

(22) Data de pedido: **2005.11.07**

(30) Prioridade(s): **2004.11.29 DK 200401854**

(43) Data de publicação do pedido: **2007.09.05**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.08.17**
198/2011

(73) Titular(es):

INBICON A/S
KRAFTVÆERKSVEJ 53 SKÆRBÆK 7000
FREDERICIA

DK

(72) Inventor(es):

CLAUS FELBY
JAN LARSEN
HENNING JØRGENSEN
JAKOB VIBE-PEDERSEN

DK

DK

DK

DK

(74) Mandatário:

MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA
AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS QUE TÊM UM ALTO TEOR EM MATÉRIA SECA (MS)**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM PROCESSO PARA LIQUEFAÇÃO E SACARIFICAÇÃO DE BIOMASSAS QUE CONTÊM POLISSACÁRIDOS, QUE TEM UM TEOR RELATIVAMENTE ALTO EM MATÉRIA SECA. A PRESENTE INVENÇÃO COMBINA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM UM TIPO DE MISTURA QUE SE BASEIA NO PRINCÍPIO DE GRAVIDADE ASSEGURANDO QUE AS BIOMASSAS SEJAM SUBMETIDAS A FORÇAS MECÂNICAS, PRIMARIAMENTE FORÇAS DE CISALHAMENTO E DILACERAMENTO. ALÉM DISSO, A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE À UTILIZAÇÃO ADICIONAL DE TAIS BIOMASSAS PROCESSADAS, POR EXEMPLO, PARA FERMENTAÇÃO SUBSEQUENTE EM BIOETANOL, BIOGÁS, ESPECIALMENTE HIDRATOS DE CARBONO PARA ALIMENTOS E RAÇÃO BEM COMO MATÉRIA-PRIMA DE CARBONO PARA PROCESSAMENTO EM PLÁSTICOS E PRODUTOS QUÍMICOS.

RESUMO**"HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS QUE TÊM UM ALTO TEOR EM
MATÉRIA SECA (MS) "**

A presente invenção refere-se a um processo para liquefacção e sacarificação de biomassas que contêm polissacáridos, que tem um teor relativamente alto em matéria seca. A presente invenção combina a hidrólise enzimática com um tipo de mistura que se baseia no princípio de gravidade assegurando que as biomassas sejam submetidas a forças mecânicas, primariamente forças de cisalhamento e dilaceramento. Além disso, a presente invenção refere-se à utilização adicional de tais biomassas processadas, por exemplo, para fermentação subsequente em bioetanol, biogás, especialmente hidratos de carbono para alimentos e ração bem como matéria-prima de carbono para processamento em plásticos e produtos químicos.

DESCRIÇÃO

"HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS QUE TÊM UM ALTO TEOR EM MATÉRIA SECA (MS)"

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a um processo para liquefacção e sacarificação de biomassas que contêm polissacáridos, que têm um alto teor em matéria seca e preferentemente que possuem fibras e partículas com um tamanho médio grande. A presente invenção possibilita a utilização adicional de tais biomassas processadas, por exemplo, para fermentação subsequente em bioetanol, especialmente hidratos de carbono para alimentos e ração bem como matéria-prima de carbono para processamento em plásticos e produtos químicos.

Antecedentes da invenção

Numerosos processos industriais e agrícolas, por exemplo, operações urbanas, processamento de alimentos e ração e biomassas geradas a partir de produtos florestais, resíduos e subprodutos que contêm açúcares poliméricos, por exemplo, na forma de amido, celulose e hemicelulose. Agronegócios e indústrias químicas bem como organizações públicas têm um interesse considerável no desenvolvimento de processos para converter tais biomassas em materiais de um valor mais alto. Assim, por meio de exemplo tais biomassas poderiam potencialmente ser convertidas em bioetanol, biogás ou produtos químicos utilizando microorganismos e/ou enzimas hidrolíticas. No entanto, a maioria dos processos conhecidos actualmente não têm ainda alcançado prática comercial em larga escala devido a seu custo de produção alto e necessidade de energia alta e assim praticabilidade económica incerta inerente.

Além de serem importantes como alimentos e ração, os hidratos de carbono de biomassa podem ser utilizados como matéria-prima para uma série de processos industriais. Na forma de polímeros, um produto bem conhecido é o papel, onde a celulose é o componente principal. No entanto, quando são processados em oligómeros e monómeros, os hidratos de carbono são uma matéria-prima importante para uma série de processos industriais. Como será descrito em detalhe são necessários para uma série de processos microbianos, mas além disso podem ser utilizados como matéria-prima para, por exemplo, processamento enzimático em especialmente hidratos de carbono para alimentos e ração, por exemplo, trealose. Também oligómeros e monómeros de hidrato de carbono podem substituir produtos petroquímicos para processamento em plásticos e produtos químicos orgânicos. Além disso, os hidratos de carbono podem ser utilizados como portadores de hidrogénio em hidrogenação catalítica.

É, portanto, evidente que se um custo baixo e abundantes recursos de hidratos de carbono processados pudessem ser disponibilizados para processamento industrial poderia haver um potencial económico substancial.

O amido é o hidrato de carbono mais amplamente armazenado em plantas e ocorre na forma de grânulos, que diferem marcadamente em tamanho e características físicas de espécie para espécie. Os grânulos de amido são geralmente bem resistentes à penetração tanto por água como enzimas hidrolíticas devido à formação de ligações de hidrogénio dentro da mesma molécula e com outras moléculas vizinhas. No entanto, estas inter- e intra-ligações de hidrogénio podem tornar-se fracas à medida que a temperatura da suspensão é elevada. Quando uma suspensão aquosa de amido é aquecida, as ligações de hidrogénio enfraquecem, a água é absorvida, e os grânulos de amido incham. Este processo é comumente chamado gelatinização

porque a solução formada tem uma consistência gelatinosa, altamente viscosa. Quimicamente, o amido é um polímero natural de glucose, que é geralmente insolúvel, mas dispersível em água a temperatura ambiente e constituído de uma unidade de repetição similar a essa de celulose e unida por ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6, em oposição às ligações glicosídicas β -1,4 para celulose. As unidades formam um componente de cadeia linear, chamado amilose, ou um componente de cadeia ramificada, chamado amilopectina. A maioria das sementes de planta, grãos e tubérculos contém aproximadamente 20 - 25 % de amilose., mas algumas, como, por exemplo, amido de ervilha têm 60 % de amilose e certas espécies de milho têm 80 % de amilose. Variedades cerosas de grãos, tal como arroz, são baixas em amilose.

Além do amido, os três constituintes principais em biomassa de planta são celulose, hemicelulose e lignina, que são comumente denominadas pelo termo genérico lignocelulose. As biomassas que contêm polissacáridos como um termo genérico incluem tanto amido como biomassas lignocelulósicas.

Celulose, hemicelulose e lignina estão presentes em quantidades variadas em plantas diferentes e nas diferentes partes da planta e são intimamente associadas para formar a armação estrutural da planta.

