, para penetrar además en la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua. Las enzimas u otros catalizadores de la hidrólisis, tales como ácidos o bases pueden agregarse después de que se rompe el vacío. El rendimiento de los azúcares es el mismo, ya sea que el vacío



se realice bajo agua o bajo agua con enzimas.

Los experimentos también establecen que el paso de vacío se realiza de manera preferida, bajo o en un líquido, de manera preferida, agua. Los experimentos realizados en la  
5 biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua sin agregar líquido, o en la ausencia de un líquido libre, tenían rendimientos del azúcar mucho menores que aquellos experimentos en donde el vacío se aplicó en la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, en la presencia  
10 de una cantidad de líquido. Aunque se prefiere exponer la composición a la condición de vacío en la presencia de un líquido, o bajo un líquido, la exposición de la composición sin líquido es todavía mejor que no exponer para nada la composición a vacío.

15 Los datos experimentales también establecen que el paso de realizar la hidrólisis catalítica, tal como la hidrólisis enzimática bajo vacío, puede evitarse, si el vacío se aplica antes de la hidrólisis catalítica, tal como la hidrólisis enzimática, incluso si sólo es durante 10 minutos.

20 Con este conocimiento establecido experimentalmente, el proceso comprende por lo tanto, exponer primero una composición a una condición de vacío. Una composición adecuada comprende una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua. Una biomasa lignocelulósica  
25 pretratada insoluble en agua significa que al menos una porción de la biomasa es insoluble en agua y que la biomasa lignocelulósica natural original utilizada para derivar la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua se ha sometido a un procesamiento (pretratamiento), para cambiar  
30 sus características químicas o físicas, de aquéllas encontradas en la naturaleza.

El primer paso de crear una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua es utilizar una biomasa lignocelulósica. Una biomasa lignocelulósica preferida puede describirse como sigue: Aparte de almidón, los tres  
5 constituyentes principales en la biomasa de plantas son celulosa, hemicelulosa y lignina, que son referidos comúnmente mediante el término genérico de lignocelulosa. Las biombrasas que contienen polisacáridos como un término genérico incluyen tanto almidón como biombrasas lignocelulósicas. Por lo  
10 tanto, algunos tipos de materias primas pueden ser biomasa de plantas, biomasa que contiene polisacáridos y biomasa lignocelulósica.

Las biombrasas que contienen polisacáridos de acuerdo con la presente invención incluyen cualquier material que  
15 contenga azúcares poliméricos, por ejemplo, en la forma de almidón, así como almidón refinado, celulosa y hemicelulosa.

Los tipos relevantes de biombrasas naturales para derivar la invención reclamada, pueden incluir biombrasas derivadas de cosechas agrícolas, seleccionadas del grupo que  
20 consiste de granos que contienen almidón, almidón refinado; rastrojo de maíz, bagazo, paja, por ejemplo, de arroz, trigo, centeno, avena, cebada, colza, sorgo; madera blanda, por ejemplo, *Pinussylvestris*, *Pinus radiate*; madera dura, por ejemplo, *Salix spp.*, *Eucalyptus spp.*; tubérculos, por  
25 ejemplo, remolacha, papa; cereales de, por ejemplo, arroz, trigo, centeno, avena, cebada, colza, sorgo y maíz; papel de desecho, fracciones de fibra del procesamiento del biogas, estiércol, residuos del procesamiento del aceite de palma, residuos sólidos municipales o lo similar. Aunque los  
30 experimentos están limitados a unos cuantos ejemplos de la lista enumerada anterior, se cree que la invención es



aplicable a todos, debido a que la caracterización es principalmente para las características únicas de la lignina y el área superficial.

La materia prima de la biomasa lignocelulósica  
5 utilizada en el proceso, es de manera preferida, de la familia llamada usualmente de los pastos. El nombre apropiado es la familia conocida como Poáceas o Gramíneas en la Clase Liliópsida (las monocotiledóneas) de las plantas que florecen. Las plantas de esta familia son usualmente  
10 llamadas pastos, o para distinguirlas de otros graminoides, pastos verdaderos. El bambú también está incluido. Hay aproximadamente 600 géneros y algo como 9,000-10,000 o más especies de pastos (Índice Kew de Especies de Pastos en el Mundo).

15 Las poáceas incluyen los granos y las cosechas de cereales alimenticios básicos, cultivados alrededor del mundo, césped y pastos forrajeros y bambú. Las poáceas generalmente tienen tallos huecos llamados cañas, que están tapadas (sólidas) a intervalos llamados nodos, los puntos a  
20 lo largo de la caña en los cuales surgen las hojas. Las hojas del pasto son usualmente alternadas, dísticas (en un plano) o raramente en espiral y con venas paralelas. Cada hoja está diferenciada en un vaina inferior que abraza el tallo una distancia, y un limbo con márgenes usualmente  
25 enteros. Los limbos de muchos pastos están endurecidos con fitolitos de sílice, lo que ayuda a desalentar a los animales de pastoreo. En algunos pastos (tales como la espadaña), esto hace a los bordes del limbo suficientemente afilados como para cortar la piel humana. Un apéndice membranoso o  
30 mechón de pelos o fibras, llamado la lígula, yace en la junta entre la vaina y el limbo, evitando que el agua o los



insectos penetren en la vaina.

Los limbos del pasto crecen en la base del limbo y no de las puntas alargadas del tallo. Este punto de crecimiento lento evolucionó en respuesta a los animales de pastoreo y permite que los pastos sean pastoreados o segados regularmente, sin un daño severo a la planta.

Las flores de las poáceas están dispuestas de manera característica en *espiguillas*, cada espiguilla tiene uno o más ramilletes (las espiguillas están agrupadas además, en panículas o espigas). Una espiguilla consiste de dos (o algunas veces menos) brácteas en la base, llamadas *glumas*, seguidas por uno o más ramilletes. Un ramillete consiste de la flor rodeada por dos brácteas llamadas el *lema* (la externa) y el *pálea* (la interna). Las flores son usualmente hermafroditas (el maíz, monoico, es una excepción) y la polinización es casi siempre anemófila. El periantio está reducido a dos escamas, llamadas lodículos, que se expanden y contraen para dispersar el lema y el pálea; éstos son interpretados generalmente como sépalos modificados.

El fruto de las poáceas es una carióspside en la cual el recubrimiento de la semilla está fusionado a la pared del fruto y así, no se separa del mismo (como en el grano del maíz).

Hay tres clasificaciones generales del hábito de crecimiento en los pastos; el tipo de matas (también llamado cespitoso), estolonífero y rizomático.

El éxito de los pastos yace en parte, en su morfología y procesos de crecimiento, y en parte en su diversidad fisiológica. La mayoría de los pastos se dividen en dos grupos fisiológicos, que utilizan las trayectorias fotosintéticas C3 y C4 para la fijación del carbono. Los

pastos C4 tienen una trayectoria fotosintética relacionada con la anatomía especializada de la hoja de Kranz, que los adapta particularmente a los climas cálidos y a una atmósfera baja en dióxido de carbono.

5                    Los pastos C3 son referidos como "pastos de la estación fría", mientras que las plantas C4 son consideradas "pastos de la estación cálida". Los pastos pueden ser anuales o perennes. Los ejemplos de la estación fría anuales son trigo, centeno, pasto azul anual (poa de los prados  
10                    anual, *Poa annua* y avena). Los ejemplos de la estación fría perennes son pasto ovinillo (dáctilo, *Dactylis glomerata*), festuca (*Festuca spp.*), Pasto Azul de Kentucky y ballico perenne (*Lolium perenne*). Los ejemplos de la estación cálida anuales son maíz, pasto de Sudán y mijo perla. Los ejemplos  
15                    de la estación cálida perennes son big bluestem (*Andropogon gerardii*), pasto de la India, pasto de bermuda y pasto varilla.

                    Una clasificación de la familia de los pastos reconoce doce subfamilias: Éstas son 1) anomochlooideae, un  
20                    linaje pequeño de pastos de hoja ancha que incluye dos géneros (*Anomochloa*, *Streptochaeta*); 2) Pharoideae, un pequeño linaje de pastos que incluye tres géneros, incluyendo *Pharus* y *Leptaspis*; 3) Puelioideae, un pequeño linaje que incluye el género africano *Puelia*; 4) Pooideae que incluye el  
25                    trigo, cebada, avenas, cebadilla (*Bronnus*) y carrizos (*Calamagrostis*); 5) Bambusoideae, que incluye el bambú; 6) Ehrhartoidae, que incluye el arroz y arroz silvestre; 7) Arundinoideae, que incluye el carrizo gigante y el carrizo común; 8) Centothecoideae, una pequeña subfamilia de 11  
30                    géneros que es incluida algunas veces en Panicoideae; 9) Chloridoideae, que incluye el capinannoni (*Eragrostis*,



aproximadamente 350 especies, incluyendo el teff), hierba de la pradera (*Sporobolus*, unas 160 especies), mijo dedo (*Eleusinecoracana* (L.) Gaertn.), y los pastos de muhly (*Muhlenbergia*, aproximadamente 175 especies); 10) 5 Panicoideae, incluyendo pasto de arroz, maíz, sorgo, caña de azúcar, la mayoría de los mijos, fonio y pastos bluestem; 11) Micrairoideae; 12) Danthoniodieae, incluyendo el pasto de las pampas; con *Poa* que es un género de aproximadamente 500 especies de pastos, nativos de las regiones templadas de 10 ambos hemisferios.

Los pastos agrícolas cultivados por sus semillas comestibles son llamados cereales. Tres cereales comunes son el arroz, trigo y maíz. De todas las cosechas, 70% son pastos.

15 La caña de azúcar es la fuente principal de la producción de azúcar. Los pastos se utilizan para la construcción. Los andamios hechos de bambú son capaces de soportar los vientos con fuerza de tifón que romperían los andamios de acero. Los bambúes más largos y *Arundo donax* 20 tienen cañas robustas que pueden utilizarse de una manera similar a la madera, y las raíces del pasto estabilizan el adobe de las casas de adobe. *Arundo* se utiliza para hacer cañas para instrumentos de viento de madera, y el bambú se utiliza para innumerables implementos.

25 La materia prima de la biomasa lignocelulósica puede también ser de plantas leñosas o maderas. Una planta leñosa es una planta que utiliza la madera como su tejido estructural. Estas son típicamente, plantas perennes cuyos tallos y raíces más grandes están reforzados con madera 30 producida adyacente a los tejidos vasculares. El tallo principal, las ramas más grandes y las raíces de estas

plantas estas cubiertas usualmente por una capa de corteza engrosada. Las plantas leñosas son usualmente árboles, arbustos o lianas. La madera es una adaptación celular estructural que permite que las plantas leñosas crezcan de tallos por encima del suelo años tras año, haciendo así a algunas plantas leñosas, las plantas más largas y altas.

