

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 682**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06	(2006.01)
C12P 7/10	(2006.01)
C12P 19/02	(2006.01)
C12P 19/14	(2006.01)
C13K 1/02	(2006.01)
C13K 1/04	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.02.2013 PCT/JP2013/053267**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO2013122051**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2013 E 13748499 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2816124**

54 Título: **Procedimiento para producir una solución de azúcar con una concentración baja de cumaramida y/o ferulamida**

30 Prioridad:

13.02.2012 JP 2012028962

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

25.05.2017

73 Titular/es:

**TORAY INDUSTRIES, INC. (100.0%)
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-8666, JP**

72 Inventor/es:

**NIWA, MASAHIRO;
SHINDO, SHO;
NISHIDA, TAKANORI;
KISHIMOTO, JUNPEI;
MINAMINO, ATSUSHI;
KURIHARA, HIROYUKI y
YAMADA, KATSUSHIGE**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Carlos

ES 2 613 682 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir una solución de azúcar con una concentración baja de cumaramida y/o ferulamida

5 Sector

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir una solución de azúcar con una concentración baja de cumaramida y/o ferulamida, a partir de biomasa celulósica, y a un procedimiento para producir etanol.

10 Antecedentes

Se ha utilizado un procedimiento de producción de fermentación de una sustancia química a partir de azúcar como materia prima en la producción de diversas materias primas industriales. Recientemente, como azúcar que se utiliza como materia prima de fermentación, se ha utilizado industrialmente una sustancia derivada de una materia prima comestible, tal como caña de azúcar, almidón y remolacha azucarera. Sin embargo, la materia prima comestible puede ser insuficiente debido a un aumento de la población mundial en el futuro, y esto puede causar un repentino aumento de los precios. Por lo tanto, el desarrollo de un procedimiento para producir de forma eficiente una solución de azúcar a partir de un material no comestible renovable, es decir, biomasa celulósica, ha cobrado protagonismo.

20 La biomasa celulósica incluye principalmente lignina, que es un polímero aromático, y celulosa y hemicelulosa, las dos polímeros monosacáridos. Entre los ejemplos de un procedimiento para producir una solución de azúcar a partir de biomasa celulósica como materia prima se pueden incluir un procedimiento para hidrolizar directamente biomasa celulósica como materia prima usando ácido sulfúrico concentrado o similar, y un procedimiento de sacarificación enzimática con pretratamiento, en el que la biomasa celulósica se somete previamente a un pretratamiento, tal como un tratamiento con vapor, un tratamiento de pulverización fina y un tratamiento con ácido sulfúrico diluido, para separar la celulosa y la hemicelulosa de la lignina, y la celulosa y la hemicelulosa se hidrolizan con una enzima diastásica, tal como la celulasa.

30 Una solución de azúcar producida a partir de biomasa celulósica obtenida por estos procedimientos tiene un problema en el que durante un procedimiento de producción de la solución de azúcar, se produce un inhibidor de la fermentación, tal como hidroximetilfurfural (HMF), furfural y vainillina, y durante la producción de alcohol y similares mediante la fermentación de la solución de azúcar obtenida, la fermentación de la solución de azúcar está inhibida. Además, la concentración de azúcar de una solución de azúcar que se va a obtener puede ser baja dependiendo de las condiciones de tratamiento de la producción de la solución de azúcar. En este caso, la solución de azúcar debe concentrarse varias veces, hasta aproximadamente 10 veces, antes de la etapa de fermentación. Como procedimiento para eliminar el inhibidor de la fermentación en la solución de azúcar y, al mismo tiempo, aumentar la concentración de azúcar durante la producción de la solución de azúcar a partir de la biomasa celulósica como materia prima, se ha dado a conocer un procedimiento para tratar la solución de azúcar utilizando una membrana de nanofiltración (por ejemplo, véanse las referencias de patente 1 y 2).

40 En general, el procedimiento de sacarificación enzimática con pretratamiento tiene la ventaja de que el impacto ambiental es menor en comparación con el procedimiento para hidrolizar directamente la materia prima, pero, por otra parte, el rendimiento en azúcar es bajo. Como procedimiento de pretratamiento en el que el impacto ambiental es pequeño y se obtiene un alto rendimiento en azúcar, se ha propuesto un procedimiento de pretratamiento que utiliza un agente de tratamiento que contiene amoníaco (véase, por ejemplo, la referencia de patente 3).

50 Dicha etapa de tratamiento con amoníaco es también parte de un procedimiento de producción de una solución acuosa de azúcar refinada que utiliza biomasa que contiene celulosa como material de alimentación, que comprende (1) una etapa de descomposición de la biomasa que contiene celulosa, tal como utilizando una enzima después del tratamiento con amoníaco, para producir una solución acuosa de azúcar (2) una etapa de someter la solución acuosa de azúcar resultante de la etapa (1) a un tratamiento de coagulación, (3) una etapa de someter la solución acuosa de azúcar resultante de la etapa (2) a microfiltración y/o ultrafiltración para recuperar una solución acuosa de azúcar desde el lado aguas abajo y (4) una etapa de someter la solución acuosa de azúcar resultante de la etapa (3) a nanofiltración y/u ósmosis inversa para recuperar una solución acuosa de azúcar refinada desde el lado de aguas arriba mientras se eliminan las sustancias que obstaculizan la fermentación desde el lado de aguas abajo, respectivamente (por ejemplo, véase las referencias de patente 4 y 5).

60 Además, la referencia no de patente 6 se refiere a un procedimiento para producir etanol mediante el pretratamiento de pasto varilla con amoníaco, llevando a cabo una sacarificación enzimática seguida de fermentación de la solución de azúcar obtenida. Dicho documento indica que los compuestos de cumaramida y/o ferulamida pueden formarse tras el pretratamiento del pasto varilla con amoníaco.