A celulose é um homopolissacárido composto inteiramente de D-glucose unido por ligações glicosídicas β -1,4 e com um grau de polimerização até 10.000. A estrutura linear da celulose possibilita a formação de intra- e intermolecular ligações de hidrogénio, que resulta na agregação de cadeias de celulose em micro fibrilas. Regiões dentro das microfibrilas com ordem alta são denominadas cristalinas e regiões de ordem baixa são denominadas amorfas. As microfibrilas montam-se em fibrilas, que então formam as fibras de celulose. A estrutura parcialmente cristalina de celulose juntamente

com a disposição microfibrilar, dá a celulose alta resistência à tracção, torna a celulose insolúvel na maioria dos solventes, e é parcialmente responsável pela resistência de celulose contra degradação microbiana, isto é, hidrólise enzimática.

A hemicelulose é um polissacárido heterogéneo complexo composto de uma série de resíduos de monómeros: D-glucose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L- arabinose, ácido D-glucurónico e ácido 4-D-metil-D-glucurónico. A hemicelulose tem um grau de polimerização abaixo de 200, tem cadeias laterais e pode ser acetilada. Em madeira macia como abeto, pinheiro e espruce, galactoglucomanano e arabino-4-O-metil-glucuronoxilano são as fracções de hemicelulose principais. Em madeira dura como bétula, choupo, faia preta ou carvalho, 4-O-acetil-4-metil-glucuronoxilano e glucomanano são os constituintes principais de hemicelulose. Gramíneas como arroz, trigo, aveia e painço amarelo têm hemicelulose composta de glucuronoarabinoxilano principalmente.

A lignina é uma rede complexa formada pela polimerização de unidades de propano de fenilo e constitui a mais abundante fracção não polissacarídica em lignocelulose. Os três monómeros em lignina são álcool *p*-coumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, e são com mais frequência unidos através de ligações de éter arilgliceril-P-arilo. A lignina é ligada a hemicelulose e incrusta os hidratos de carbono, deste modo oferecendo protecção contra degradação microbiana e química.

Como foi indicado anteriormente as biomassas processadas poderiam potencialmente ser convertidas em bioetanol ou produtos químicos utilizando microorganismos e/ou enzimas hidrolíticas, ou os hidratos de carbono das biomassas processadas poderiam ser utilizados como matéria-prima para uma série de processos industriais, por exemplo, processamento enzimático em especialmente hidratos de carbono para alimentos e ração ou como substitutos para

produtos petroquímicos na produção de plásticos e produtos químicos orgânicos. Além disso, o processamento de hidratos de carbono em biomassa de acordo com a presente invenção pode ser combinado com separação e fraccionamento dos componentes não de hidrato de carbono. Uma utilização preferida particularmente de um processo de acordo com a presente invenção é uma parte integrada de um processo para a produção de bioetanol.

A produção de bioetanol a partir de biomassas que contêm polissacáridos pode ser dividida em três etapas: 1) pré-tratamento, 2) hidrólise dos polissacáridos em hidratos de carbono fermentáveis, 3) e fermentação dos hidratos de carbono.

O pré-tratamento é requerido se a hidrólise subsequente (por exemplo, hidrólise enzimática) dos polissacáridos requerer a quebra de uma estrutura de outra maneira protectora (por exemplo, lignina) dos materiais vegetais. Diversas técnicas de pré-tratamento são conhecidas. Para cereais e grãos, este pré-tratamento pode ser na forma de uma moagem seca simples com a finalidade de tornar as superfícies acessíveis, mas para biomassas lignocelulósicas processos térmicos e/ou químicos também são necessários. Uma biomassa que contém polissacáridos que consiste em, por exemplo, amido refinado não requer os ditos métodos de pré-tratamento antes do processamento enzimático. Os processos de pré-tratamento podem ser com base em hidrólise ácida, explosão de vapor, oxidação, extracção com alcali ou etanol etc. Uma característica comum das técnicas de pré-tratamento é que combinadas com a acção de possíveis reagentes adicionados tiram vantagem do amaciamento e afrouxamento de materiais vegetais que ocorrem a temperaturas acima de 100 °C.

Em seguida ao pré-tratamento, a próxima etapa em utilização de biomassas que contêm polissacáridos para a produção de bioetanol ou outros bioprodutos químicos é

hidrólise do amido libertado, celulose e hemicelulose em açúcares fermentáveis. Se for feito enzimaticamente isto requer um grande número de enzimas diferentes com modos de acção diferentes. As enzimas podem ser adicionadas externamente ou microorganismos que crescem na biomassa podem proporcionar as mesmas.

Celulose é hidrolisada em glucose pelas celulasas carbohidrolíticas. O entendimento prevalente do sistema celulolítico divide as celulasas em três classes; exo-1,4- β -D-glucanases ou celobiohidrolases (CBH) (EC 3.2.1.91), que clivam unidades de celobiose das extremidades das cadeias de celulose; endo-1,4- β -D-glucanases (EG) (EC 3.2.1.4), que hidrolisam ligações glicosídicas β -1,4 internas aleatoriamente na cadeia de celulose; 1,4- β -D-glucosidase (EC 3.2.1.21), que hidrolisa celobiose a glucose e também cliva unidades de glucose de celooligossacáridos.

Os açúcares diferentes em hemicelulose são libertados pelas hemicelulasas. O sistema hemicelulolítico é mais complexo que o sistema celulolítico devido à natureza heteróloga de hemicelulose. O sistema envolve entre outros endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8), que hidrolisam ligações internas na cadeia de xilano; 1,4- β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37), que atacam xilo-oligossacáridos da extremidade não redutora e libertam xilose; endo-1,4- β -D-mananases (EC 3.2.1.78), que clivam ligações internas; 1,4- β -D-manosidases (EC 3.2.1.25), que clivam manooligossacáridos a manose. Os grupos laterais são retirados por uma série de enzimas; α -D-galactosidases (EC 3.2.1.22), α -L-arabino-furanosidases (EC 3.2.1.55), α -D-glucuronidases (EC 3.2.1.139), esterases de cinamoilo (EC 3.1.1.-), esterases de xilano de acetilo (EC 3.1.1.6) e esterases de feruloilo (EC 3.1.1.73).

As enzimas mais importantes para utilização em amido hidrólise são alfa-amilases (1,4- α -D-glucan glucano-

hidrolases, (EC 3.2.1.1). Estas são hidrolases endo-actantes que clivam ligações glicosídicas 1,4- α -D e podem contornar, mas não podem hidrolisar pontos de ramificação 1,6- α -D-glicosídicas. No entanto, também glicoamilases exo-actantes tais como beta-amilase (EC 3.2.1.2) e pululanase (EC 3.2.1.41) podem ser utilizados para a hidrólise de amido. O resultado da hidrólise de amido é primariamente glucose, maltose, maltotriose, α -dextrina e quantidades variadas de oligossacáridos. Quando o hidrolisado à base de amido é utilizado para fermentação pode ser vantajoso adicionar enzimas proteolíticas. Tais enzimas podem prevenir a floculação do microorganismo e pode gerar aminoácidos disponíveis ao microorganismo.

Em combinação com pré-tratamento e hidrólise enzimática de biomassas lignocelulósicas, encontrou-se que a utilização de enzimas oxidativas pode ter um efeito positivo sobre a hidrólise global bem como a viabilidade dos microorganismos utilizados para, por exemplo, fermentação subsequente. A razão para este efeito é a ligação cruzada oxidativa de ligninas e outros inibidores fenólicos uma vez que é causada pelas enzimas oxidativas. Tipicamente lacase (EC 1.10.3.2) ou peroxidase (EC 1.11.1.7) são utilizados externamente ou pela incorporação de um gene de lacase no microorganismo aplicado.