Estas plantas necesitan un sistema vascular para mover el agua y los nutrientes de las raíces a las hojas (xilema) y para mover los azúcares de las hojas al resto de la planta (floema). Existen dos clases de xilema: el primario, que es formado durante el crecimiento primario del procambio y el xilema secundario, que se forma durante el crecimiento secundario del cambio vascular.

Lo que se llama usualmente "madera" es el xilema secundario de tales plantas.

Los dos grupos principales en los que pueden encontrarse el xilema secundario son:

1) coníferas (*Coniferae*), hay unas seiscientas especies de coníferas. Todas las especies tienen xilema secundario, que es relativamente uniforme en estructura a través de este grupo. Muchas coníferas se vuelven árboles altos: el xilema secundario de tales árboles se comercializa como madera blanda.

2) angiospermas (*Angiospermae*), hay de un cuarto de millón a cuatrocientas mil especies de angiospermas. Dentro de este grupo, el xilema secundario no se ha encontrado en las monocotiledóneas (por ejemplo, Poáceas). Muchas angiospermas no monocotiledóneas se vuelven árboles, y el xilema secundario de éstas se comercializa como madera dura.

El término madera blanda se utiliza para describir



la madera de los árboles que pertenecen a las gimnospermas. Las gimnospermas son plantas con semillas descubiertas, no encerradas en un ovario. Estos "frutos" de semillas son considerados más primitivos que las maderas duras. Los  
5 árboles de madera blanda son usualmente siempre verdes, tienen piñas y tienen hojas como agujas o escamas. Incluyen especies de coníferas, por ejemplo, pino, píceas, abetos, y cedros. La dureza de la madera varía entre la especie de conífera.

10 El término madera dura se utiliza para describir la madera de árboles que pertenecen a la familia de las angiospermas. Las angiospermas son plantas con óvulos encerrados para la protección en un ovario. Cuando se fertilizan, estos óvulos se desarrollan en semillas. Los  
15 árboles de madera dura son usualmente de hoja ancha; en latitudes templadas y boreales, son principalmente de hoja caduca, pero en los trópicos y subtrópicos son principalmente siempre verdes. Estas hojas pueden ser simples (limbos únicos) o pueden estar compuestas con hojitas unidas a un  
20 tallo de la hoja. Aunque de forma variable, las hojas de la madera dura tienen una red distintiva de venas finas. Las plantas de madera dura incluyen, por ejemplo, álamo, abedul, cerezo, arce, roble y teca.

Por lo tanto, una biomasa lignocelulósica preferida  
25 puede ser seleccionada del grupo que consiste de los pastos y maderas. Una biomasa lignocelulósica preferida puede ser seleccionada del grupo que consiste de las plantas que pertenecen a las familias de coníferas, angiospermas, Poáceas y/o Gramíneas. Otra biomasa lignocelulósica preferida  
30 también puede ser una biomasa que tenga al menos 10% en peso de su materia seca como celulosa, o de manera más preferida,

al menos 5% en peso de su materia seca como celulosa.

La biomasa lignocelulósica también comprenderá carbohidratos seleccionados del grupo de carbohidratos basados en los monómeros de glucosa, xilosa y mannososa. Ser derivado de la biomasa lignocelulósica, significa que la biomasa lignocelulósica de la corriente de alimentación comprenderá glucanos y xilanos y lignina.

Los glucanos incluyen los monómeros, dímeros y polímeros del glucano en la biomasa lignocelulósica. De interés particular es el 1,4 beta glucano, que es particular para la celulosa, en oposición al 1,4 alfa glucano. La cantidad de 1,4 beta glucanos presentes en la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, debe ser al menos 5% en peso de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, en una base seca, de manera más preferida, al menos 10% en peso de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, en una base seca, y de manera aún más preferida, al menos 15% en peso de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, en una base seca. Los xilanos incluyen los monómeros, dímeros, oligómeros y polímeros de xilano en la composición de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua.

Aunque la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua puede estar libre de almidón, sustancialmente libre de almidón, o tener un contenido de almidón de 0, el almidón, si está presente, puede ser menor que 75% en peso del contenido seco. No hay un intervalo preferido de almidón, puesto que se cree que su presencia no afecta la hidrólisis a glucosa. Los intervalos para la cantidad de almidón, si está presente, están entre 0 y 75% en peso del contenido seco, 0 a 50% en peso del contenido seco,



0 a 30% en peso del contenido seco y 0 a 25% en peso del contenido seco.

Debido a que esta invención es la hidrólisis de la glucosa, la especificación y los inventores creen que cualquier biomasa lignocelulósica con 1,4 beta glucanos puede utilizarse como una materia prima para este proceso de hidrólisis mejorado.

El proceso de pretratamiento utilizado en la biomasa lignocelulósica natural puede ser cualquier proceso de pretratamiento conocido en la técnica y aquéllos a ser inventados en el futuro, o el pretratamiento puede ser una serie de procesos.

La materia prima de la biomasa lignocelulósica puede también ser de plantas leñosas. Una planta leñosa es una planta que utiliza la madera como su tejido estructural. Estas son típicamente, plantas perennes cuyos tallos y raíces más grandes están reforzados con madera producida adyacente a los tejidos vasculares. El tallo principal, las ramas más grandes y las raíces de estas plantas estas cubiertas usualmente por una capa de corteza engrosada. Las plantas leñosas son usualmente árboles, arbustos o lianas. La madera es una adaptación celular estructural que permite que las plantas leñosas crezcan de tallos por encima del suelo años tras año, haciendo así a algunas plantas leñosas, las plantas más largas y altas.

Estas plantas necesitan un sistema vascular para mover el agua y los nutrientes de las raíces a las hojas (xilema) y para mover los azúcares de las hojas al resto de la planta (floema). Existen dos clases de xilema: el primario, que es formado durante el crecimiento primario del procambio y el xilema secundario, que se forma durante el

81  
crecimiento secundario del cambio vascular. Lo que se llama usualmente "madera" es el xilema secundario de tales plantas.

Los dos grupos principales en los que pueden encontrarse el xilema secundario son:

5                   1) coníferas (*Coniferae*), hay unas seiscientas especies de coníferas. Todas las especies tienen xilema secundario, que es relativamente uniforme en estructura a través de este grupo. Muchas coníferas se vuelven árboles altos: el xilema secundario de tales árboles se comercializa  
10 como madera blanda.

2) angiospermas (*Angiospermae*), hay de un cuarto de millón a cuatrocientas mil especies de angiospermas. Dentro de este grupo, el xilema secundario no se ha encontrado en las monocotiledóneas (por ejemplo, Poáceas).  
15 Muchas angiospermas no monocotiledóneas se vuelven árboles, y el xilema secundario de éstas se comercializa como madera dura.

El término madera blanda se utiliza para describir la madera de los árboles que pertenecen a las gimnospermas.  
20 Las gimnospermas son plantas con semillas descubiertas, no encerradas en un ovario. Estos "frutos" de semillas son considerados más primitivos que las maderas duras. Los árboles de madera blanda son usualmente siempre verdes, tienen piñas y tienen hojas como agujas o escamas. Incluyen  
25 especies de coníferas, por ejemplo, pino, píceas, abetos, y cedros. La dureza de la madera varía entre la especie de conífera.

El término madera dura se utiliza para describir la madera de árboles que pertenecen a la familia de las angiospermas. Las angiospermas son plantas con óvulos  
30 encerrados para la protección en un ovario. Cuando se



fertilizan, estos óvulos se desarrollan en semillas. Los árboles de madera dura son usualmente de hoja ancha; en latitudes templadas y boreales, son principalmente de hoja caduca, pero en los trópicos y subtrópicos son principalmente siempre verdes. Estas hojas pueden ser simples (limbos únicos) o pueden estar compuestas con hojitas unidas a un tallo de la hoja. Aunque de forma variable, las hojas de la madera dura tienen una red distintiva de venas finas. Las plantas de madera dura incluyen, por ejemplo, álamo, abedul, cerezo, arce, roble y teca.

Como un ejemplo, el proceso de pretratamiento puede incluir el remojo seguido por la explosión por vapor. Por ejemplo, el proceso de pretratamiento puede incluir cualquier proceso o procesos diferentes a la explosión por vapor. El proceso de pretratamiento puede no incluir la explosión por vapor. El proceso de pretratamiento puede incluir la explosión por vapor. La explosión por vapor puede ser el último paso del proceso de pretratamiento. La explosión por vapor en un receptor de evaporación instantánea, el enfriamiento del contenido del receptor y la separación del líquido libre, puede ser el último paso del proceso de pretratamiento. El proceso de pretratamiento puede incluir extracción supercrítica.

El proceso de pretratamiento utilizado para pretratar la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, se utiliza para asegurar que la estructura del contenido lignocelulósico se vuelva más accesible a los catalizadores, tales como enzimas, y al mismo tiempo, las concentraciones de los subproductos inhibidores dañinos, tales como ácido acético, furfural e hidroximetil furfural, permanezcan sustancialmente bajas.

Algunas de las estrategias actuales de pretratamiento son someter el material lignocelulósico a temperaturas de entre 110-250°C durante 1-60 minutos, por ejemplo:

5 Extracción en agua caliente

Hidrólisis ácida diluida en múltiples etapas, que elimina el material disuelto antes de que se formen las sustancias inhibidoras

10 Hidrólisis ácida diluida a condiciones de severidad relativamente baja

Oxidación alcalina en húmedo

Explosión por vapor

Casi cualquier pretratamiento con desintoxicación subsiguiente

15 Si se elige un pretratamiento hidrotérmico, se prefieren las siguientes condiciones:

20 Temperatura de pretratamiento: 110-250°C, de manera preferida 120-240°C, de manera más preferida 130-230°C, de manera más preferida 140-220°C, de manera más preferida 150-210°C, de manera más preferida 160-200°C, aún de manera más preferida 170-200°C o de manera aún más preferida, 180-200°C.

25 Tiempo de pretratamiento: 1-60 minutos, de manera preferida 2-55 minutos, de manera más preferida 3-50 minutos, de manera más preferida 4-45 minutos, de manera más preferida 5-40 minutos, de manera más preferida 5-35 minutos, de manera más preferida 5-30 minutos, de manera más preferida 5-25 minutos, de manera más preferida 5-20 minutos y de manera aún más preferida, 5-15 minutos.