Lista de citas

Referencias de patente

- 5 Referencia de patente 1: folleto de la publicación internacional no. 2009/110374
Referencia de patente 2: folleto de la publicación internacional no. 2010/067785
Referencia de patente 3: publicación de patente japonesa abierta a inspección pública Nº 2008-161125
Referencia de patente 4: folleto de la publicación internacional no. 2011/111451
Referencia de patente 5: folleto de la publicación internacional no. 2011/162009
10 Referencia no de patente 6: Bowman y otros, Bioresource Technology 2012, volumen 110, páginas 437-447

Sumario

Problema técnico

15 En general, en una solución de azúcar obtenida a partir de biomasa celulósica que se somete a un pretratamiento, tal como un tratamiento con vapor, como se ha descrito anteriormente, se produce un inhibidor de la fermentación, tal como hidroximetilfurfural (HMF), furfural y vainillina durante un procedimiento de producción de la solución de azúcar, y la fermentación de la solución de azúcar está inhibida durante la producción de alcohol y similares mediante la fermentación de la solución de azúcar obtenida.

20 Por otra parte, en una solución de azúcar obtenida mediante el procedimiento de sacarificación enzimática con pretratamiento utilizando el pretratamiento con un agente de tratamiento que contiene amoníaco, como se describe en las referencias de patente 3-6, el inhibidor de la fermentación conocido descrito anteriormente apenas se detecta, pero se ha encontrado que la fermentación de la solución de azúcar está inhibida como una solución de azúcar obtenida usando biomasa celulósica.

25 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es dar a conocer un procedimiento para producir una solución de azúcar que sea capaz de mejorar la eficacia de la fermentación de la solución de azúcar durante la fermentación de la solución de azúcar que se obtiene utilizando biomasa celulósica pretratada con un agente de tratamiento que contiene amoníaco, que puede alcanzar un alto rendimiento de azúcar, con el fin de mejorar la eficiencia de la producción de etanol y similares utilizando la solución de azúcar obtenida a partir de biomasa celulósica, así como dar a conocer una solución de azúcar y un procedimiento para producir etanol.

35 Solución al problema

Con el fin de resolver el problema y lograr el objetivo, los presentes inventores han investigado intensamente un procedimiento para producir una solución de azúcar y un procedimiento para producir etanol. Como resultado, los inventores han descubierto que un hidrolizado (solución de azúcar tratada con amoníaco), obtenido mediante la hidrólisis con una enzima de la biomasa celulósica pretratada con amoníaco, incluye cumaramida y ferulamida como inhibidores de la fermentación específicos. Sobre la base del hallazgo obtenido, los presentes inventores han descubierto que, cuando se eliminan la cumaramida y/o la ferulamida en la solución de azúcar tratada con amoníaco, mediante purificación para fijar la concentración de cumaramida y/o ferulamida en un intervalo predeterminado, se puede mejorar la eficiencia de la fermentación de la solución de azúcar tratada con amoníaco. La presente invención se ha completado sobre la base de los hallazgos.

Específicamente, la presente invención tiene las siguientes configuraciones (1) a (5).

- 50 (1) Un procedimiento para producir una solución de azúcar, que comprende:
una etapa de pretratamiento que consiste en tratar la biomasa celulósica con un agente de tratamiento que contiene amoníaco para obtener un producto tratado con amoníaco;
una etapa de preparación de una solución de azúcar tratada con amoníaco que consiste en sacarificar enzimáticamente el producto tratado con amoníaco para obtener una solución de azúcar tratada con amoníaco; y
55 una etapa de preparación de una solución de azúcar purificada que consiste en eliminar la cumaramida y/o la ferulamida en la solución de azúcar tratada con amoníaco mediante purificación y determinar la concentración de cumaramida y/o ferulamida para obtener una solución de azúcar purificada que tiene una concentración de cumaramida y/o ferulamida de 10 a 1.100 ppm.
(2) El procedimiento para producir una solución de azúcar, según el punto (1) descrito anteriormente, en el que la biomasa celulósica contiene biomasa herbácea.
60 (3) El procedimiento para producir una solución de azúcar, según los puntos (1) o (2) descritos anteriormente, en el que se usa una membrana de nanofiltración en un tratamiento de purificación de la solución de azúcar tratada con amoníaco.
(4) El procedimiento para producir una solución de azúcar, según cualquiera de los puntos (1) a (3) descritos anteriormente, en el que el producto tratado con amoníaco se sacarifica enzimáticamente con una solución que tiene una concentración de una materia sólida del producto tratado con amoníaco en un intervalo del 1 al 10% en masa durante la sacarificación enzimática del producto tratado con amoníaco.
65

(5) El procedimiento, según cualquiera de los puntos (1) a (4) descritos anteriormente, que comprende además la utilización de la solución de azúcar obtenida como materia prima de la fermentación para producir etanol.