A hidrólise enzimática de biomassa foi descrita anteriormente. No entanto, no caso de biomassas lignocelulósicas somente o material que consiste em fibras e partículas com um tamanho médio abaixo de 1 polegada (25,4 mm) e além disso que tem um teor relativamente baixo em matéria seca, isto é, abaixo de 20 % (p/p), foi hidrolisado de maneira bem-sucedida por tal método. O documento US4409329 descreve a hidrólise de material de celulose sólida a açúcar, onde a celulose é hidrolisada a açúcares simples por meio do tratamento de uma suspensão granular de 3 - 20 % (p/p) de ração sólida que contém 30 -

80 % (p/p) de celulose, com um complexo de enzima celulase. O stock de carga que contém celulose sólida tinha um tamanho de partícula médio desde 0,01 até 1 polegada (0,0254 - 25,4 mm) em diâmetro. Pás de rotor perfuradas foram utilizadas para misturar.

O documento US2002117167A descreve a hidrólise enzimática de hemicelulose em material de biomassa, que compreende solubilizar pelo menos uma porção de hemicelulose e hidrolisar a hemicelulose solubilizada para produzir pelo menos um monossacárido. A biomassa utilizada é preferentemente suspensão aquosa de material bruto ou pré-tratado. O material de biomassa pode ser qualquer material celulósico que inclui hemicelulose. O processo é descrito como sendo especialmente eficaz com fibras de grãos tais como com, trigo, arroz, aveias ou cevada.

O documento US2004005674A descreve um processo para a hidrólise enzimática de lignocelulose. A degradação de lignocelulose a açúcares compreende colocar a lignocelulose em contacto com pelo menos uma enzima auxiliar e pelo menos uma celulase. O material lignocelulósico foi moído (o tamanho médio de fibra do material foi não especificado adicionalmente) e tinha um baixo teor em matéria seca (0,2 g de material de restos culturais moídos em 10 ml da solução de enzima).

Monagheghi, A. *et al.*: 'High solids simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol', Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 33, No. 2, 1 de Maio de 1992, páginas 67 - 81, revela um processo em que biomassa que tem um teor inicial em matéria seca de 21,1 - 32,3 % no início da mistura/hidrólise é a) submetida a hidrólise combinada utilizando uma solução de enzima celulase, opcionalmente suplementada com beta-glucosidase, num fermentador giratório simples, e b) é simultaneamente submetida a fermentação dos sacáridos formados durante a reacção de hidrólise.

Sumário da invenção

A presente invenção refere-se a um processo para liquefacção e sacarificação de biomassas que contêm polissacáridos que compreendem biomassa lignocelulósica, o dito processo sendo caracterizado pela dita biomassa ser submetida a hidrólise enzimática combinada utilizando pelo menos uma celulase e misturar por meio de um misturador de queda livre tal como um misturador de tambor ou um misturador giratório que proporciona processamento mecânico e/ou degradação da biomassa de modo que, no processo, a biomassa é liquefeita e sacarificada a um líquido adequado para processamento posterior tal como fermentação, em que a biomassa tem um teor em matéria seca de entre 20 % e 40 % no início da mistura/hidrólise.

As biomassas preferentemente consistem em fibras relativamente grandes e partículas preferentemente com uma distribuição de fibra e tamanhos de partícula em que pelo menos 20 % da biomassa varia dentro de 27 - 70 mm. Além disso, o processo é particularmente adequado para a liquefacção e sacarificação de biomassas que contêm polissacáridos que consistem primariamente em amido, amido refinado, celulose, hemicelulose e lignina, por exemplo, grãos ou palha de trigo. No caso de biomassas lignocelulósicas estas são preferentemente pré-tratadas submetendo-as a temperaturas entre 110 - 250 °C durante 1 - 60 min. De uma maneira que assegura a acessibilidade da celulose às enzimas e ao mesmo tempo assegura um teor limitado de inibidores de fermentação na biomassa pré-tratada. A presente invenção combina a hidrólise enzimática com base na combinação de enzimas hidrolíticas que incluem uma enzima hidrolítica que actua em hidratos de carbono e uma enzima oxidativa com um tipo de mistura que se baseia no princípio de gravidade que garante a aplicação de forças mecânicas, primariamente forças de cisalhamento e dilaceramento, às biomassas. Tipos preferidos de mistura

são, por exemplo, misturadores de queda livre tais como misturadores de tambor, misturadores giratórios ou dispositivos de mistura similares.

Descrição da invenção

A produção de soluções concentradas de açúcar é benéfica em relação à fermentação subsequente ou outros processos microbianos devido a produtividade volumétrica melhorada e custo reduzido de processamento a jusante. No caso de produção de bioetanol, o requisito de energia para a destilação é reduzido significativamente se o caldo de fermentação contém acima de 4 % de etanol (Galbe e Zacchi, 2002). Isto requer uma concentração de açúcar acima de 8 %, que com a maioria dos tipos de biomassas lignocelulósicas corresponde a um teor inicial em matéria seca acima de 20 %. É em outras palavras desejável submeter biomassas que contêm polissacárido com altos teores em matéria seca, preferentemente acima de 20 %, a hidrólise enzimática com a finalidade de serem capazes de produzir subsequentemente caldos de fermentação que contêm bioetanol adequados para a destilação de etanol.

Os processos da presente invenção proporcionam um grau de hidrólise enzimática de tipicamente 30 - 50 %. No entanto, sob condições optimizadas um grau mais alto de hidrólise enzimática ainda pode ser obtido. A biomassa liquefeita e sacarificada conterá conseqüentemente quantidades relativamente grandes de glucose, xilose, celobiose, lignina, celulose não degradada e hemicelulose e enzimas ainda activas adequadas para o processamento posterior, isto é, processos de fermentação (etanol, ácido láctico, etc.). A biomassa liquefeita será também adequada para gasificação, hidrogenação, síntese orgânica, ou produção de biogás e ração.

Se as biomassas que contêm polissacáridos forem lignocelulósicas o pré-tratamento precisa assegurar que a estrutura do teor lignocelulósico se torne mais acessível

às enzimas, e ao mesmo tempo as concentrações de subprodutos inibidores prejudiciais tais como ácido acético, furfural e hidroximetil furfural permanecem substancialmente baixos. Existem diversas estratégias para alcançar isto, todas das quais implicam submeter o material lignocelulósico a temperaturas entre 110 - 250 °C durante 1 - 60 min, por exemplo:

- Extração de água quente
- Hidrólise de ácido diluído de múltiplos estágios, que retira material dissolvido antes das substâncias inibidoras serem formadas
- Hidrólise de ácido diluído em condições de severidade relativamente baixas
- Oxidação húmida alcalina
- Explosão de vapor
- Quase qualquer pré-tratamento com subsequente destoxificação

As biomassas que contêm polissacáridos de acordo com a presente invenção incluem qualquer material que contém açúcares poliméricos, por exemplo, na forma de amido bem como amido refinado, celulose e hemicelulose. As biomassas que têm um teor em matéria seca acima de 20 % são preferidas.