30 El contenido de materia seca después del pretratamiento es de manera preferida, al menos 20%



(peso/peso). Otros límites más altos preferidos están contemplados, puesto que la cantidad de biomasa a agua en la materia prima lignocelulósica pretratada insoluble en agua en la relación, varía de 1:4 a 9:1 ; 1:3.9 a 9: 1, 1:3.5 a 9:1, 5 1:3.25 a 9:1, 1:3 a 9:1, 1:2.9 a 9:1, 1:2 a 9:1, 1:1.5 a 9:1, 1:1 a 9:1 y 1:0.9 a 9:1.

Las biomosas que contienen polisacáridos de acuerdo con la presente invención incluyen cualquier material que contenga azúcares poliméricos, por ejemplo, en la forma de almidón, así como almidón refinado, celulosa y hemicelulosa. Sin embargo, como se discutió anteriormente, el almidón no es un componente primario.

Un proceso de pretratamiento preferido es el de dos pasos de remojo para extraer los C5, seguido por la explosión por vapor, como se describe a continuación.

Un pretratamiento preferido de una biomasa lignocelulósica natural, incluye el remojo de la materia prima de la biomasa lignocelulósica natural, seguido por una explosión por vapor, de al menos una parte de la materia prima de la biomasa lignocelulósica natural remojada.

El remojo ocurre en una sustancia tal como agua en forma de vapor, vapor o forma líquida o líquido y vapor juntos, para producir un producto. El producto es una biomasa remojada que contiene un primer líquido, con el primer líquido que es usualmente agua en su forma líquida o vapor o alguna mezcla.

Este remojo puede hacerse mediante varias técnicas que exponen una sustancia a agua, que podría ser un vapor o líquido o mezcla de vapor y agua, o más generalmente, a agua a alta temperatura y alta presión. La temperatura debe estar en uno de los siguientes intervalos: 145 a 165°C, 120 a

210°C, 140 a 210°C, 150 a 200°C, 155 a 185°C, 160 a 180°C. Aunque el tiempo podría ser mayor, tal como hasta, pero menor que 24 horas, o menor que 16 horas, o menor que 12 horas, o menor que 9 horas o menor que 6 horas; el tiempo de exposición es de manera preferida, muy corto, variando de 1 minuto a 6 horas, de 1 minuto a 4 horas, de 1 minuto a 3 horas, de 1 minuto a 2.5 horas, de manera más preferida 5 minutos a 1.5 horas, 5 minutos a 1 hora, 15 minutos a 1 hora.

Si se utiliza vapor, es de manera preferida, saturado, pero podría ser sobrecalentado. El paso de remojo puede ser en lotes o continuo, con o sin agitación. Puede utilizarse un remojo a baja temperatura antes del remojo a alta temperatura. La temperatura del remojo a baja temperatura está en el intervalo de 25 a 90°C. Aunque el tiempo podría ser más largo, tal como hasta, pero menor que 24 horas, o menor que 16 horas, o menor que 12 horas, o menor que 9 horas o menor que 6 horas; el tiempo de exposición es de manera preferida, muy corto, variando de 1 minuto a 6 horas, de 1 minuto a 4 horas, de 1 minuto a 3 horas, de 1 minuto a 2.5 horas, de manera más preferida 5 minutos a 1.5 horas, 5 minutos a 1 hora, 15 minutos a 1 hora.

Aunque se prefiere evitar los ácidos o bases, cualquier paso de remojo podría incluir también la adición de otros compuestos, por ejemplo.  $H_2SO_4$ ,  $NH_3$ , con el fin de lograr un mayor desempeño más tarde en el proceso.

El producto que comprende el primer líquido es pasado a continuación a un paso de separación, en donde el primer líquido es separado de la biomasa remojada. El líquido no se separará completamente, de manera que al menos una porción del líquido se separa, con de manera preferida, tanto líquido como sea posible en un marco de tiempo



económico. El líquido de este paso de separación es conocido como la corriente del primer líquido, que comprende el primer líquido. El primer líquido será el líquido utilizado en el remojo, generalmente agua y las especies solubles de la materia prima. Estas especies solubles en agua son glucano, xilano, galactano, arabinano, glucolígomeros, xiloolígomeros, galactolígomeros y arabinolígomeros. La biomasa sólida se llama la corriente del primer sólido, puesto que contiene la mayoría, si no es que todos los sólidos.

La separación del líquido puede hacerse nuevamente mediante técnicas conocidas y probablemente, algunas que aún no se han inventado. Una pieza preferida del equipo es una prensa, puesto que una prensa generará un líquido bajo alta presión.

También se conoce prerremojarse la biomasa lignocelulósica antes del remojo, para eliminar los C5.

La corriente del primer sólido se hace explotar por vapor a continuación, para crear una corriente explotada por vapor, que comprende sólidos y un segundo líquido. La explosión por vapor es una técnica bien conocida en el campo de la biomasa y se cree que cualquiera de los sistemas disponibles actualmente y en el futuro, son adecuados para este paso. La severidad de la explosión por vapor es conocida en la literatura como  $R_o$ , y es una función del tiempo y la temperatura y se expresa como

$$R_o = t \exp[(T-100)/14.75]$$

con la temperatura,  $T$  expresada en Celsius y el tiempo,  $t$ , expresado en unidades comunes.

La fórmula también se expresa como  $\log(R_o)$ , a saber

$$\text{Log}(\text{Ro}) = \text{Ln}(t) + [(T-100)/14.75].$$

Log(Ro) está de manera preferida, en los intervalos  
5 de 2.8 a 5.3, 3 a 5.3, 3 a 5.0 y 3 a 4.3.

La corriente explotada por vapor puede lavarse  
opcionalmente al menos con agua y puede haber otros aditivos  
utilizados también. Es concebible que pueda utilizarse otro  
líquido en el futuro, de manera que no se cree que el agua  
10 sea absolutamente esencial. En este punto, el agua es el  
líquido preferido y si se utiliza agua, se considera el  
tercer líquido. El efluente líquido del lavado opcional es  
la tercera corriente del líquido. Este paso de lavado no se  
considera esencial y es opcional.

15 La corriente explotada lavada se procesa a  
continuación para eliminar al menos una porción del líquido  
en el material explotado lavado. Este paso de separación  
también es opcional. El término al menos una porción se  
elimina, es para recordar que aunque la eliminación de tanto  
20 líquido como sea posible es deseable (prensado), es  
improbable que sea posible la eliminación al 100%. En  
cualquier caso, la eliminación del 100% del agua no es  
deseable, puesto que el agua se necesita para la reacción de  
hidrólisis subsiguiente. El proceso preferido para este paso  
25 es nuevamente una prensa, pero se cree que otras técnicas  
conocidas y aquéllas no inventadas aún, son adecuadas. Los  
productos separados de este proceso son sólidos en la segunda  
corriente de sólidos y líquidos en la segunda corriente de  
líquidos.

30 La composición para el proceso inventado tendrá un  
contenido de materia seca que es el material después de la



eliminación del agua y otros volátiles, secando a un nivel de al menos, menor que 50 ppm de humedad. El contenido de materia seca se mide mediante los procedimientos descritos en "Preparation of Samples for Compositional Analysis", Laboratory Analytical Procedure (LAP), Fecha de Expedición: 5 9/28/2005, Reporte Técnico NREL/TP-510-42620, Enero 2008.

En una modalidad, la composición antes del vacío tendrá una cantidad de líquido libre del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, que no 10 se ha separado de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, después del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua. Por ejemplo, en algunos procesos de explosión por vapor, se sabe que puede haber un líquido libre de los vapores condensados. Por 15 líquido libre, se quiere decir un líquido que puede separarse de los sólidos de la composición, decantando la composición. Si el líquido libre se elimina de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua después del pretratamiento, algo, si no es que todo el líquido libre puede volverse a 20 agregar a la composición, y todavía estar dentro del alcance de la invención.

La composición también comprenderá además, al menos un gas, que puede ser aire o un gas o mezcla of gases utilizados en el proceso de pretratamiento, antes del 25 tratamiento con vacío. Este gas, usualmente aire, es atrapado en la matriz sólida de la composición. Es este gas el que es eliminado mediante la exposición de la composición a las condiciones de vacío. Como se indicó en la parte experimental, la expansión del gas es sustancial y se cree 30 que abre o rompe los poros que mantienen el gas. El volumen de la composición a condiciones atmosféricas después de la

exposición al vacío, será menor que 95% del volumen antes de la exposición, con menos que 90% del volumen siendo más preferido, y menos que 85% del volumen antes de la exposición, aún más preferido, con menos que 80% del volumen antes de la exposición siendo lo más preferido. Alguien con experiencia en la técnica puede controlar la cantidad del gas eliminado, con 95 a 100% de la eliminación del gas siendo la cantidad más preferida. Así, la composición final después de la exposición al vacío puede carecer de gas, lo que es más que 95% del gas que se ha eliminado.

La composición también comprenderá una cantidad de carbohidratos insolubles en agua, conocida como la cantidad de carbohidratos insolubles en agua antes de la exposición al vacío. Debido a que la exposición al vacío ocurre antes de la hidrólisis, se espera que la cantidad de los carbohidratos insolubles en agua antes de la exposición al vacío, sea la misma que la cantidad de carbohidratos insolubles en agua después de la exposición al vacío.

En otra modalidad, la composición carecerá del líquido libre, en particular, el líquido libre generado o utilizado durante el proceso de pretratamiento. Por ejemplo, una explosión por vapor en lotes puede tener líquidos libres, mientras que una explosión por vapor continua, usualmente no tiene líquidos libres. En otra modalidad, la composición tendrá una cantidad de líquido libre, pero el proceso de pretratamiento no incluirá un paso de explosión por vapor. La composición de esta modalidad podría comprender además, un líquido libre y un líquido agregado, como se discute a continuación.

La composición en otra modalidad, comprende además, un líquido agregado. Usualmente el líquido agregado



comprende agua, o es agua. La cantidad del líquido agregado depende de la cantidad necesaria para reducir el contenido de materia seca al porcentaje especificado de la masa total. El contenido de materia seca debería ser el por ciento en peso de la materia seca de la composición en peso, de la cantidad total de la composición y debería estar en el intervalo de 1 a 60. Otros contenidos de materia seca de la composición es un por ciento en peso de materia seca de la composición en peso, de la cantidad total de la composición, están en un intervalo seleccionado del grupo que consiste de 1 a 50, 1 a 40, 1 a 36, 1 a 30, 1 a 25, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10 y 5 a 40, todos expresados en por ciento en peso de la materia seca, en comparación con composición total.