Efectos ventajosos de la invención

5 Según la presente invención, cuando se fermenta una solución de azúcar obtenida utilizando biomasa celulósica pretratada con un agente de tratamiento que contiene amoníaco, se puede mejorar la eficiencia de la fermentación de la solución de azúcar.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un diagrama de flujo que muestra un ejemplo de un procedimiento para producir una solución de azúcar según una realización de la presente invención.
 La figura 2 es un diagrama que muestra los resultados del análisis de compuestos aromáticos en una solución de azúcar tratada con amoníaco mediante HPLC.
 La figura 3 es un diagrama que muestra un espectro de absorción UV del pico 1 de la solución de azúcar tratada con amoníaco.
 La figura 4 es un diagrama que muestra un espectro de absorción UV del pico 2 de la solución de azúcar tratada con amoníaco.
 La figura 5 es un diagrama que muestra un espectro de absorción UV de una muestra estándar de cumaramida.
 La figura 6 es un diagrama que muestra un espectro de absorción UV de una muestra estándar de ferulamida.
 La figura 7 es un diagrama que muestra la relación entre un tiempo de fermentación y una concentración de etanol de una solución concentrada por NF y una solución concentrada por OI.
 La figura 8 es un diagrama que muestra la relación entre un tiempo de fermentación y una concentración de xilosa de la solución concentrada por NF y la solución concentrada por OI.
 La figura 9 es un diagrama que muestra la relación entre el tiempo de fermentación y la concentración de etanol de la solución concentrada por NF y la solución concentrada por OI.
 La figura 10 es un diagrama que muestra la relación entre el tiempo de fermentación y la concentración de xilosa de la solución concentrada por NF y la solución concentrada por OI.

Descripción de las realizaciones

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describe con mayor detalle con referencia a los dibujos. Además, los constituyentes divulgados se pueden utilizar en una combinación apropiada o mediante una selección apropiada.

El procedimiento para producir una solución de azúcar según la realización de la presente invención se describe con referencia a los dibujos. La figura 1 es un diagrama de flujo que muestra un ejemplo del procedimiento para producir una solución de azúcar según esta realización. Como se muestra en la figura 1, el procedimiento para producir una solución de azúcar según esta realización incluye las siguientes etapas:

- (A) una etapa de pretratamiento que consiste en tratar la biomasa celulósica con un agente de tratamiento que contiene amoníaco para obtener un producto tratado con amoníaco (etapa S11);
- (B) una etapa de preparación de una solución de azúcar tratada con amoníaco que consiste en sacarificar enzimáticamente el producto tratado con amoníaco para preparar una solución de azúcar tratada con amoníaco (etapa S12); y
- (C) una etapa de preparación de una solución de azúcar purificada que consiste en eliminar la cumaramida y/o la ferulamida en la solución de azúcar tratada con amoníaco mediante purificación para obtener una solución de azúcar purificada que tiene una concentración de cumaramida y/o ferulamida de 10 a 1.100 ppm (etapa S13).

En el presente documento, biomasa celulósica significa biomasa herbácea, tal como bagazo, pasto varilla, hierba de elefante, *Erianthus*, rastrojo de maíz, paja de arroz y paja de cebada, o biomasa leñosa, tal como árboles y materiales de construcción residuales. La biomasa celulósica contiene polisacáridos, tal como celulosa y hemicelulosa. Se puede producir una solución de azúcar mediante la hidrólisis de dichos polisacáridos.

En general, la hidrólisis de la biomasa celulósica se denomina sacarificación. En esta realización, una solución de azúcar producida mediante sacarificación de biomasa celulósica se denomina solución de azúcar derivada de celulosa. La solución de azúcar derivada de celulosa incluye monosacáridos, tal como glucosa, xilosa, manosa y arabinosa, y polisacáridos solubles en agua, tal como celobiosa, celooligosacárido y xiloligosacárido. Dichos sacáridos pueden utilizarse como materia prima de la fermentación (fuente de carbono) de un microorganismo y son convertidos por el microorganismo en diversas sustancias químicas, tales como etanol, ácido láctico y aminoácidos.

<Etapa de pretratamiento: Etapa S11>

La biomasa celulósica se trata con un agente de tratamiento que contiene amoníaco para obtener un producto tratado con amoníaco (etapa de pretratamiento: etapa S11). En general, los ejemplos de un procedimiento de

pretratamiento de biomasa celulósica pueden incluir un tratamiento con vapor, un tratamiento de pulverización fina, un tratamiento de chorro, un tratamiento ácido con una solución ácida de ácido sulfúrico o similar, un tratamiento alcalino con una solución alcalina de hidróxido de sodio o similar, un tratamiento con amoníaco (NH₃), un tratamiento enzimático y un tratamiento con un compuesto que contiene un grupo amino (NH₂). Entre estos procedimientos de pretratamiento, según esta realización, la biomasa celulósica se pretrata con un agente de tratamiento que contiene amoníaco. El amoníaco se obtiene y se manipula con facilidad. Por un procedimiento de pretratamiento con un agente de tratamiento que contiene amoníaco, la biomasa celulósica puede sacarificarse eficazmente en comparación con otros procedimientos de pretratamiento. Cuando la biomasa celulósica se trata previamente con un agente de tratamiento que contiene amoníaco antes de la sacarificación, se puede mejorar la eficiencia de la sacarificación de la biomasa celulósica.

Como agente de tratamiento que contiene amoníaco, se puede utilizar amoníaco en combinación con algunos de entre un compuesto que contiene un grupo amino y otro compuesto. Entre los ejemplos del compuesto que contiene un grupo amino se pueden incluir metilamina, etilamina, propilamina, butilamina, hidrazina, etilendiamina, propanodiamina y butanodiamina. Entre los ejemplos del otro compuesto se pueden incluir dióxido de carbono, nitrógeno, etileno, metano, etano, propano, butano, pentano, hexano, tolueno, benceno, fenol, dioxano, xileno, acetona, cloroformo, tetracloruro de carbono, etanol, metanol, propanol y butanol.