Tipos relevantes de biomassas para a hidrólise enzimática e mistura de acordo com a presente invenção podem incluir biomassas derivadas de culturas agrícolas tais como, por exemplo:

- Amido, por exemplo, grãos que contêm amido e amido refinado
- Caules e folhas de milho
- Bagaço
- Palha, por exemplo, de arroz, trigo, centeio, aveia, cevada, centeio, colza, sorgo
- Madeira macia, por exemplo, *Pinus sylvestris*, *Pinus radiata*

- Madeira dura, por exemplo, *Salix spp.* *Eucalyptus spp.*
- Tubérculos, por exemplo, beterraba, batata
- Cereais de, por exemplo, arroz, trigo, centeio, aveia, cevada, centeio, colza, sorgo e milho
- Resíduos de papel, fracções de fibra de processamento de biogás, estrume, resíduos de processamento de óleo de palma, resíduos sólidos urbanos ou similares com um teor similar em matéria seca.

Se as biomassas que contêm polissacáridos forem lignocelulósicas, o material pode ser cortado em peças onde 20 % (p/p) da biomassa preferentemente varia dentro de 26 - 70 mm, antes de pré-tratamento. O material pré-tratado tem preferentemente um teor em matéria seca acima de 20 % antes de entrar no dispositivo de mistura. Além de libertar os hidratos de carbono da biomassa, o processo de pré-tratamento esteriliza e parcialmente dissolve a biomassa e ao mesmo tempo retira por lavagem cloreto de potássio da fracção de lignina.

A mistura realizada num processo de acordo com a presente invenção serve pelo menos um propósito quádruplo.

Em primeiro lugar, assegura contacto próximo entre as enzimas utilizadas e a biomassa que contém polissacáridos (substrato), uma vez que esta será na maioria dos casos insolúvel ou somente muito ligeiramente solúvel.

Em segundo lugar, o trabalho mecânico realizado sobre o material durante a mistura ajuda a separar por dilaceramento fibras de biomassa e partículas maiores e assistirá portanto no aumento da área de superfície do material. Isto aumentará a acessibilidade de, por exemplo, celulose e hemicelulose às enzimas utilizadas. Para aumentar ainda o trabalho mecânico sobre o material, esferas de aço ou meios similares que colidirão com o material poderiam ser adicionadas ao tambor.

Em terceiro lugar, a mistura do material previne a acumulação local de concentração alta de celobiose que -

como é bem conhecido para um perito na especialidade - pode inibir, por exemplo, enzimas celulase, especialmente as celobiohidrolases.

Em quarto lugar, uma importante característica das enzimas celulase é a influência de domínios de ligação a celulose (DLC) sobre o desempenho da enzima. Os DLC são partes funcionais de enzimas que degradam celulose. O DLC possibilita a adesão da enzima solúvel em água sobre uma superfície de substrato insolúvel (celulose). A associação próxima entre a enzima e a celulose proporcionada pelo DLC aumenta a taxa catalítica e estabilidade da enzima. Para hidrolisar a celulose, a enzima precisa mudar a posição do DLC na cadeia de celulose. Acredita-se que a acção mecânica, isto é, mistura, é importante para o movimento do DLC e conseqüentemente para a acção enzimática das enzimas ao longo da cadeia de celulose.

Além do anterior, deve notar-se que a hidrólise enzimática de biomassa tem sido tradicionalmente conduzida em reactores de tanque agitado equipados com propulsores (por exemplo, turbina Rushton ou propulsor Intemig) montados sobre um veio de propulsor colocado centralmente similar a esse que é utilizado na indústria de fermentação. Devido a este equipamento, as soluções de alta viscosidade, material muito pegajoso ou muito seco não podem ser agitados eficientemente, mas resultará em zonas com mistura muito pobre ou sem misturar. Além disso, as agitações de tais soluções requerem entradas de energia muito maiores, o que é prejudicial à economia do processo. Operar com biomassas que contêm polissacáridos, isto restringiu anteriormente o limite superior possível a ap. 20 %. O princípio de mistura com base na gravidade de acordo com a presente invenção supera este problema e pode ser utilizado para as biomassas que contêm polissacáridos com um teor em matéria seca de 20 - 40 %. O princípio de mistura por gravidade de acordo com a presente invenção pode ser

facilmente aumentado em escala e ser aplicado a todos os tipos de biomassas, além de amido refinado, que contém até mais de 80 % de celulose.

Ao contrário convencional reactores de tanque agitado tradicionalmente utilizados para a hidrólise enzimática, um princípio de mistura com base na gravidade, isto é, um misturador de tambor, um misturador com um eixo giratório que levanta a biomassa ou dispositivo de mistura similar utilizando um princípio de queda livre, ao mesmo tempo possibilita uma mistura eficiente mesmo com pequenas entradas de potência e altos teores em matéria seca e além disso realiza um processamento mecânico/degradação através das forças de gravidade que incluem as forças de cisalhamento e dilaceramento entre o material e o tambor bem como as forças que resultam do impacto entre material que cai e o fundo do tambor e ao mesmo tempo realiza positivamente a influência de domínios de ligação a celulose (DLC) sobre o desempenho da enzima.

Embora o processamento de materiais vegetais não miscíveis, tais como, por exemplo, biomassa que contém polissacáridos com teor relativamente alto em matéria seca e tamanho de partícula e fibra média grande, é conhecido de fermentação em estado sólido ou biorreactores, onde misturadores do tipo giratório são utilizados para a mistura (Giovanozzi *et al.* 2002), este princípio não foi implementado anteriormente num processo de liquefacção/sacarificação dedicado ou num processo de fermentação de bioetanol.

A presente invenção proporciona um processo para o processamento de biomassas a teores relativamente altos em matéria seca entre 20 - 40 %. Além disso, o processo de acordo com a presente invenção assegura a eficiente liquefacção e sacarificação possibilitando a utilização directa do produto final em, por exemplo, fermentadores.

As enzimas capazes de realizar uma conversão de amido, celulose e hemicelulose ou partes dos mesmos em glucose, xilose e celobiose são adicionados à biomassa. O pH e a temperatura da biomassa são ajustados com referência ao pH óptimo e a temperatura óptima das enzimas aplicadas.

Dependendo da carga de enzima, a biomassa será liquefeita e sacarificada a um líquido sem qualquer ou somente com poucas fibras e partículas grandes restantes dentro de 3 - 24 horas.

Descrição detalhada da invenção

Um processo de acordo com a presente invenção pode ser realizado utilizando os seguintes parâmetros técnicos preferidos.

- Teor em matéria seca: 20 - 80 %, preferentemente 25 - 70 %, mais preferentemente 25 - 60 %, ainda mais preferentemente 25 - 50 % ou 25 - 40 % e o mais preferente 25 - 35 %
- Distribuição de fibra e tamanhos de partícula de biomassa lignocelulósica: 0 - 150 mm, preferentemente, 5 - 125 mm, mais preferentemente, 10 - 100 mm, ainda mais preferentemente 15 - 90 mm ou 20 - 80 mm e o mais preferente 26 - 70 mm. A distribuição preferida de fibra e tamanhos de partícula é definida como pelo menos 20 % (p/p) da biomassa lignocelulósica que varia dentro do intervalo preferido.