Nótese que el contenido de materia seca no sólo es el peso de la composición menos el agua de la composición, puesto que durante la prueba de secado, los volátiles tales como el furfural, hidroximetil furfural (HMF) y el ácido acético se eliminarán.

Es preferible que la composición esté de amoníaco, ácidos agregados y/o bases agregadas u otros reactivos del proceso, que se han agregado o utilizado durante el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, puesto que no son necesarios en un proceso de pretratamiento diseñado de manera apropiada y crean problemas para el procesamiento corriente abajo. También se prefiere que el proceso de pretratamiento no utilice amoníaco, ácidos agregados y/o bases agregadas u otros reactivos del proceso, que se han agregado o utilizado durante el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica.

Después de asegurar la composición, la composición se expone a una condición de vacío, que podría ocurrir en

cualquier tipo de equipo capaz de mantener un vacío. La fuente de vacío podría ser chorros de vacío, bombas de vacío, eyectores, aspiradores y cualquier otra fuente de vacío conocida y aquéllas a ser inventadas aún.

5           Un método preferido de exponer la composición a la condición de vacío es realizar la exposición en un extrusor, con frecuencia llamado un extrusor a vacío. Esta pieza de equipo utiliza un tornillo, con frecuencia llamado un tornillo de transporte y/o tornillo, dentro de un cilindro,  
10       para transportar la composición a través de la zona de vacío del aparato del cilindro.

          La condición de vacío es menor que la presión atmosférica que es una presión absoluta medida en milibar (mbar), menor que 1013.25 milibar, y puede ser seleccionada  
15       del grupo que consiste de 950, 900, 850, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 30, 20, 10, 5 y 0.5 mBar.

          La exposición de la composición a la condición de vacío también puede realizarse en un intervalo de temperatura que consiste de un intervalo de temperatura seleccionado del  
20       grupo que consiste de 15 a 55°C, 15 a 50°C, 15 a 45°C, 15 a 35°C y 15 a 30°C.

          El paso de exponer la composición a la condición de vacío puede incluir además, mantener la exposición de la composición a la condición de vacío durante un tiempo mínimo  
25       seleccionado del grupo que consiste de 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 45 minutos y 60 minutos. Si se desea un tiempo de exposición máximo, el tiempo debería ser no más que 600 minutos.

          Debido a que no es necesario realizar la hidrólisis catalítica, en particular la hidrólisis enzimática, bajo una  
30       condición de vacío, la composición carece sustancialmente de



manera preferida, o carece de catalizadores capaces de hidrolizar catalíticamente la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua. Carecer sustancialmente significa que cualquier actividad catalítica es 5% o menor  
5 que la actividad catalítica utilizada en el paso de la hidrólisis catalítica. Las enzimas son catalizadores para la hidrólisis conocidos, y en el caso de las enzimas, la hidrólisis catalítica se conoce como hidrólisis enzimática.

También se prefiere que el líquido agregado  
10 comprenda los C5, que se separaron de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, como parte del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua antes de la explosión por vapor. En algunos procesos de pretratamiento, se conoce remojar o  
15 extraer de otra manera los C5, que son los componentes de arabinano y xilano e incluyen los monómeros, dímeros, oligómeros y polímeros de arabinosa y xilosa. Esta eliminación de C5 se hace con frecuencia antes de la explosión por vapor.

También se conoce combinar la biomasa  
20 lignocelulósica pretratada insoluble en agua con un producto que se ha hidrolizado previamente, que tiene una composición de la hidrólisis similar, el proceso puede comprender además, un producto de la hidrólisis hecho de la hidrólisis  
25 enzimática de una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, compuesta de manera similar, si no es el producto de la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua.

Después de la exposición a la condición de vacío,  
30 el vacío se rompe, que es el paso de dejar de exponer la composición a la condición de vacío. Así, esto puede hacerse

aislando la fuente de vacío de la composición y eliminando el vacío de la composición, o en el caso del extrusor, moviendo la composición fuera de la zona de vacío del cilindro del extrusor y hacia una zona diferente, que no está bajo condiciones de vacío o incluso descargándola del extrusor a un tanque u otro recipiente.

Después de que se rompe la exposición a la condición de vacío, se realiza la hidrólisis catalítica, en particular enzimática, en la composición, agregando al menos una enzima capaz de realizar una hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua en la composición.

Se prefiere que la hidrólisis catalítica no se realice en el mismo recipiente en que se realiza la condición de vacío. En una escala industrial, el recipiente de la hidrólisis catalítica es un recipiente grande. Por lo tanto, la realización de la hidrólisis catalítica bajo vacío requerirá un recipiente grande que tenga partes móviles para agitar el caldo de la hidrólisis y capaz de sustentar el vacío. Al realizar la hidrólisis bajo vacío, se incurriría en costos adicionales.

La composición puede exponerse al vacío en un equipo separado, en el cual la composición es transportada por un tornillo. Una persona con experiencia en la técnica reconocerá que este equipo es menos caro que un recipiente grande, capaz de realizar la hidrólisis catalítica bajo vacío. Está contemplado que la hidrólisis catalítica, y en particular enzimática, no se haga bajo ninguna condición de vacío.

Parte Experimental



### Preparación de la muestra

La preparación de la muestra es común para todos los ejemplos reportados, si no se explica de manera diferente.

- 5           La paja de trigo se sometió a un tratamiento hidrotérmico (remojo) a una temperatura de 155°C durante un tiempo de 65 minutos y a continuación se separó en una corriente de líquidos y una corriente de sólidos; la corriente de sólidos se explotó por vapor a una temperatura
- 10           de 190°C durante un tiempo de 4 minutos para obtener una corriente de sólidos explotada por vapor. Los líquidos libres no se separaron de la corriente explotada por vapor.

### Tratamiento con vacío

- 15           El tratamiento con vacío se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento. La muestra se insertó en un recipiente a vacío y se selló. El recipiente se evacuó por medio de una bomba de vacío. La presión alcanzó 30 mbar en
- 20           aproximadamente 10 segundos y a continuación se mantuvo a ese nivel durante 10 minutos.

Después del tratamiento con vacío, el vacío se rompió ventilando el recipiente a presión atmosférica.

### Hidrólisis enzimática

- 25           La hidrólisis enzimática es común para todos los ejemplos reportados, si no se explica de manera diferente.

- La corriente de la biomasa lignocelulósica tratada se insertó en un biorreactor, agitado por medio de un impulsor y se calentó hasta alcanzar una temperatura de 50°C.
- 30           El pH se corrigió a 5 por medio de una solución de KOH.

La hidrólisis enzimática se realizó insertando un

cóctel enzimático por Novozymes a una concentración determinada de proteína por gramo de la celulosa global contenido en la corriente pretratada de la biomasa lignocelulósica. En cada experimentó, se utilizó el mismo  
5 cóctel, pero en cantidades diferentes.

Se utilizaron diferentes concentraciones de enzimas en los experimentos, como se indica.

La hidrólisis enzimática se realizó durante 48 horas. Los muestreos se realizaron inmediatamente antes de  
10 la inserción de la enzima y después de un tiempo de hidrólisis de 24 horas y 48 horas desde la inserción de la enzima.

La concentración de glucosa y xilosa en la corriente hidrolizada se midió mediante HPLC estándar.

15 **Ejemplo 1**

Se preparó una muestra de control a la temperatura de 25°C, mezclando la corriente de líquidos del primer paso de pretratamiento y la corriente de sólidos explotada por vapor a una relación de líquido/sólido de 0.8, a continuación  
20 el agua se agregó hasta que se alcanzó un contenido de 10% de materia seca, basándose en la composición total, para obtener una corriente pretratada de la biomasa lignocelulósica.

Una cantidad de 1.3 Kg de la corriente pretratada de la biomasa lignocelulósica se sometió a hidrólisis  
25 enzimática a una concentración de 5 mg de proteína por gramo de la celulosa global contenida en la corriente pretratada.

Se midió una concentración de xilosa de 0.956 g/l, 8.152 g/l y 8.50 g/l inmediatamente antes de la inserción de la enzima, después de 24 horas y 48 horas, respectivamente.

30 Un concentración de glucosa de 0.113 g/l, 13.934 g/l y 17.00 g/l se midió inmediatamente antes de la inserción



de la enzima, después de 24 y 48 horas, respectivamente.

Una cantidad de 1.3 Kg de la corriente pretratada de la biomasa lignocelulósica se sometió a tratamiento con vacío a la temperatura de 25°C. Durante el tratamiento con vacío, la corriente pretratada se expandió hasta alcanzar aproximadamente 130% del volumen inicial en aproximadamente 100 segundos. Se formaron burbujas de aire macroscópicas en la corriente pretratada. Al agitar a mano el recipiente a vacío, las burbujas se eliminaron y la corriente pretratada se colapsó hasta alcanzar un volumen de aproximadamente 80% del volumen de la corriente pretratada antes del tratamiento con vacío. Después de la ventilación, la corriente pretratada evacuada se sometió a hidrólisis enzimática a una concentración de 5 mg de proteína por gramo de celulosa global contenida en la corriente pretratada.

Una concentración de xilosa de 0.321 g/l, 9.800 g/l y 10.203g/l se midió inmediatamente antes de la inserción de la enzima, después de 24 horas y 48 horas, respectivamente. Puesto que la xilosa viene del líquido del primer paso de pretratamiento, su presencia no indica una hidrólisis enzimática.

Una concentración de glucosa de 0 g/l, 19.426 g/l y 22.634 g/l se midió inmediatamente antes de la inserción de la enzima, después de 24 horas y 48 horas, respectivamente. La concentración de 0 g/l después del vacío indica que no había ocurrido hidrólisis durante el vacío y que el agua no es un reactivo del proceso.

Las concentraciones de xilosa y glucosa vs. el tiempo de la hidrólisis para la muestra de control y la muestra tratada con vacío se reportan en la Figura 1.

## Ejemplo 2

Utilizando el mismo material que en el Ejemplo 1, se preparó una muestra de control a la temperatura de 25°C, mezclando la corriente de líquidos y la corriente de sólidos explotada por vapor a una relación de líquido/sólido de 0.8, a continuación, se agregó agua hasta alcanzar un contenido de 10% de materia seca, para obtener una corriente pretratada.

Una cantidad de 1.3 Kg de la corriente pretratada se sometió a hidrólisis enzimática a una concentración de 7.5 mg de proteína por gramo de celulosa global contenida en la corriente pretratada.

Una concentración de xilosa de 0.956 g/l, 9.601 g/l y 10.402 g/l se midió inmediatamente antes de la inserción de la enzima, después de 24 horas y 48 horas, respectivamente.