El agente de tratamiento que contiene amoníaco puede ser cualquiera de entre un líquido, un gas y una fase mixta gas-líquido. Incluso cuando se usa amoníaco en cualquier estado de entre un líquido, un gas y una fase mixta gas-líquido, se puede obtener una biomasa celulósica que tiene una excelente eficacia de sacarificación enzimática. El agente de tratamiento que contiene amoníaco puede ser un fluido de amoníaco supercrítico o un fluido de amoníaco subcrítico. Un procedimiento de tratamiento con un fluido de amoníaco supercrítico no está particularmente limitado y puede seleccionarse apropiadamente dependiendo del propósito. Por ejemplo, este procedimiento de tratamiento se puede llevar a cabo introduciendo biomasa celulósica y amoníaco en un reactor, tal como una autoclave, y aplicando calor y presión al interior del reactor para hacer que el amoníaco llegue a un estado supercrítico. Dado que el fluido de amoníaco supercrítico tiene una alta permeabilidad en el interior de la biomasa celulósica, la biomasa celulósica adecuada para la sacarificación enzimática puede obtenerse de manera eficiente y rápida.

La biomasa celulósica reunida puede utilizarse tal cual o la biomasa celulósica se puede cortar o pulverizar antes de un pretratamiento para formar partículas de biomasa celulósica que tienen un diámetro de partícula promedio que es igual o menor que un diámetro de partícula predeterminado y, después, se somete a pretratamiento. Cuando el diámetro de partícula de la biomasa celulósica se disminuye previamente, la manipulación es fácil y puede mejorarse la eficiencia del tratamiento con el agente de tratamiento que contiene amoníaco.

El diámetro de partícula de las partículas de biomasa celulósica no está particularmente limitado y puede seleccionarse apropiadamente dependiendo de los propósitos de la misma. Por ejemplo, el diámetro de partícula es, preferentemente, de 5 mm o menor, más preferentemente, de 1 mm o menor, y además preferentemente, de 0,1 mm o menor. Cuando el diámetro de partícula de las partículas de biomasa celulósica es superior a 5 mm, la biomasa celulósica puede no estar suficientemente sometida a un tratamiento de sacarificación. Cuando el diámetro de partícula de las partículas de biomasa celulósica está comprendido dentro del intervalo indicado anteriormente, el tiempo requerido para el tratamiento de sacarificación de la biomasa celulósica puede acortarse y puede reducirse la cantidad de amoníaco que se va a utilizar.

La biomasa celulósica reunida puede utilizarse tal cual y pretratarse con el agente de tratamiento que contiene amoníaco, pero la presente invención no está limitada a esto. Desde el punto de vista de la recuperación del amoníaco que se va a utilizar en un pretratamiento de biomasa celulósica, la biomasa celulósica puede secarse y pretratarse mediante la adición del agente de tratamiento que contiene amoníaco.

Como procedimiento de pretratamiento de la biomasa celulósica, se utiliza un procedimiento de tratamiento con el agente de tratamiento que contiene amoníaco, pero el procedimiento de tratamiento con el agente de tratamiento que contiene amoníaco puede utilizarse en combinación con el otro procedimiento de pretratamiento de la biomasa celulósica, como se ha descrito anteriormente.

<Etapa de preparación de solución de azúcar tratada con amoníaco: Etapa S12>

Se añade una enzima al producto tratado con amoníaco obtenido en la etapa de pretratamiento (etapa S11), para realizar la sacarificación mediante un tratamiento enzimático y se obtiene una solución de azúcar tratada con amoníaco (hidrolizado) (etapa de preparación de la solución de azúcar tratada con amoníaco: etapa S12). En esta realización, la solución de azúcar obtenida por sacarificación de la biomasa celulósica tratada con el agente de tratamiento que contiene amoníaco se denomina solución de azúcar tratada con amoníaco.

La solución de azúcar preparada a partir de biomasa celulósica (solución de azúcar derivada de celulosa) contiene un inhibidor o inhibidores de la fermentación, cuya cantidad o componente varía dependiendo del procedimiento de pretratamiento o sacarificación. La inhibición de la fermentación significa un fenómeno en el que, cuando se produce