Se a biomassa que contém polissacáridos for lignocelulósica, terá que ser pré-tratado, por exemplo, por uma extracção de água quente. Se um pré-tratamento hidrotérmico for escolhido os seguintes dados técnicos são preferidos:

- Temperatura de pré-tratamento: 110 - 250 °C, preferentemente 120 - 240 °C, mais preferentemente 130 - 230 °C, mais preferentemente 140 - 220 °C, mais preferentemente 150 - 210 °C, mais preferentemente 160 -

200 °C, ainda mais preferentemente 170 - 200 °C ou o mais preferente 180 - 200 °C

- Tempo de pré-tratamento: 1 - 60 min, preferentemente 2 - 55 min, mais preferentemente 3 - 50 min, mais preferentemente 4 - 45 min, mais preferentemente 5 - 40 min, mais preferentemente 5 - 35 min, mais preferentemente 5 - 30 min, mais preferentemente 5 - 25 min, mais preferentemente 5 - 20 min e o mais preferente 5 - 15 min
- Teor em matéria seca após pré-tratamento de pelo menos 20 p/p %.

Tratamento enzimático de biomassas que contêm polissacáridos num misturador por gravidade:

Se um recipiente com base no conceito de mistura em queda livre na forma de um reactor com um veio agitador colocado horizontalmente que levanta a biomassa ou dispositivo de mistura similar for utilizado, os seguintes dados técnicos são preferidos:

- Velocidade rotacional: 0 - 30 rpm, preferentemente 0 - 20 rpm, mais preferentemente 0 - 15 rpm ainda mais preferentemente 0 - 10 rpm e o mais preferente 0 - 5 rpm.
- Rotação com direcção de rotação alternada periodicamente.
- Rotação em intervalos pré-definidos.

A velocidade rotacional óptima dependerá do volume do recipiente, a velocidade rotacional preferida pode ser assim relativamente alta quando o processo for levado a cabo num recipiente relativamente pequeno, enquanto pode ser relativamente baixo quando o processo for levado a cabo num recipiente relativamente grande.

- Enzimas para biomassa lignocelulósica:
 - Celobiase (por exemplo, Novozym 188)
 - Celulase (por exemplo, Celluclast 1,5 FG L)
- Carga de enzima em Unidades de Papel de Filtro (UPF)/g de MS. 1 UPF iguala a quantidade de enzima necessária para

hidrolisar 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de ligações glicosídicas em papel de filtro Whatman N° 1, sob condições especificadas bem conhecidas a um perito na especialidade. No entanto, a actividade enzimática poderia em princípio ser fornecida em qualquer forma concebível que ocasiona a actividade enzimática desejada: correspondente a 0,001 - 15 UPF/g de matéria seca, preferentemente 0,01- 10 UPF/g de matéria seca, mais preferentemente 0,1 - 8 UPF/g de matéria seca, mais preferentemente 1- 7 UPF/g de matéria seca e o mais preferente menos de 6 UPF/g

- Enzimas para biomassa que contém amido:
 - Enzimas no processamento de amido: alfa-amilases e glucoamilases
- Tratamento tempo para a hidrólise enzimática: 0 - 72 horas, preferentemente 1 - 60 horas, mais preferentemente 2 - 48 horas e mais preferentemente 3 - 24 horas tais como 4 - 24 horas, tais como 6 - 24 horas, tais como 8 - 24 horas, tais como 10 - 24, tal como 12 - 24 horas, tais como 18 - 24 horas ou 22 horas
- Temperatura para a hidrólise enzimática. Ajustada com referência às temperaturas óptimas das actividades enzimáticas aplicadas: 0 - 105 °C, preferentemente 10 - 100 °C, mais preferentemente 15 - 90 °C, mais preferentemente 20 - 80 °C, mais preferentemente 25 - 70 °C e o mais preferente 30 - 70 °C tal como 40 - 45 °C ou temperatura ambiente.
- pH de biomassa. Ajustado com referência ao pH óptimo das actividades enzimáticas aplicadas: 3 - 12, tal como 5 - 10, tal como 6 - 9, tal como 7 - 8 e preferentemente 4 - 11
- O tratamento enzimático pode ser conduzido como um processo descontínuo, semi-contínuo ou contínuo.

Exemplo 1: Hidrólise enzimática em escala de laboratório

Palha de trigo pré-tratada prensada com um tamanho médio de aproximadamente 40 mm (extracção de água contracorrente a 180 - 200 °C durante 5 - 10 min., razão de

fluxo de água e matéria seca de 5:1) correspondente a 25 g de peso seco (= 67,0 g de palha pré-tratada) foi colocada num saco de plástico. 0,75 mL de Novozym 188, 3,75 mL de Celluclast 1,5 FG L e 11,9 mL de 50 mM de tampão citrato de sódio, pH 5,0, foram misturados e pulverizados sobre a palha. Isto resultou num teor final em matéria seca de 30 %. A carga de enzima correspondeu a 10 Unidades de Papel de Filtro (UPF)/g de MS.

O misturador consistiu em um tambor (1,0 m de comprimento e 0,78 m de diâmetro) com 5 nervuras internas ao longo do comprimento do eixo para assegurar a mistura apropriada do material. O tambor girou ao longo do eixo horizontal com uma velocidade de 26 rpm. A mistura/hidrólise do material foi realizada durante 18 - 24 horas a temperatura ambiente. Isto resultou numa pasta espessa sem quaisquer fibras restantes grandes. Um saco de controlo com a mesma carga de enzima, mas sem mistura não mostrou sinal de degradação da palha.

Parte do material resultante após a hidrólise enzimática durante 24 horas (uma quantidade correspondente a 29 g de matéria seca) foi diluída a 15 % de matéria seca numa garrafa de tampa azul e levedura (Fermento de padaria, De Danske Spritfabrikker) foi adicionada. A garrafa foi fechada por uma câmara de ar e colocada durante 72 horas a 30 °C com agitação a 500 rpm. O líquido resultante continha 33 g/l de etanol, 10 g/l de xilose. Nenhuma glucose foi detectada indicando que a levedura foi capaz de utilizar toda a glucose produzida durante a hidrólise. Assumindo um rendimento de etanol em glucose de 0,5 g de etanol por g glucose isto correspondeu à conversão de 70 % da celulose originalmente.

Exemplo 2: Hidrólise enzimática em escala piloto

Palha de trigo pré-tratada prensada com um tamanho médio de aproximadamente 40 mm (pré-tratada por extracção de água contracorrente a 180 - 200 °C durante 5 - 10 min.

com uma razão de fluxo de água e matéria seca de 5:1) correspondente a 7 kg de MS (= 20 kg de palha pré-tratada) foi colocada num misturador de cimento giratório convencional, com um eixo horizontal inclinado aproximadamente 10 graus. O misturador tinha 2 nervuras internas ao longo do comprimento do eixo para assegurar a mistura do material. Uma tampa foi montada na abertura para evitar a evaporação do misturador. O tambor misturador girou ao longo do eixo horizontal com uma velocidade de 29 rpm.

200 - 1150 mL de Celluclast 1,5 FG L e 40 - 225 mL de Novozym 188 foram adicionados à palha. Isto resultou num teor final em matéria seca de 30 %. A carga de enzima correspondeu a 3 - 15 UPF/g de MS. O pH foi ajustado a 4,8 a 5,0 por adição de carbonato de sódio.