Una concentración de glucosa de 0.113 g/l, 22.3 g/l y 28.231g/l se midió inmediatamente antes de la inserción de la enzima, después de 24 horas y 48 horas, respectivamente.

Una cantidad de 1.3 Kg de la corriente pretratada se sometió a un tratamiento con vacío a la temperatura de 25°C. Durante el tratamiento con vacío, la corriente pretratada se expandió hasta alcanzar aproximadamente 130% del volumen inicial en aproximadamente 100 segundos. Se formaron burbujas de aire macroscópicas en la corriente pretratada. Al agitar a mano el recipiente a vacío, las burbujas se eliminaron y la corriente pretratada se colapsó hasta alcanzar un volumen de aproximadamente 80% del volumen de la corriente pretratada antes del tratamiento con vacío. Después de la ventilación, la corriente pretratada evacuada se sometió a hidrólisis enzimática a una concentración de 7.5 mg de proteína por gramo de celulosa global contenida en la corriente pretratada.



Una concentración de xilosa de 0.451 g/l, 11.185 g/l y 12.052 g/l se midió inmediatamente antes de la inserción de la enzima, después de 24 horas y 48 horas, respectivamente.

5           Una concentración de glucosa de 0 g/l, 28.201 g/l y 33.293 g/l se midió inmediatamente antes de la inserción de la enzima, después de 24 horas y 48 horas, respectivamente.

Las concentraciones de xilosa y glucosa vs. el tiempo de la hidrólisis para la muestra de control y la  
10 muestra tratada a vacío se reportan en la Figura 2.

### Ejemplo 3

Una muestra de control de la misma biomasa lignocelulósica utilizada en los Ejemplos 1 y 2 se preparó a  
15 la temperatura de 25°C, mezclando la corriente de líquidos y la corriente de sólidos explotada por vapor a una relación líquido/sólido de 0.8, a continuación, se agregó agua hasta alcanzar un contenido de 10% de materia seca para obtener una corriente pretratada.

20           Una cantidad de 1.3 Kg del material pretratado se sometió a hidrólisis enzimática a una concentración de 10 mg de proteína por gramo de celulosa global contenida en la corriente pretratada.

Una concentración de xilosa de 0.956 g/l, 10.495  
25 g/l y 11.31g/l se midió inmediatamente antes de la inserción de la enzima, después de 24 horas y 48 horas, respectivamente.

Una concentración de glucosa de 0.113 g/l, 27.325  
30 g/l y 33.731 g/l se midió inmediatamente antes de la inserción de la enzima, después de 24 horas y 48 horas, respectivamente.

Una cantidad de 1.3 Kg de la corriente pretratada se sometió a tratamiento con vacío a la temperatura de 25°C. Durante el tratamiento con vacío, la corriente pretratada se expandió hasta alcanzar aproximadamente 130% del volumen inicial en aproximadamente 100 segundos. Se formaron burbujas de aire macroscópicas en la corriente pretratada. Al agitar a mano el recipiente a vacío, las burbujas se eliminaron y la corriente pretratada se colapsó hasta alcanzar un volumen de aproximadamente 80% del volumen de la corriente pretratada antes del tratamiento con vacío. Después de la ventilación, la corriente pretratada evacuada se sometió a hidrólisis enzimática a una concentración de 10 mg de proteína por gramo de celulosa global contenida en la corriente pretratada.

Una concentración de xilosa de 0.418 g/l, 12.698 g/l y 13.504 g/l se midió inmediatamente antes de la inserción de la enzima, después de 24 horas y 48 horas, respectivamente.

Una concentración de glucosa de 0 g/l, 34.851 g/l y 39.596 g/l se midió inmediatamente antes de la inserción de la enzima, después de 24 horas y 48 horas, respectivamente.

Las concentraciones de xilosa y glucosa vs. el tiempo de la hidrólisis para la muestra de control y la muestra tratada a vacío se reportan en la Figura 3.

#### 25 Ejemplo 4

El experimento de control corresponde a la muestra del ejemplo 3, en donde la corriente pretratada se expone a vacío antes de la inserción de la enzima.

Una cantidad de 1.3 Kg de la corriente pretratada se agregó al cóctel enzimático por Novozymes a la concentración de 10 mg de proteína por gramo de celulosa



global contenida en la corriente pretratada, a la temperatura de 25°C y a continuación se sometió a tratamiento con vacío. Durante el tratamiento con vacío, la corriente pretratada se expandió hasta alcanzar aproximadamente 130% del volumen inicial en aproximadamente 100 segundos. Se formaron burbujas de aire macroscópicas en la corriente pretratada. Al agitar a mano el recipiente a vacío, las burbujas se eliminaron y la corriente pretratada se colapsó hasta alcanzar un volumen de aproximadamente 80% del volumen de la corriente pretratada antes del tratamiento con vacío. Después de la ventilación, la corriente pretratada con el cóctel enzimático ya agregado se insertó en un biorreactor, se agitó por medio de un impulsor y se calentó hasta alcanzar una temperatura de 50°C. El pH se corrigió a 5 por medio de una solución de KOH.

La hidrólisis enzimática se realizó durante 48 horas. Los muestreos se realizaron inmediatamente antes de la inserción en el biorreactor y después de un tiempo de hidrólisis de 24 horas y 48 horas desde la inserción de la enzima.

Una concentración de xilosa de 7.23 g/l, 12.698 g/l y 12.805 g/l se midió inmediatamente antes de la inserción en el biorreactor, después de 24 horas y 48 horas, respectivamente.

Una concentración de glucosa de 3.373 g/l, 31.498 g/l y 35.971 g/l se midió inmediatamente antes de la inserción en el biorreactor, después de 24 horas y 48 horas, respectivamente. Puesto que la concentración de glucosa no es 0, es indicativo de la hidrólisis enzimática, pero esta hidrólisis ha ocurrido después de la adición de las enzimas a presión atmosférica, indicando que la hidrólisis enzimática no necesita realizarse bajo una condición de vacío, como se

indica en la técnica.

Las concentraciones de xilosa y glucosa vs. el tiempo de hidrólisis para la muestra expuesta a vacío antes de la inserción de la enzima y la muestra expuesta a vacío después de la inserción de la enzima (hidrólisis a vacío) se reportan en la Figura 4. Estos resultados muestran que la exposición a vacío de la corriente pretratada sin las enzimas, es superior a exponer a vacío la corriente pretratada con las enzimas ya agregadas; en otras palabras, de manera sorprendente, el uso de vacío para penetrar los reactivos, no funciona tan bien como utilizar vacío, eliminar el aire y a continuación agregar el reactivo del proceso.

#### Ejemplo 5

El experimento se realizó en una fuente diferente a la materia prima de paja de trigo, con respecto a los experimentos reportados previamente.

Se preparó una muestra de control a la temperatura de 25°C, mezclando la corriente de líquidos del primer pretratamiento y la corriente de sólidos explotada por vapor a una relación líquido/sólido de 0.8, a continuación se agregó agua hasta alcanzar un contenido de 10% de materia seca para obtener una corriente pretratada.

Una cantidad de 1.3 Kg del material pretratado se sometió a hidrólisis enzimática a una concentración de 10 mg de proteína por gramo de celulosa global contenida en la corriente pretratada.

Una cantidad de 1.3 Kg de la corriente pretratada se sometió a un tratamiento con vacío a la temperatura de 25°C. Durante el tratamiento con vacío, la corriente pretratada se expandió hasta alcanzar aproximadamente 130%



del volumen inicial en aproximadamente 100 segundos. Se formaron burbujas de aire macroscópicas en la corriente pretratada. Al agitar a mano el recipiente a vacío, las burbujas se eliminaron y la corriente pretratada se colapsó hasta alcanzar un volumen de aproximadamente 80% del volumen de la corriente pretratada antes del tratamiento con vacío. Después de la ventilación, la corriente pretratada evacuada de la biomasa lignocelulósica se sometió a hidrólisis enzimática a una concentración de 10 mg de proteína por gramo de celulosa global contenida en la corriente pretratada.

La hidrólisis enzimática se realizó durante una corrida de 144 horas de duración. Los muestreos se realizaron inmediatamente antes de la inserción en el biorreactor y después de un tiempo de hidrólisis de 6, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas desde la inserción de la enzima.

Las concentraciones normalizadas de xilosa y glucosa vs. el tiempo de hidrólisis para la muestra de control y la muestra tratada con vacío se reportan en la Figura 5.

Estos datos muestran la cantidad relativamente grande de xilosa y glucosa que se convierte cuando el material se ha expuesto únicamente a vacío en la presencia de agua y el líquido del pretratamiento, y al menos algo del líquido libre después de la explosión por vapor, no se ha separado de la corriente explotada por vapor.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para incrementar la recuperación de glucosa de una biomasa lignocelulósica pretratada, que  
5 comprende los pasos de

A) Exponer una composición a una condición de vacío,

en donde la composición tiene un contenido de materia seca, y

10 la composición comprende una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, producida de una biomasa lignocelulósica procesada en un proceso de pretratamiento, y

un líquido agregado que se ha agregado a la biomasa  
15 lignocelulósica pretratada insoluble en agua después del proceso de pretratamiento,

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  
20 en peso;

B) Dejar de exponer la composición a la condición de vacío,

C) Agregar al menos un catalizador a la composición, en donde el catalizador es capaz de hidrolizar  
25 la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua en la composición,

D) Realizar una hidrólisis catalítica de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua en la composición.

30 2. El proceso de conformidad con la reivindicación 1, en donde el paso A) de exponer la



composición a una condición de vacío y el paso D) de realizar la hidrólisis catalítica no se realizan en el mismo recipiente.

3. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde la condición de vacío es menor que una presión absoluta medida en milibar (mbar), seleccionada del grupo que consiste de 950, 900, 850, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 30, 20, 10, 5 y 0.5 mBar.

4. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el por ciento en peso de materia seca de la composición en peso de la cantidad total de la composición, está en un intervalo seleccionado del grupo que consiste de 1 a 50, 1 a 40, 1 a 36, 1 a 30, 1 a 25, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10 y 5 a 40.

5. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el paso de exponer la composición a la condición de vacío incluye mantener la exposición de la composición a la condición de vacío durante un tiempo mínimo seleccionado del grupo que consiste de 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 45 minutos y 60 minutos.

6. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la exposición a la condición de vacío se realiza en un intervalo de temperatura que consiste de un intervalo de temperatura seleccionado del grupo que consiste de 15 a 55°C, 15 a 50°C, 15 a 45°C, 15 a 35°C y 15 a 30°C.

7. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el líquido agregado carece de un catalizador capaz de hidrolizar la biomasa

lignocelulósica pretratada insoluble en agua.

8. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el primer líquido agregado comprende C5, que se separan de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua como parte del proceso de pretratamiento utilizado para pretratar la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua.

9. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el líquido agregado comprende además, un producto de la hidrólisis hecho de la hidrólisis catalítica de una biomasa lignocelulósica pretratada compuesta de manera similar.

10. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el paso de exponer la composición a la condición de vacío se realiza mientras que la composición es transportada con un tornillo.

11. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la realización de la hidrólisis catalítica no se hace bajo ninguna condición de vacío.

12. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el proceso es un proceso continuo.

13. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la composición, antes de la exposición a la condición de vacío, carece de amoníaco.

14. El proceso de conformidad con las reivindicaciones 1 a 13, en donde el catalizador comprende una enzima y la hidrólisis catalítica comprende hidrólisis enzimática.

15. El proceso de conformidad con cualquiera de



las reivindicaciones 1 a 14, en donde el proceso de pretratamiento no utiliza amoníaco para pretratar la biomasa lignocelulósica.

5 16. Un proceso para incrementar la recuperación de glucosa de una biomasa lignocelulósica pretratada, que comprende los pasos de

A) Exponer una composición a una condición de vacío,

10 en donde la composición tiene un contenido de materia seca, y

la composición comprende una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, en donde el por ciento en peso del contenido de materia seca de la composición en peso de la cantidad total de la composición, 15 está en el intervalo de 1 a 60 por ciento en peso, y

la composición carece de líquido libre;

B) Dejar de exponer la composición a la condición de vacío;

20 C) Agregar al menos un catalizador a la composición, en donde el catalizador es capaz de hidrolizar la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua en la composición;

25 D) Realizar una hidrólisis catalítica de la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua en la composición.

17. El proceso de conformidad con la reivindicación 16, en donde la condición de vacío es menor que una presión absoluta medida en milibar (mbar), seleccionada del grupo que consiste de 950, 900, 850, 800, 30 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 30, 20, 10, 5 y 0.5 mBar.

18. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16 y 17, en donde el por ciento en peso de materia seca de la composición en peso de la cantidad total de la composición, está en un intervalo seleccionado del grupo que consiste de 1 a 50, 1 a 40, 1 a 36, 1 a 30, 1 a 25, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10 y 5 a 40.

19. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde el paso de exponer la composición a la condición de vacío incluye mantener la exposición de la composición a la condición de vacío durante un tiempo mínimo seleccionado del grupo que consiste de 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 45 minutos y 60 minutos.

20. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en donde la exposición a la condición de vacío se realiza en un intervalo de temperatura que consiste de un intervalo de temperatura seleccionado del grupo que consiste de 15 a 55°C, 15 a 50°C, 15 a 45°C, 15 a 35°C y 15 a 30°C.

21. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en donde el paso de exponer la composición a la condición de vacío se realiza utilizando un cilindro con un tornillo dentro del cilindro.

22. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, en donde la realización de la hidrólisis catalítica no se hace bajo ninguna condición de vacío.

23. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, en donde el proceso es un proceso continuo.

24. El proceso de conformidad con cualquiera de



las reivindicaciones 16 a 23, en donde la composición, antes de la exposición a la condición de vacío, carece de amoníaco.

25. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 24, en donde el proceso de pretratamiento no utilizó amoníaco para pretratar la biomasa lignocelulósica.

26. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 25, en donde el catalizador comprende una enzima y la hidrólisis catalítica comprende hidrólisis enzimática.

27. Un proceso para incrementar la recuperación de glucosa de una biomasa lignocelulósica pretratada, que comprende los pasos de

A) Exponer una composición a una condición de vacío,

en donde la composición tiene un contenido de materia seca, y

la composición comprende una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua, y un líquido libre,

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;

B) Dejar de exponer la composición a la condición de vacío,

C) Agregar al menos un catalizador a la composición, en donde el catalizador es capaz de hidrolizar la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua en la composición,

D) Realizar una hidrólisis catalítica de la

biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua en la composición.

28. El proceso de conformidad con la reivindicación 27, en donde la condición de vacío es menor que una presión absoluta medida en milibar (mbar), seleccionada del grupo que consiste de 950, 900, 850, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 30, 20, 10, 5 y 0.5 mBar.

29. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 27 y 28, en donde el por ciento en peso de materia seca de la composición en peso de la cantidad total de la composición, está en un intervalo seleccionado del grupo que consiste de 1 a 50, 1 a 40, 1 a 36, 1 a 30, 1 a 25, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10 y 5 a 40.

30. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, en donde el paso de exponer la composición a la condición de vacío incluye mantener la exposición de la composición a la condición de vacío durante un tiempo mínimo seleccionado del grupo que consiste de 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 45 minutos y 60 minutos.

31. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 30, en donde la exposición a la condición de vacío se realiza en un intervalo de temperatura que consiste de un intervalo de temperatura seleccionado del grupo que consiste de 15 a 55°C, 15 a 50°C, 15 a 45°C, 15 a 35°C y 15 a 30°C.

32. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31, en donde el paso de exponer la composición a la condición de vacío se realiza utilizando un cilindro con un tornillo dentro del cilindro.



33. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 32, en donde la realización de la hidrólisis catalítica no se hace bajo ninguna condición de vacío.

5           34. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 33, en donde el proceso es un proceso continuo.

10           35. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 34, en donde la composición, antes de la exposición a la condición de vacío, carece de amoníaco.

36. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 35, en donde el proceso de pretratamiento no utilizó amoníaco para pretratar la biomasa lignocelulósica.

15           37. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 36, en donde el catalizador comprende una enzima y la hidrólisis catalítica comprende hidrólisis enzimática.

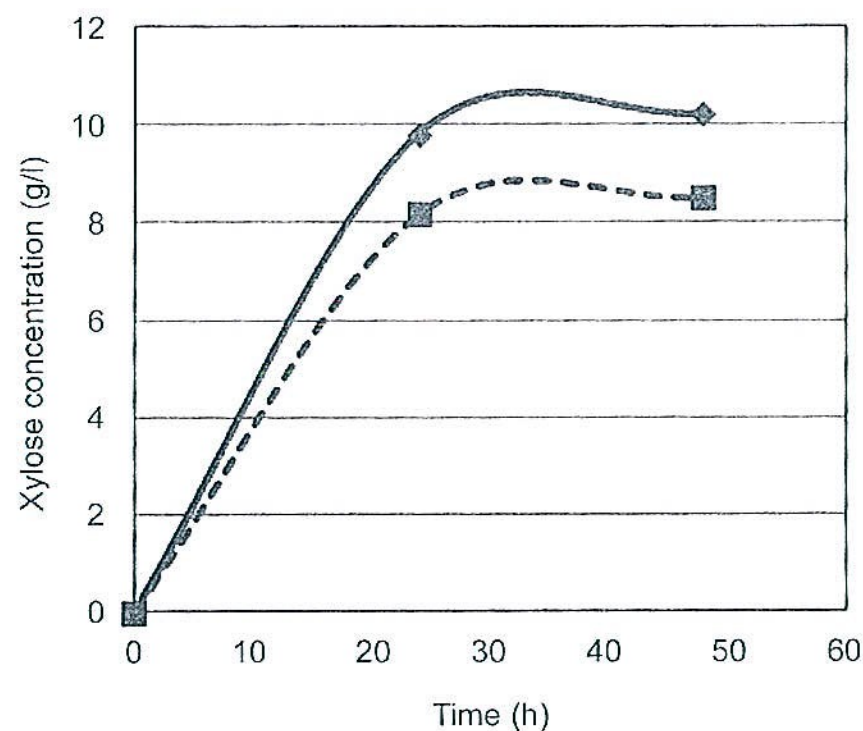
### RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se describe un paso de prehidrólisis mejorado que involucra exponer una biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua a condiciones de vacío, con y sin enzimas. Después de exponer la biomasa lignocelulósica pretratada insoluble en agua a condiciones de vacío, la hidrólisis enzimática se realiza en el material pretratado. El resultado es un rendimiento incrementado de glucosa y con frecuencia xilosa después de la hidrólisis enzimática, cuando se compara con una composición que no se ha expuesto a condiciones de vacío.