- una sustancia química como materia prima de la fermentación a partir de la solución de azúcar derivada de celulosa, disminuyen la velocidad de crecimiento de un microorganismo, la cantidad de producción, la dosis acumulada y la velocidad de producción de la sustancia química en cooperación con la utilización de un monosacárido de muestra como materia prima de la fermentación. El inhibidor de la fermentación representa una sustancia causante que produce un fenómeno de inhibición de la fermentación en dicha etapa de fermentación para evitar una reacción de fermentación. Entre los ejemplos específicos del inhibidor de la fermentación se pueden incluir ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, furfural e hidroximetilfurfural (HMF), que son sustancias excesivamente descompuestas de azúcar, y vainillina, acetovainillina y guayacol, que son compuestos aromáticos derivados de lignina.
- La solución de azúcar tratada con amoníaco contiene cumaramida y ferulamida como inhibidores de la fermentación. La cumaramida y la ferulamida no están contenidas en una solución de azúcar derivada de celulosa obtenida por un tratamiento distinto del tratamiento con amoníaco, pero están contenidas en la solución de azúcar tratada con amoníaco. Por lo tanto, la cumaramida y la ferulamida son inhibidores específicos de la fermentación contenidos en la solución de azúcar tratada con amoníaco. La cumaramida y la ferulamida son compuestos amida producidos por condensación de ácido cumárico y ácido ferúlico con amoníaco, respectivamente. El ácido cumárico o el ácido ferúlico están contenidos en la biomasa celulósica. Por lo tanto, la cumaramida y la ferulamida de la solución de azúcar tratada con amoníaco se producen mediante reacciones de condensación de ácido cumárico y ácido ferúlico, respectivamente, en la biomasa celulósica, con una molécula de amoníaco por el tratamiento con amoníaco durante la adición del agente de tratamiento que contiene amoníaco a la biomasa celulósica en la etapa de pretratamiento (etapa S11).
- Incluso cuando se utiliza la biomasa celulósica herbácea o leñosa como materia prima, la cumaramida y la ferulamida están contenidas en la solución de azúcar tratada con amoníaco. Sin embargo, cuando se utiliza la biomasa herbácea como materia prima, la cumaramida y la ferulamida están contenidas en mayores cantidades. Por lo tanto, cuando la solución de azúcar tratada con amoníaco se utiliza como materia prima de la fermentación tal como está, sin purificación, la eficiencia de la fermentación cuando se utiliza la biomasa herbácea como materia prima es menor que cuando se utiliza la biomasa leñosa como materia prima. Sin embargo, según la presente invención, incluso cuando se utiliza la biomasa herbácea o leñosa como materia prima, se puede obtener la misma eficiencia de la fermentación por purificación de la solución de azúcar tratada con amoníaco. La razón por la que las cantidades de cumaramida y ferulamida en la solución de azúcar tratada con amoníaco cuando se utiliza la biomasa herbácea como materia prima son mayores que cuando se utiliza la biomasa leñosa como materia prima es que las cantidades de ácido cumárico y ácido ferúlico en la biomasa herbácea son inicialmente mayores que las de la biomasa leñosa.
- Es preferente que el producto tratado con amoníaco sea sacarificado enzimáticamente con una solución que tenga una concentración de materias sólidas del producto tratado con amoníaco en un intervalo del 1% en masa o más y del 10% en masa o menos durante la sacarificación enzimática del producto tratado con amoníaco. La concentración de materias sólidas del producto tratado con amoníaco es del 5% en masa o más y menos del 10% en masa. Cuando la concentración de materias sólidas del producto tratado con amoníaco es del 10% en masa o menos, una reacción de sacarificación no está inhibida durante la sacarificación enzimática del producto tratado con amoníaco mediante la adición de una enzima al producto tratado con amoníaco en la etapa de preparación de la solución de azúcar tratada con amoníaco, como se describe a continuación (etapa S12). Además, se puede suprimir un aumento en la concentración del inhibidor de la fermentación en la solución de azúcar tratada con amoníaco. Cuando la concentración de materias sólidas del producto tratado con amoníaco es del 1% en masa o más, la energía y el tiempo de tratamiento pueden suprimirse durante la concentración hasta una concentración requerida para su utilización como materia prima para la producción de fermentación y el coste puede disminuir. Por lo tanto, esto es económicamente ventajoso.
- Un componente disolvente que contiene las materias sólidas del producto tratado con amoníaco no está limitado siempre que las materias sólidas del producto tratado con amoníaco puedan dispersarse en su interior. Se utiliza agua o similares.
- La enzima utilizada para la sacarificación enzimática del producto tratado con amoníaco no está particularmente limitada, siempre y cuando sea una enzima que tenga una actividad de descomposición de la celulosa (celulasa). Como enzima, preferentemente se utiliza celulasa que contiene celulasa de tipo exo o celulasa de tipo endo que tiene actividad de descomposición de celulosa cristalina. Es preferente que dicha celulasa sea celulasa producida por hongos filamentosos, más preferentemente celulasa producida por especies de *Trichoderma*, entre los hongos filamentosos y, aún más preferentemente, celulasa producida por *Trichoderma reesei* entre las especies de *Trichoderma*.
- La sacarificación enzimática se realiza, preferentemente, a un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 7 y, más preferentemente, de aproximadamente 5. Además, la temperatura de reacción de la sacarificación enzimática es, preferentemente, de 40 a 70°C, y, más preferentemente, de aproximadamente 50°C.
- La solución de azúcar tratada con amoníaco obtenida mediante la sacarificación enzimática puede someterse a una etapa posterior como tal o después de la eliminación de materias sólidas mediante separación de sólido-líquido, tal como un procedimiento de separación centrífuga y un procedimiento de separación por membrana.

<Etapa de preparación de solución de azúcar purificada: Etapa S13>

5 La cumaramida y/o ferulamida contenidas en la solución de azúcar tratada con amoníaco obtenida en la etapa de preparación de la solución de azúcar tratada con amoníaco (etapa S12) se eliminan mediante purificación y se determina la concentración de cumaramida y/o ferulamida para obtener una solución de azúcar purificada que tiene una concentración predeterminada (etapa de preparación de la solución de azúcar purificada: etapa S13).

10 La concentración de cumaramida y/o ferulamida en la solución de azúcar purificada está comprendida dentro de un intervalo de 10 a 1.100 ppm, más preferentemente de 10 a 800 ppm y, más preferentemente, de 10 a 450 ppm. Cuando la concentración de cumaramida y/o ferulamida en la solución de azúcar purificada es de 1.100 ppm o menos, la eficiencia de la fermentación mejora significativamente. Cuando la concentración en la solución de azúcar purificada es de 10 ppm o más, se puede suprimir un aumento en la energía y los costes requeridos para la purificación de la solución de azúcar tratada con amoníaco. En otras palabras, aunque la eficiencia de la fermentación de la solución de azúcar purificada mejora a medida que la concentración de cumaramida y/o ferulamida es menor, cuando la concentración en la solución de azúcar purificada es inferior a 10 ppm, la eficiencia de la fermentación de la solución de azúcar purificada no mejora adicionalmente y la energía y los costes requeridos para la purificación de la solución de azúcar tratada con amoníaco aumentan. Por lo tanto, esto es económicamente desventajoso y no es preferente.