O misturador de cimento foi aquecido até 40 - 45 °C pela utilização de um aquecedor com ventilador. A mistura/hidrólise do material foi realizada durante 22 horas. Dependendo da carga de enzima isto resultou num líquido mais ou menos viscoso sem quaisquer fibras restantes grandes. A palha pré-tratada foi degradada a uma pasta em ap. 3 - 5 horas. Após 5 - 24 horas da mistura a pasta mudou a um líquido viscoso. Experiências de controlo com palha de trigo pré-tratada somente ou palha de trigo pré-tratado a somente 160 °C, mas utilizando a mesma carga de enzima não mostraram sinal de liquefacção da palha.

Fermentação e sacarificação simultânea foram realizadas pela adição de levedura ao misturador de cimento após 24 horas de hidrólise a 40 - 45 °C utilizando uma carga de enzima de 10 - 15 UPF/g de MS. A temperatura foi permitida que se arrefecesse a menos de 35 °C e levedura comprimida (Fermento de padaria, De Danske Spritfabrikker) foi adicionada a uma concentração de aproximadamente 1 % (p/p) com base na matéria seca inicial de palha. A

sacarificação e fermentação foram continuadas durante 48 horas a 25 °C.

O material resultante foi centrifugado durante 15 min a 2500 rpm. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de 0,45 µm e analisado para açúcares em HPLC. A uma carga de enzima de 15 UPF/g de MS, o sobrenadante continha 70 g/l de glucose, 30 g/l de xilose após 24 horas de hidrólise. Isto correspondeu a 50 % de hidrólise da celulose e hemicelulose originalmente presente na palha. A fermentação e sacarificação simultânea utilizando uma carga de enzima de 10 UPF/g de MS resultou em 42 g/l de etanol e 30 g/l de xilose.

Exemplo 3: Liquefacção, hidrólise e fermentação

O reactor de hidrólise foi projectado com a finalidade de realizar experiências com concentrações de sólidos de hidrólise e liquefacção acima de 20 % de MS (fig. 1). O reactor consistiu em um tambor horizontalmente colocado dividido em 5 câmaras separadas cada 20 cm de largura e 60 cm de diâmetro. Um veio giratório horizontal montado com três pás em cada câmara foi utilizado para a mistura/agitação. Um motor de 1,1 kW foi utilizado como mecanismo de impulsão e a velocidade rotacional foi ajustável dentro do intervalo de 2,5 e 16,5 rpm. A direcção de rotação foi programada para comutar duas vezes por minuto entre sentido horário e anti-horário. Uma camisa de aquecimento preenchida com água no lado de fora possibilitou o controlo da temperatura até 80 °C.

As câmaras foram preenchidas com palha de trigo pré-tratada prensada com um tamanho médio de aproximadamente 40 mm (pré-tratada por extracção de água contracorrente a 180 - 200 °C durante 5 - 10 min. com uma razão de fluxo de água e matéria seca de 5:1) e água para dar um teor em MS inicial de 20 a 40 %. Celluclast 1,5 FG L e Novozym 188 em razão 5:1 foram adicionados para dar uma carga de enzima de 7 UPF por g de MS. A liquefacção e hidrólise foram

realizadas a 50 °C e pH 4,8 a 5,0. A velocidade de mistura foi 6,6 rpm. Experiências de fermentação e sacarificação simultânea (FSS) foram realizadas abaixando a temperatura até 32 °C após 8 h de liquefacção e hidrólise e seguindo a adição de 15 g de fermento de padaria comprimido (De Danske Spritfabrikker) por kg de MS inicial.

Liquefacção e hidrólise foram possíveis com teor em MS inicial de até 40 % de MS (fig. 2 e 3). Com 40 % de MS inicial foi possível alcançar concentrações de glucose de 80 g kg⁻¹ após 96 h. Foi também possível operar o processo como FSS (fig. 3), deste modo reduzindo a inibição de produto das celulasas causada pela acumulação de glucose. Foi possível fermentar os hidrolisados com até 40 % de teor em MS inicial utilizando fermento de padaria normal. Sob condições não completamente anaeróbicas o rendimento de etanol foi 80, 79, 76, 73 e 68 % do qual foi obtenível teoricamente a 20, 25, 30, 35 e 40 % de MS, respectivamente.

Exemplo 4: liquefacção, sacarificação e fermentação de toda a cultura

A biomassa que contém amido e lignocelulósica pode ser processada simultaneamente utilizando mistura por gravidade e uma mistura de celulasas, hemicelulasas e amilases. As biomassas lignocelulósicas podem ser derivadas de culturas agrícolas que consistem em, por exemplo, restos culturais do milho, palha, por exemplo, de arroz, trigo, centeio, aveia, cevada, centeio, colza e sorgo, tubérculos, por exemplo, beterraba, batata, cereais de, por exemplo, arroz, trigo, centeio, aveia, cevada, centeio, colza, sorgo, madeira que consiste em madeira macia, por exemplo, *Pinus sylvestris*, *Pinus radiata*, madeira dura, por exemplo, *Salix spp*, *Eucalyptus spp*, resíduos sólidos urbanos, resíduos de papel e biomassas similares.

A reactor de hidrólise descrito em exemplo 3 foi utilizado para as experiências. Palha de trigo

(primariamente uma fonte de lignocelulose) foi pré-tratada utilizando extracção de água contracorrente a 180 - 200 °C durante 5 - 10 min. com uma razão de fluxo de água e matéria seca de 5:1. Grão de trigo (primariamente uma fonte de amido) foi moído seco utilizando um moinho de cilindros Kongskilde. O grão de trigo e palha pré-tratada com um tamanho médio de aproximadamente 40 mm foram misturados numa razão 1: 1 numa base seca. A MS foi ajustada a entre 30 e 40 % por adição de água. Celluclast 1,5 FG L e Novozym 188 numa razão 5:1 foram adicionados para dar uma carga de enzima de 7 UPF por g MS de palha. A hidrólise de amido foi levada a cabo utilizando enzima esmagada fria NS50033 (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) numa carga de 3,5 g por kg de grão de trigo. A liquefacção e hidrólise foram realizadas a 50 °C e pH 4,8 a 5,0. Após 8 h, a temperatura foi abaixada até 34 °C e 15 g de fermento de padaria comprimido (De Danske Spritfabrikker) foram adicionados por kg de MS inicial. Uma experiência com palha somente a 30 % de MS foi executada em paralelo.

Misturar palha com grão resultou numa acumulação inicial rápida de glucose na etapa de liquefacção e hidrólise em comparação com a aplicação de palha somente (fig. 4). Após 96 h de liquefacção e FSS a concentração de etanol foi de 41 g kg⁻¹ utilizando somente palha de trigo como o único substrato (fig. 4). Na experiência com palha e grão a concentração de etanol alcançou 68 g kg⁻¹.