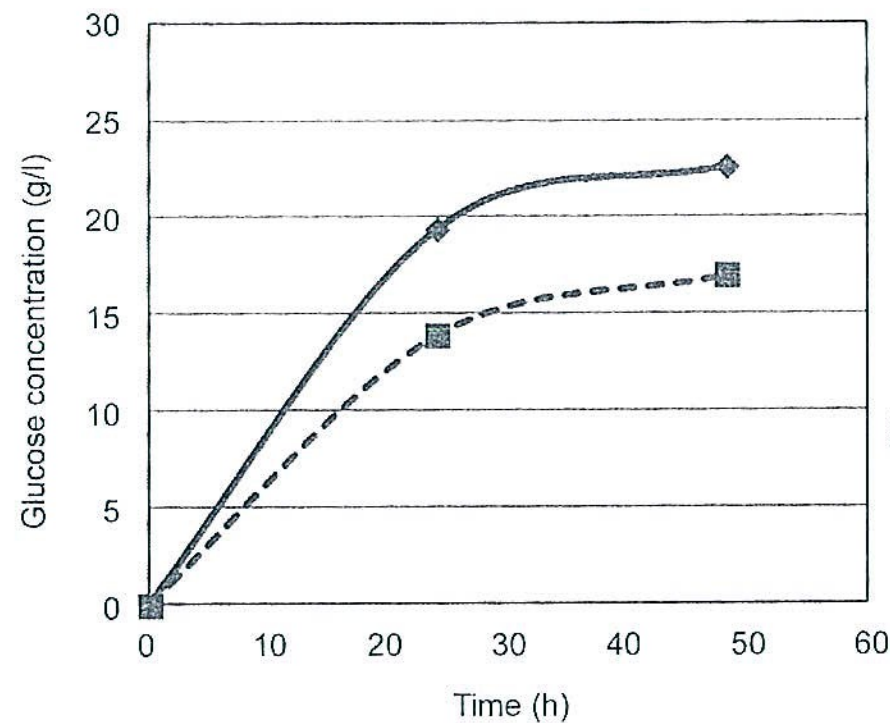


112

# EXAMPLE 1: 5 mg Protein/gram global cellulose



—◆— with vacuum treatment  
-■- without vacuum treatment



—◆— with vacuum treatment  
-■- without vacuum treatment

FIG. 1

WO 2013/092881

1/5

PCT/EP2012/076419

112

113

W/O 2013/092881

2/5

PCT/EP2012/076419

## EXAMPLE 2: 7.5 mg Protein/gram global cellulose

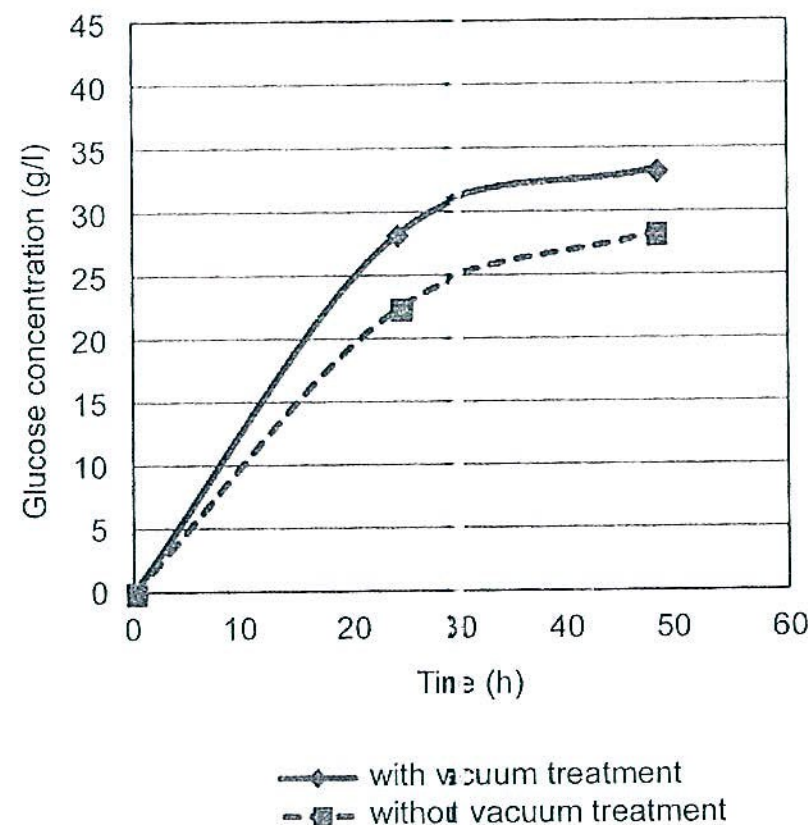
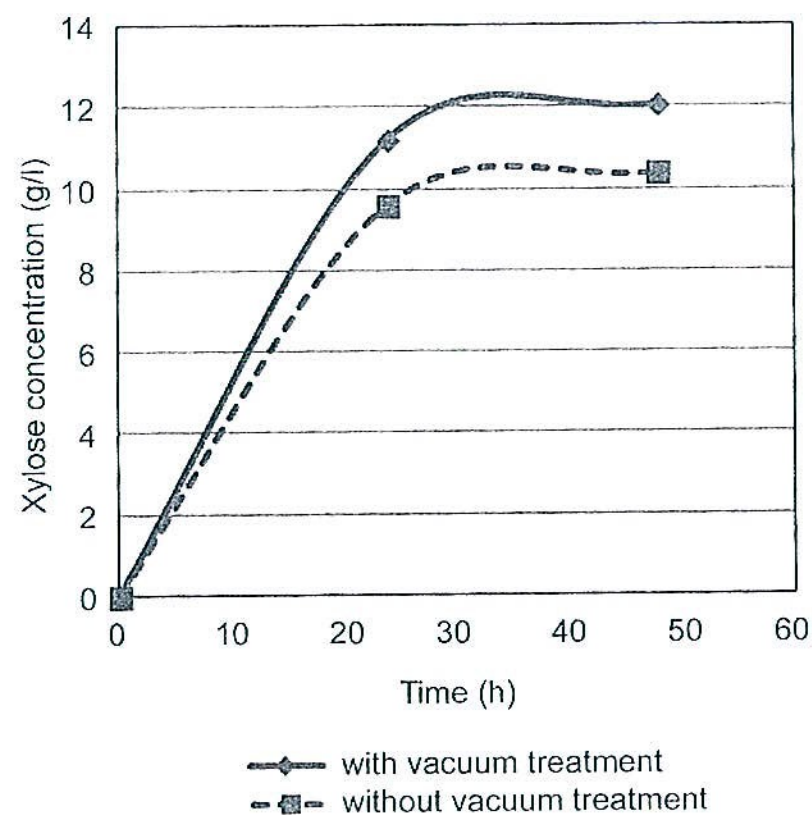