20 El procedimiento para purificar la solución de azúcar tratada con amoníaco no está particularmente limitado, y entre los ejemplos de los mismos se pueden incluir destilación, extracción, cristalización, recristalización, cromatografía en columna y separación de membrana. Estos procedimientos de purificación de la solución de azúcar tratada con amoníaco pueden utilizarse solos o puede utilizarse una pluralidad de los procedimientos en combinación. Entre los procedimientos de purificación de la solución de azúcar tratada con amoníaco, preferentemente se utiliza un tratamiento con membrana y, en particular, se utiliza, preferentemente, una membrana de nanofiltración. La membrana de nanofiltración puede prevenir la penetración de azúcar en la solución de azúcar tratada con amoníaco y permite que la atraviesen la cumaramida y/o la ferulamida. Por lo tanto, la utilización de la membrana de nanofiltración en la purificación de la solución de azúcar tratada con amoníaco permite tanto la concentración de azúcar como la eliminación de ferulamida y cumaramida.

35 La membrana de nanofiltración es una membrana de separación que generalmente se define como "membrana que permite que la atraviesen los iones monovalentes e impide que lo hagan los iones divalentes", y también se conoce como nanofiltro, membrana de nanofiltración o membrana NF. La membrana de nanofiltración es una membrana que puede tener espacios vacíos finos de algunos nanómetros y se utiliza, principalmente, para la prevención de partículas finas, moléculas, iones, sales y similares, en agua.

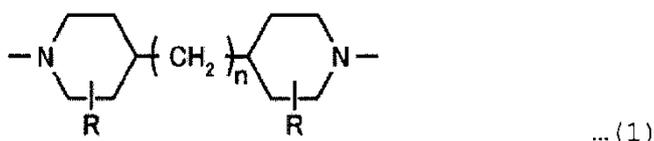
40 Como material para la formación de la membrana de nanofiltración, se puede utilizar un material macromolecular, tal como polímero a base de acetato de celulosa, poliamida, poliéster, poliimida y polímero de vinilo. La membrana de nanofiltración no se limita a una película hecha de un tipo de los materiales anteriores y se puede utilizar una membrana que contiene una pluralidad de materiales de membrana. La estructura de membrana de la membrana de nanofiltración puede ser una membrana asimétrica que tiene una capa compacta sobre, al menos, un lado y microporos cuyo diámetro aumenta gradualmente desde la capa compacta hacia el interior de la membrana o hacia otro lado, o una membrana compuesta que tiene una capa funcional muy delgada hecha de otro material sobre la capa compacta de la membrana asimétrica. Como membrana compuesta, por ejemplo, se puede utilizar una membrana compuesta que constituye un nanofiltro que tiene una capa funcional de poliamida sobre una membrana de soporte hecha de polisulfona como material de membrana. Por ejemplo, una membrana compuesta de este tipo se describe en la solicitud de patente japonesa abierta a inspección pública no. Sho. 62-201606.

50 En particular, es preferente una membrana compuesta que tiene alta resistencia a la presión, alta permeabilidad al agua y alto rendimiento de eliminación de solutos, y potencial excelente, e incluye una capa funcional de poliamida. Con el fin de mantener la durabilidad frente a la presión de funcionamiento, la alta permeabilidad al agua y el rendimiento de prevención, es adecuada una membrana que tiene una estructura en la que una capa funcional es poliamida y está sostenida por una membrana porosa o un soporte hecho de telas no tejidas. Es adecuada que una membrana semipermeable de poliamida sea una membrana semipermeable compuesta que tiene una capa funcional de poliamida reticulada obtenida mediante una reacción de policondensación de una amina multifuncional con un haluro ácido multifuncional como soporte.

60 Entre los ejemplos de componente de ácido carboxílico preferente, que es un monómero que constituye la poliamida en la membrana de nanofiltración que tiene una capa funcional de poliamida, se pueden incluir un ácido carboxílico aromático, tal como ácido trimésico, ácido benzofenona tetracarboxílico, ácido trimelítico, ácido piromelítico, ácido isoftálico, ácido tereftálico, ácido naftalenodicarboxílico, ácido difenilcarboxílico y ácido piridincarboxílico. Teniendo en cuenta a la solubilidad en un disolvente para la formación de una membrana, son más preferentes el ácido trimésico, el ácido isoftálico, el ácido tereftálico y una mezcla de los mismos.

65 Entre los ejemplos de componente de amina preferente, que es un monómero que constituye la poliamida, se

pueden incluir una diamina primaria que tiene un anillo aromático, tal como m-fenilendiamina, p-fenilendiamina, bencidina, metilendianilina, éter de 4,4'-diaminobifenilo, dianisidina, éter de 3,3',4'-triaminobifenilo, éter de 3,3',4,4'-tetraaminobifenilo, 3,3'-dioxibencidina, 1,8-naftalendiamina, m(p)-monometilfenilendiamina, éter de 3,3'-monometilamino-4,4'-diaminobifenilo, 4,N,N'-(4-aminobenzoi)-p(m)-fenilendiamina-2,2'-bis(4-aminofenilbencimidazol), 2,2'-bis(4-aminofenilbenzoxazol) y 2,2'-bis(4-aminofenilbenzotiazol), y una diamina secundaria, tal como piperazina, piperidina, y derivados de los mismos. En particular, preferentemente se utiliza una membrana de nanofiltración que tiene una capa funcional de poliamida reticulada que contiene piperazina o piperidina como monómero, ya que tiene resistencia al calor y resistencia química además de resistencia a la presión y durabilidad. Es más preferente una poliamida que contiene la poliamida de piperazina reticulada o poliamida de piperidina reticulada como componente principal y un componente representado por la siguiente fórmula química (1), y es aún más preferente una poliamida que contiene poliamida de piperazina reticulada como componente principal y el componente representado mediante la siguiente fórmula química (1). Preferentemente, se utiliza el componente representado por la siguiente fórmula química (1), en la que n es 3. Entre los ejemplos de una membrana de nanofiltración que tiene una capa funcional de poliamida que contiene poliamida de piperazina reticulada como componente principal y el componente representado por la siguiente fórmula química (1) se pueden incluir los descritos en la solicitud de patente japonesa abierta a inspección pública no. Sho. 62-201606. Entre los ejemplos específicos de los mismos se pueden incluir una membrana de nanofiltración basada en poliamida de piperazina reticulada, UTC60, disponible a través de la firma TORAY INDUSTRIES, INC., que tiene una capa funcional de poliamida que contiene poliamida de piperazina reticulada como componente principal y el componente representado por la siguiente fórmula química (1), en la que n es 3.