Exemplo 5: Liquefacção a temperatura baixa de amido ou materiais que contêm amido

Um processo de acordo com a presente invenção pode também ser aplicado para o processamento a temperatura baixa de amido refinado ou materiais amido que contêm (por exemplo, beterraba, batata, cereais de, por exemplo, arroz, trigo, centeio, aveia, cevada, centeio, sorgo). De acordo com exemplo 4, o pré-tratamento térmico do grão não é necessário para a liquefacção e hidrólise de amido. A

moagem seca é por outro lado geralmente utilizada para o pré-tratamento de grãos que contêm amido. Os grãos moídos secos com um teor em matéria seca de 20 - 60 % são carregados no misturador de queda livre. Enzima esmagada fria NS50033 (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) ou alfa-amilase e glucoamilases são adicionadas simultaneamente. Uma sacarificação e liquefacção completa do amido são então possíveis num processo de um pote. Os intervalos de temperatura e pH durante o processo de hidrólise enzimática são definidos pelas enzimas e serão no intervalo de 25 - 60 °C, preferentemente 40 - 55 °C, e pH 3 - 12, preferentemente pH 3 - 8, respectivamente.

O processo pode ser combinado com FSS.

Literatura Citada

Galbe, M., Zacchi, G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:618-628.

Giovannozzi-Sermanni, G., D'Annibale, A., Perani, C., Porri, A., Falesiedi, G. (2002). Solid-state biorreactors for the sustainability. <http://www.unitus.it/dipartimenti/dabac/progetti/ssbiorreactors/solidstatebiorreactor.htm>

Gregg, D., Saddler, J.N. (1995). Bioconversion of lignocellulosic residues to ethanol: Process flowsheet development. *Biomass Bioenerg.* 9:287-302.

Mais, U., Esteghalalian, A.R., Saddler, J.N. (2002). Influence of mixing regime on enzymatic saccharification of steam-exploded softwood chips. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98-100:463-472.

US4409329

US2002117167A

US2004005674A

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- US 4409329 A [0019] [0062]
- US 2002117167 A [0020] [0062]
- US 2004005674 A [0021] [0062]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

- **Monagheghi, A. et al.** High solids simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 01 de Maio de 1992, vol. 33 (2), 67-81 [0022]
- **Galbe, M.; Zacchi, G.** A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, vol. 59, 618-628 [0062]
- **Giovannozzi-Sermanni, G.; D'Annibale, A.; Perani, C.; Porri, A.; Falesiedi, G.** Solid-state biorreactors for the sustainability, 2002 [0062]
- **Gregg, D.; Saddler, J.N.** Bioconversion of lignocellulosic residues to ethanol: Process flow-sheet development. *Biomass Bioenerg.*, 1995, vol. 9, 287-302 [0062]
- **Mais, U.; Esteghalalian, A.R.; Saddler, J.N.** Influence of mixing regime on enzymatic saccharification of steam-exploded softwood chips. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2002, vol. 98-100, 463-472 [0062]

REIVINDICAÇÕES

1. Um processo para liquefacção e sacarificação de biomassas que contêm polissacáridos que compreendem biomassa lignocelulósica, **caracterizado por** a dita biomassa ser submetida a hidrólise enzimática combinada utilizando pelo menos uma celulase e misturada por meio de um misturador de queda livre tal como um misturador de tambor ou um misturador giratório que proporciona processamento mecânico e/ou degradação da biomassa de modo que, no processo, a biomassa é liquefeita e sacarificada a um líquido adequado para processamento posterior tal como fermentação, em que a biomassa tem um teor em matéria seca de entre 20 % e 40 % no início da mistura/hidrólise.

2. Um processo de acordo com a reivindicação 1, em que a dita biomassa que contêm polissacáridos é uma biomassa lignocelulósica derivada de culturas agrícolas que consistem em, por exemplo, caules e folhas de milho, bagaço, palha, por exemplo, de arroz, trigo, centeio, aveia, cevada, colza e sorgo, madeira que consiste em madeira macia, por exemplo, *Pinus sylvestris*, *Pinus radiata*, madeira dura, por exemplo, *Salix spp.*, *Eucalyptus spp.* ou resíduos sólidos urbanos, resíduos de papel, fracção de fibra de processamento de biogás, estrume e biomassas similares.

3. Um processo de acordo com a reivindicação 1, em que a dita biomassa que contêm polissacáridos é uma mistura de amido, por exemplo, grãos que contêm amido ou amido refinado, e biomassas lignocelulósicas derivadas de culturas agrícolas que consistem em, por exemplo, caules e folhas de milho, palha, por exemplo, de arroz, trigo, centeio, aveia, cevada, colza e sorgo, madeira que consiste em madeira macia, por exemplo, *Pinus sylvestris*, *Pinus*

radiata, madeira dura, por exemplo, *Salix spp.*, *Eucalyptus spp.*, resíduos sólidos urbanos, resíduos de papel e biomassas similares.

4. Um processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 - 3, em que o líquido que resulta do processo é adequado para processamento posterior tal como fermentação.

5. Um processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 - 4, em que o teor em matéria seca da biomassa que contém polissacáridos é entre 25 - 40 %.

6. Um processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 - 3 em que pelo menos 20 % (p/p) da biomassa lignocelulósica tem um tamanho de fibra acima de 26 mm.

7. Um processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 - 3, em que a biomassa lignocelulósica foi submetida a pré-tratamento térmico entre 110 - 250 °C.

8. Um processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 - 7, em que a hidrólise enzimática é realizada com uma combinação de enzimas hidrolíticas que incluem uma enzima hidrolítica que actua em hidratos de carbono e uma enzima oxidativa.

9. Um processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 3, em que a hidrólise enzimática de grãos que contêm amido é realizada com uma combinação de enzimas hidrolíticas e enzimas proteolíticas.

10. Um processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 - 9, em que a hidrólise enzimática é realizada a 0 - 105 °C.

11. Um processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 - 10, em que o tempo de tratamento para a hidrólise enzimática é 0 - 72 horas.
12. Um processo de acordo com a reivindicação 11, em que o tempo de tratamento é 3 - 24 horas.
13. Um processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 - 11 que é realizado como um processo descontínuo, semi-contínuo, contínuo ou um processo similar.
14. Um processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 - 12 em que é incluída uma etapa de processamento posterior.
15. Um processo de acordo com a reivindicação 14 em que a etapa de processamento posterior é fermentação, gasificação, hidrogenação, síntese orgânica ou produção de biogás e ração.
16. Um processo de acordo com a reivindicação 1, em que a mistura é proporcionada por um misturador com um veio de agitação colocado horizontalmente que levanta a biomassa.