FIG. 2

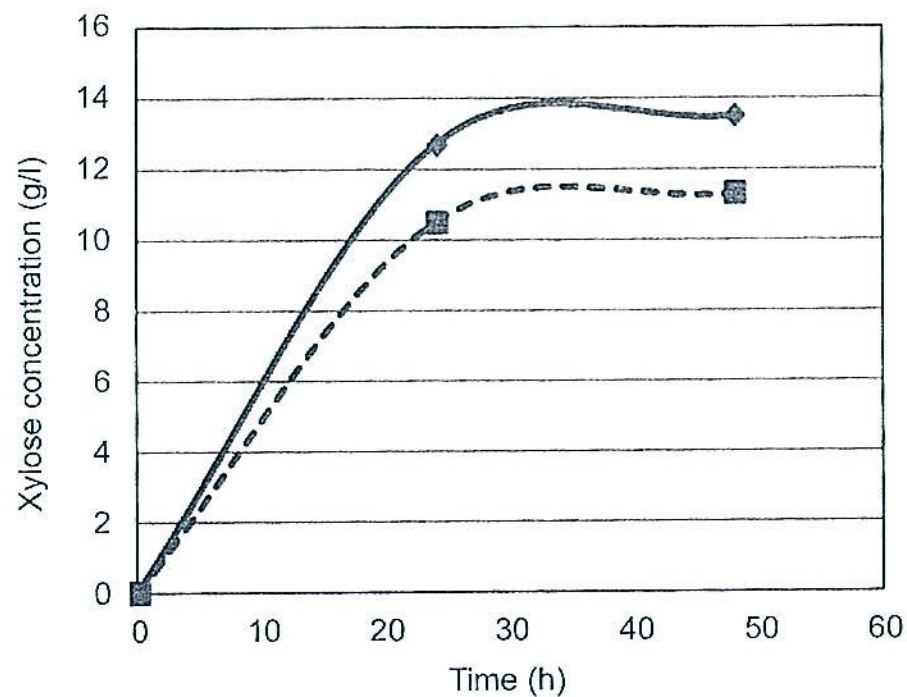
113



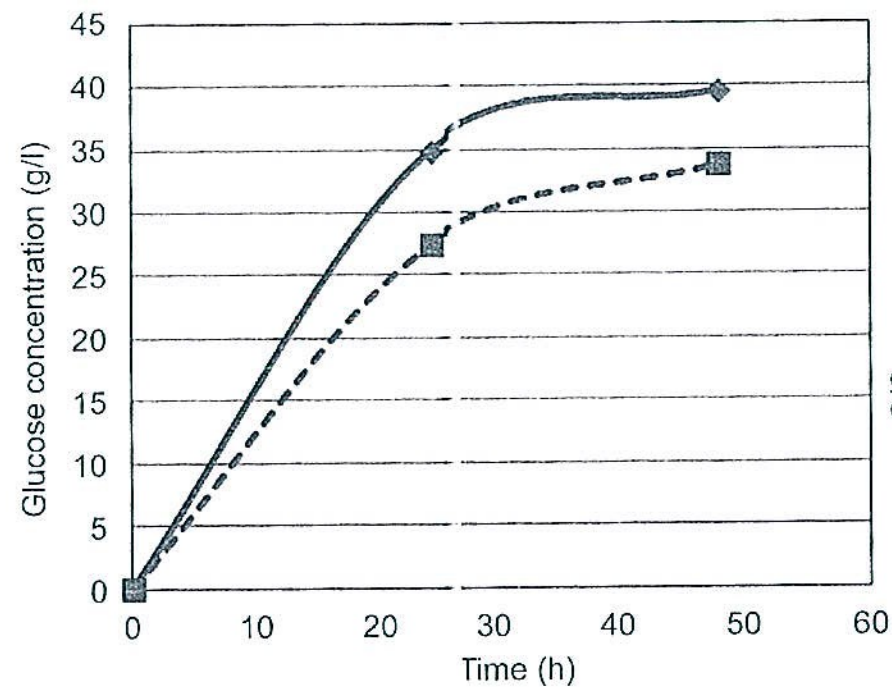
114

# EXAMPLE 3: 10 mg Protein/gram global cellulose

WO 2013/092881



—◆— with vacuum treatment  
 -■- without vacuum treatment



—◆— with vacuum treatment  
 -■- without vacuum treatment

3/5

FIG. 3

PCT/EP2012/076419

MM

115

WO 2013/092881

PCT/EP2012/076419

4/5

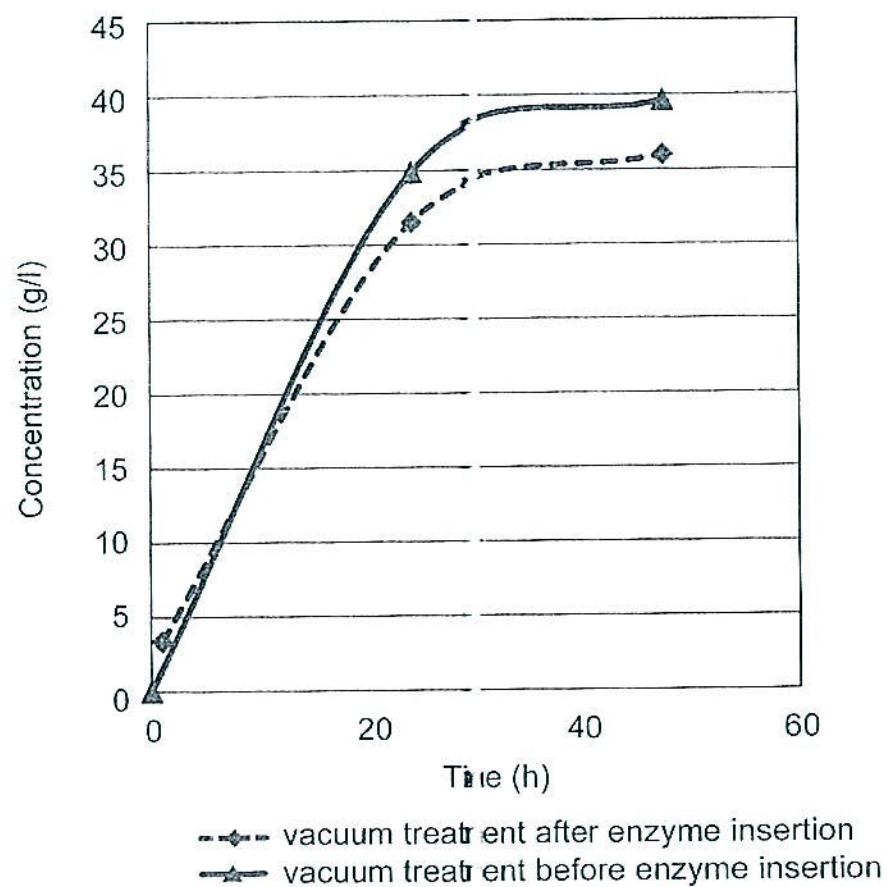
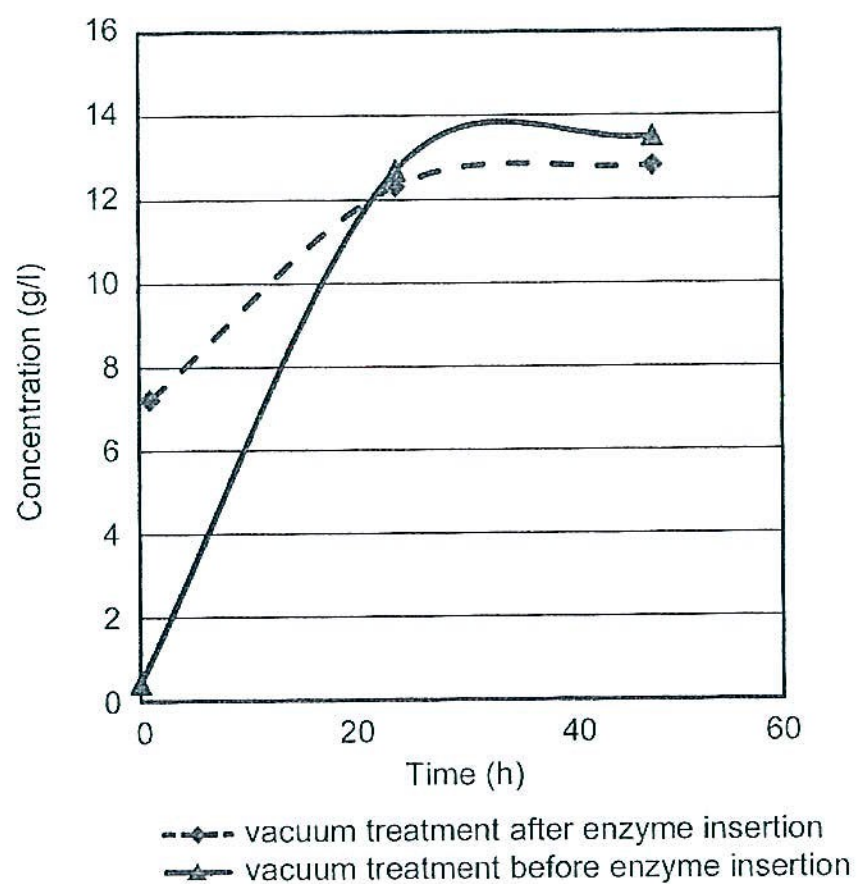


FIG. 4

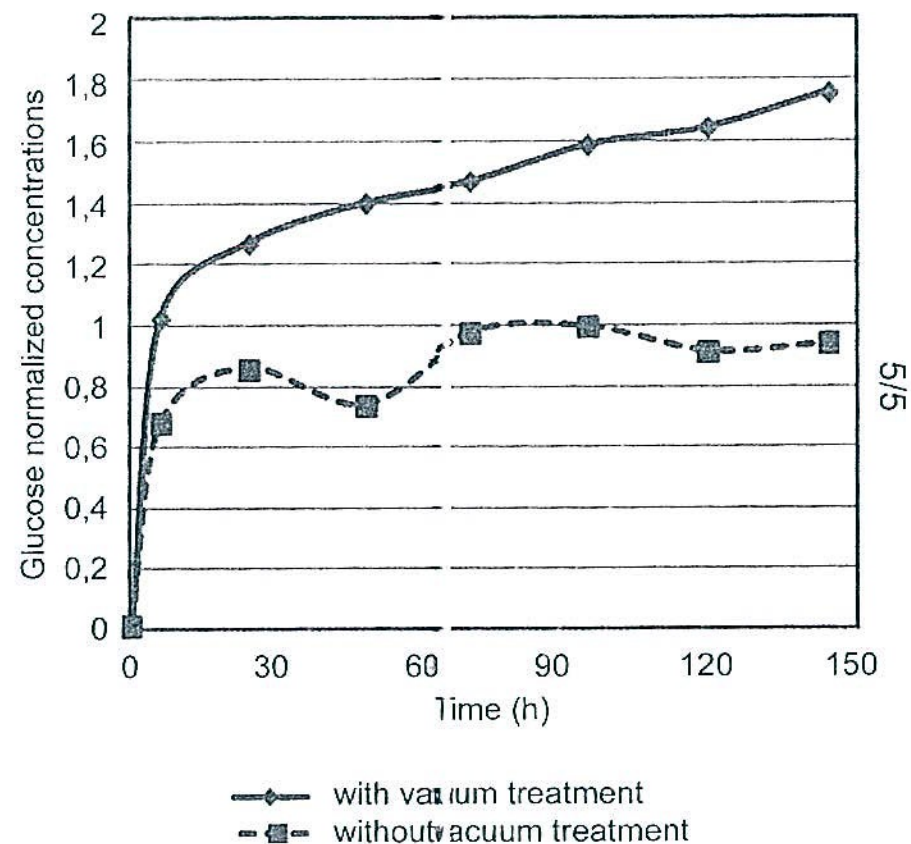
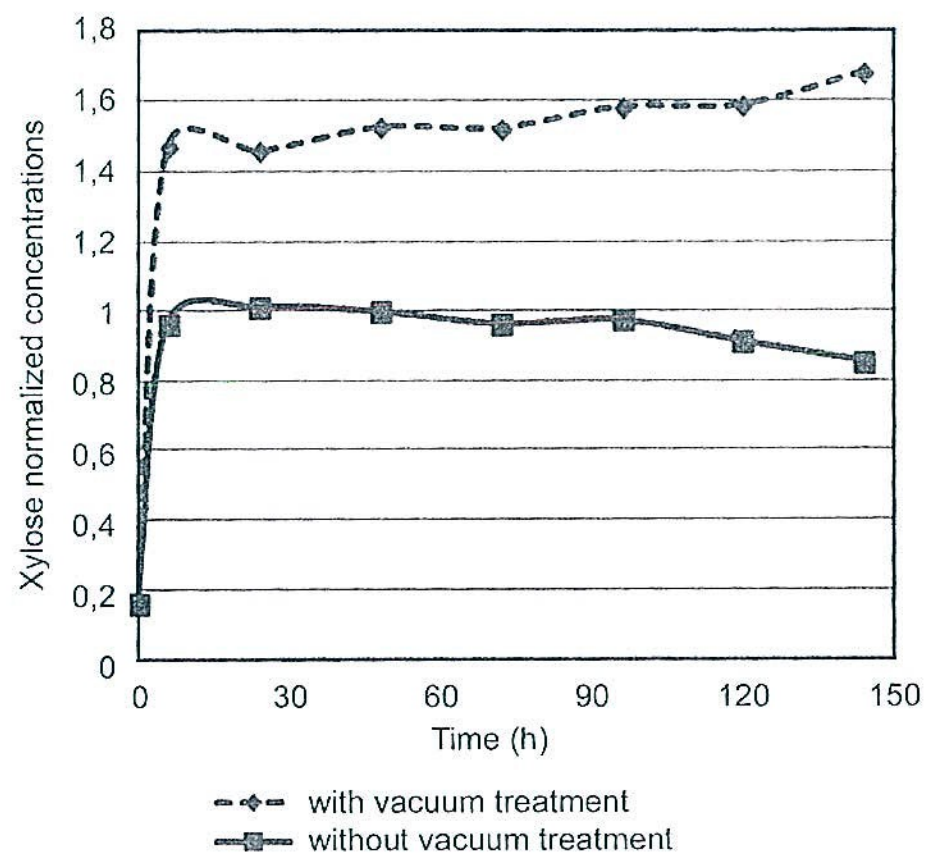
115



116

# EXAMPLE 5: 10 mg Protein/gram global cellulose

WO 2013/092881



5/5

FIG. 5

PCT/EP2012/076419

116  
118

## SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

## RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0076427

Bogotá D.C., Julio 21 de 2014 - 14:40:44

RECIBIDO DE : WOLF MENDEZ ABOGADOS ASOCIADOS LTDA

NI 830.029.907

## \*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO     |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|--------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 632104804 | 21/07/2014 | 1.846.000.00 |

## \*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO              | CONCEPTO                                   | Vr. UNIDITARIO | Vr. CONCEPTO |
|-------|-------------------------|--------------------------------------------|----------------|--------------|
| 1     | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN | 515.000.00     | 515.000.00   |
|       |                         |                                            |                | \$515.000.00 |

SON: \*\*QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-157243- -00000-0000

Fecha: 2014-07-21 14:52:36 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTE IYII Eve. 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios 119

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 21 de 2014 - 14:40:45



## SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

118  
118  
**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

## RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0076426

Bogotá D.C., Julio 21 de 2014 - 14:40:44

RECIBIDO DE : WOLF MENDEZ ABOGADOS ASOCIADOS LTDA

NI 830.029.907

## \*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO     |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|--------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 632104804 | 21/07/2014 | 1.846.000.00 |

## \*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO              | CONCEPTO                                                        | Vr. UNDITARIO | Vr. CONCEPTO |
|-------|-------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------|--------------|
| 27    | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA<br>ADICIONAL A LAS 10 INIC | 31.000.00     | 837.000.00   |
|       |                         |                                                                 |               | \$837.000.00 |

SON: \*\*OCHOCIENTOS TREINTA Y SIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-157243- -00000-0000

Fecha: 2014-07-21 14:52:36 Dep. 2020 DIR NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTE IYII Eve. 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 119

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 21 de 2014 - 14:40:45

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento) -  
Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)  
Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas  
Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas  
Completa ☐ Inc

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-157243- -00000-0000

Fecha: 2014-07-21 14:52:36 Dep. 2020 DIR NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 119