(n es un número entero de 1 o más).

La membrana de nanofiltración se utiliza generalmente como un módulo de membrana en espiral. La membrana de nanofiltración utilizada en esta realización se utiliza, preferentemente, como un módulo de membrana en espiral. Entre los ejemplos específicos de módulos de membrana de nanofiltración preferentes se pueden incluir una membrana de nanofiltración GEsepa, disponible a través de la firma GE Osmonics, Inc., que es una membrana de nanofiltración basada en acetato de celulosa, una membrana de nanofiltración NF99 o NG99HF, disponible a través de la firma Alfa Laval, que tiene una capa funcional de poliamida, una membrana de nanofiltración NF-45, NF-90, NF-200, NF-270 o NF-400, disponible a través de la firma Filmtech Corporation, que tiene una capa funcional de poliamida de piperazina reticulada y un módulo de membrana de nanofiltración SU-210, SU-220, SU-600 o SU-610, disponible a través de la firma TORAY INDUSTRIES, INC., incluyendo UTC60, disponible a través de la firma TORAY INDUSTRIES, INC., que tiene una capa funcional que contiene poliamida de piperazina reticulada como componente principal y una poliamida que contiene un componente representado por la fórmula química (1) anterior. Son preferentes una membrana de nanofiltración NF99 o NF99HF, disponible a través de la firma Alfa Laval, que tiene una capa funcional de poliamida, una membrana de nanofiltración NF-45, NF-90, NF-200 o NF-400, disponible a través de la firma Filmtech Corporation, que tiene una capa funcional de poliamida de piperazina reticulada y un módulo de membrana de nanofiltración SU-210, SU-220, SU-600 o SU-610, disponible a través de la firma TORAY INDUSTRIES, INC., incluyendo UTC60, disponible a través de la firma TORAY INDUSTRIES, INC., que tiene una capa funcional que contiene poliamida de piperazina como componente principal y una poliamida que contiene un componente representado por la fórmula química anterior (1). Es más preferente una membrana de nanofiltración SU-210, SU-220, SU-600 o SU-610, disponible a través de la firma TORAY INDUSTRIES, INC., incluyendo UTC60, disponible a través de la firma TORAY INDUSTRIES, INC., que tiene una capa funcional que contiene poliamida de piperazina reticulada como componente principal y una poliamida que contiene un componente representado por la fórmula química (1) anterior.

El pH de la solución de azúcar tratada con amoníaco para pasar a través de la membrana de nanofiltración no está particularmente limitado y el pH es, preferentemente, de 1 a 5. Cuando el pH es inferior a 1, la membrana se desnatura en la utilización durante un período prolongado y los rendimientos de la membrana, tales como el flujo y la relación de permeabilidad, disminuyen significativamente. Cuando el pH es superior a 5, la relación de eliminación del inhibidor de la fermentación puede disminuir significativamente. Cuando el pH de la solución de azúcar tratada con amoníaco se ajusta dentro del intervalo y la solución de azúcar tratada con amoníaco se somete a filtración a través de la membrana de nanofiltración, se puede mejorar la relación de eliminación del inhibidor de la fermentación. Cuando el pH de la solución de azúcar tratada con amoníaco está comprendido dentro del intervalo, hay un efecto de supresión de las incrustaciones en la membrana de nanofiltración. Por lo tanto, la membrana de nanofiltración se puede utilizar de forma estable durante un periodo prolongado.

El ácido o álcali utilizado en el ajuste del pH de la solución de azúcar tratada con amoníaco no está particularmente limitado. Entre los ejemplos del ácido se pueden incluir ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico. El ácido sulfúrico, el ácido nítrico y el ácido fosfórico son preferentes desde el punto de vista de la dificultad de inhibición durante la fermentación, y el ácido sulfúrico es más preferente desde el punto de vista de la

economía. Es preferente que el álcali sea amoníaco, hidróxido sódico, hidróxido cálcico o una solución acuosa que contiene cualquiera de ellos desde el punto de vista económico, más preferentemente, amoníaco o hidróxido sódico, que es un ion monovalente, desde el punto de vista de las incrustaciones en la membrana, y, más preferentemente, amoníaco desde el punto de vista de la dificultad de inhibición durante la fermentación.

5 Una etapa de ajuste del pH de la solución de azúcar tratada con amoníaco puede realizarse en cualquier momento siempre que se realice la etapa antes de que la solución de azúcar tratada con amoníaco pase a través de la membrana de nanofiltración. Cuando se usa una enzima para la hidrólisis de la biomasa celulósica, el pH se puede
10 ajustar a 5 o menos durante una reacción de hidrólisis. Cuando el pH se reduce a 4 o menos en un procedimiento de reciclado de una enzima contenida en un filtrado, es probable que se produzca la desactivación de la enzima. Por lo tanto, es preferente ajustar el pH después de la eliminación de la enzima contenida en el filtrado.