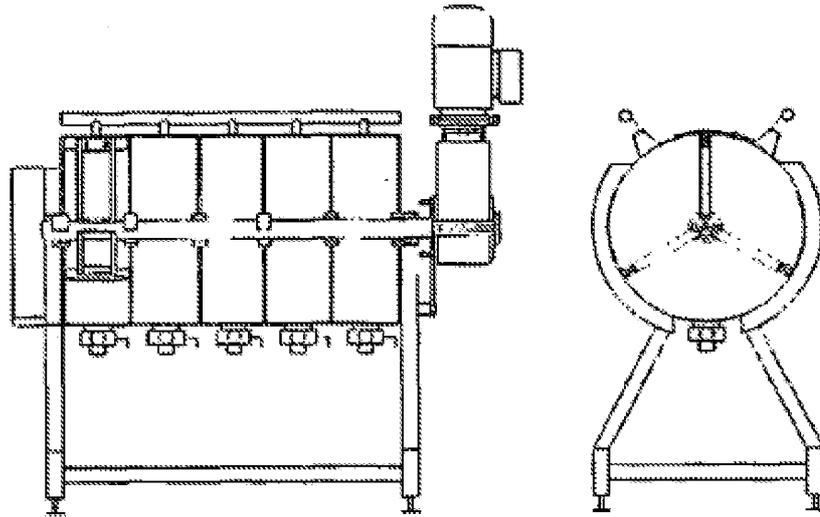


Figura 1: Vista longitudinal (esquerda) e vista transversal (direita) do reactor de hidrólise de 5 câmaras

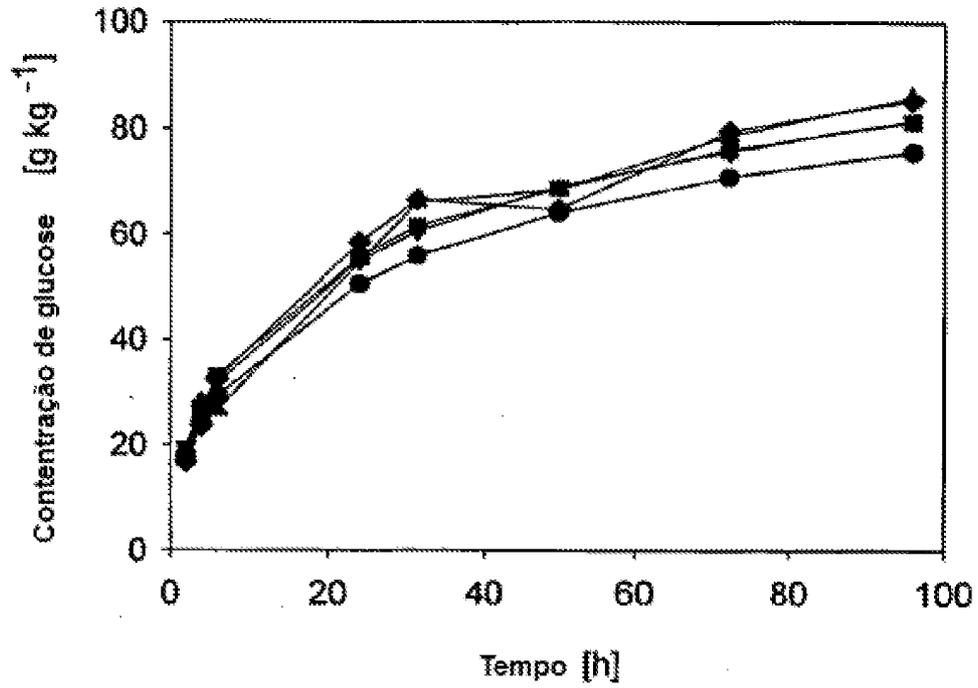


Figura 2: Concentração de glicose durante liquefação e hidrólise de palha pré-tratada de trigo num teor em matéria seca de 20 % (•), 25 % (▼), 30 % (■), 35 % (◆) e 40 % (▲) utilizando uma carga de enzima de $7 \text{ UPF (g MS)}^{-1}$

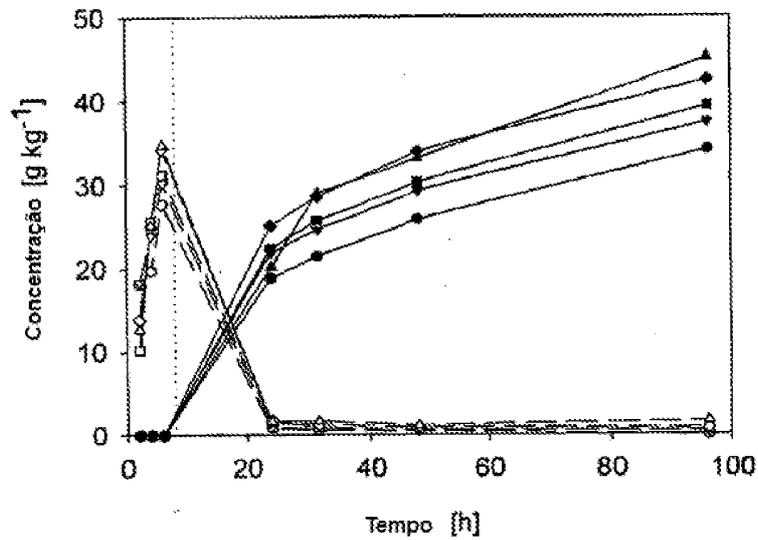


Figura 3: Concentração de glucose (símbolos abertos) e etanol (símbolos fechados) durante liquefação, hidrólise e fermentação de palha pré-tratada de trigo num teor em matéria seca de 20 % (•), 25 % (▼), 30 % (■), 35 % (◆) e 40 % (▲) utilizando uma carga de enzima de 7 UPF (g MS)⁻¹. Levedura adicionada após 8 h (linha pontilhada).

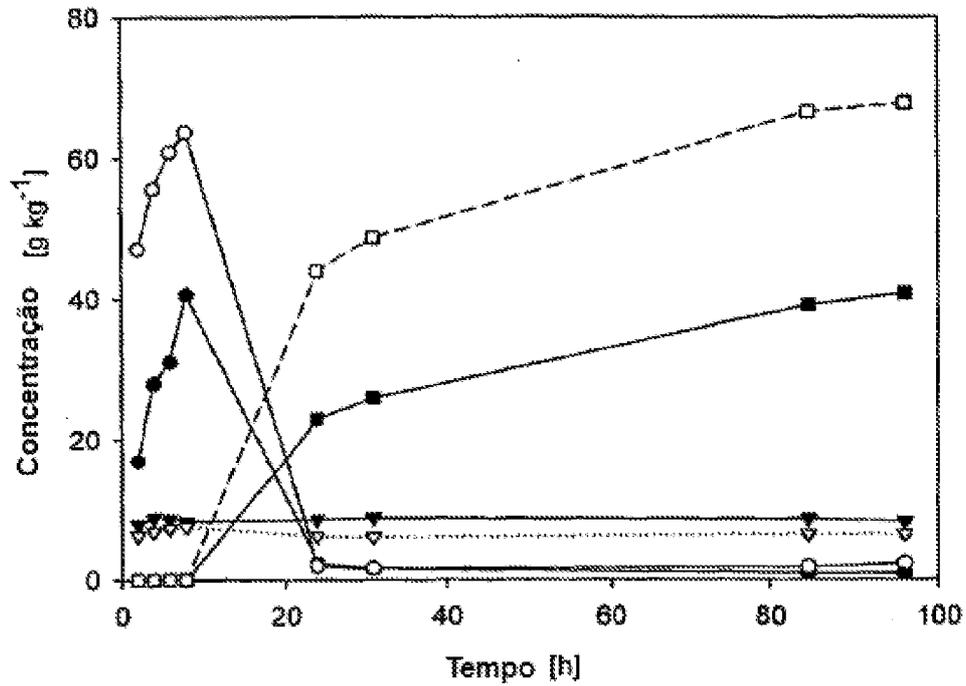


Figura 4: Concentração de glucose (•), xilose (▼) e etanol (■) durante liquefação e fermentação de palha pré-tratada de trigo (símbolos fechados) e uma mistura de palha pré-tratada de trigo e grão de trigo (símbolos abertos). Levedura foi adicionada após 8 h de liquefação e hidrólise