15 La temperatura de la solución de azúcar tratada con amoníaco que se hace pasar a través de la membrana de nanofiltración no está particularmente limitada. La temperatura se puede ajustar apropiadamente desde el punto de vista de aumentar el rendimiento de la eliminación del inhibidor de la fermentación durante la filtración a través de la membrana de nanofiltración utilizada. Específicamente, cuando se utiliza la membrana de nanofiltración para la
20 filtración, es preferente que la temperatura de la solución de azúcar tratada con amoníaco sea de 40°C a 80°C. Esto se debe a que se mejora el rendimiento de eliminación del inhibidor de la fermentación por la membrana de nanofiltración. Cuando la temperatura de la solución de azúcar tratada con amoníaco durante la filtración a través de la membrana de nanofiltración es de 40°C o superior, el rendimiento de eliminación del inhibidor de fermentación en la solución de azúcar tratada con amoníaco aumenta. Cuando la temperatura de la solución de azúcar tratada con amoníaco es superior a 80°C, la membrana de nanofiltración se desnaturaliza. Por lo tanto, se pueden perder las propiedades de la membrana. De acuerdo con lo anterior, cuando la temperatura de la solución de azúcar tratada con amoníaco está comprendida dentro del intervalo mencionado anteriormente, puede mejorarse el rendimiento de
25 eliminación del inhibidor de la fermentación a través de la membrana de nanofiltración.

Específicamente, se puede realizar un procedimiento que utiliza nanofiltración de acuerdo con un procedimiento descrito en la publicación internacional no. 2010/067785.

30 Cuando la solución de azúcar tratada con amoníaco se somete a filtración a través de la membrana de nanofiltración, el inhibidor de la fermentación puede eliminarse más eficazmente mediante la adición de agua a la solución de azúcar tratada con amoníaco. Mediante la cantidad de agua a añadir, se puede ajustar el contenido del inhibidor de la fermentación contenido en la solución de azúcar purificada después de la nanofiltración. Específicamente, a medida que aumenta la cantidad de agua a añadir, el contenido del inhibidor de la fermentación
35 contenido en la solución de azúcar purificada después de la nanofiltración disminuye.

Por tanto, la cumaramida y/o la ferulamida en la solución de azúcar tratada con amoníaco se eliminan mediante purificación y se determina la concentración de cumaramida y/o ferulamida para obtener una solución de azúcar purificada que tenga una concentración predeterminada.

40 Como se ha descrito anteriormente, según el procedimiento para producir una solución de azúcar, la cumaramida y/o la ferulamida en la solución de azúcar tratada con amoníaco que se obtiene mediante sacarificación enzimática del producto tratado con amoníaco obtenido mediante tratamiento de la biomasa celulósica con el agente de tratamiento que contiene amoníaco se eliminan mediante purificación y se determina la concentración de
45 cumaramida y/o ferulamida. De este modo, se puede obtener una solución de azúcar purificada que tiene una concentración predeterminada. Cuando la cumaramida y/o la ferulamida específicas contenidas en la solución de azúcar tratada con amoníaco como inhibidores de la fermentación se reducen con antelación antes de la fermentación de la solución de azúcar, se puede mejorar la eficiencia de la fermentación.

50 Mediante la fermentación de la solución de azúcar purificada resultante utilizada como materia prima de la fermentación, se puede producir etanol. El procedimiento para producir etanol a partir de la solución de azúcar purificada obtenida mediante el procedimiento para producir una solución de azúcar no está particularmente limitado. Entre los ejemplos del procedimiento para producir etanol se pueden incluir un procedimiento de fermentación en dos etapas descrito en la solicitud de patente japonesa abierta a inspección pública No. 2009-296983. En el
55 procedimiento de fermentación en dos etapas, una hexosa, tal como glucosa y manosa, se convierte en etanol mediante levaduras o bacterias en una etapa de fermentación primaria, y una pentosa, tal como xilosa, se convierte en etanol en una etapa de fermentación secundaria. Como hongos utilizados en la etapa de fermentación primaria, se pueden utilizar gérmenes conocidos. Entre los hongos, es preferente una levadura, tal como *Saccharomyces cerevisiae*. Esto se debe a que la levadura tiene una alta resistencia al etanol y permite producir etanol que tiene una concentración del 5% o más. Como hongos utilizados en la etapa de fermentación secundaria, se puede utilizar una levadura de asimilación de pentosas, tal como *Pichia stipitis* y, en particular, es preferente una cepa provista de un rendimiento resistente a la inhibición de la fermentación.

65 En la solución de azúcar purificada obtenida mediante el procedimiento para producir una solución de azúcar, se eliminan la cumaramida y/o la ferulamida específicas contenidas como inhibidores de la fermentación en la solución de azúcar tratada con amoníaco que se obtiene tratando la biomasa celulósica con el agente de tratamiento que

contiene amoníaco. Por lo tanto, cuando la solución de azúcar purificada se utiliza como materia prima de la fermentación, la fermentación no se inhibe. Por consiguiente, la utilización de la solución de azúcar purificada obtenida mediante el procedimiento para producir una solución de azúcar como materia prima de la fermentación puede mejorar la eficiencia de la producción de etanol.

5

Ejemplos

En adelante, en el presente documento, el contenido de la presente invención se describe con detalle haciendo referencia a los ejemplos y ejemplos comparativos.

10

<Ejemplo 1: Preparación y análisis de una solución de azúcar purificada>

[A. Preparación de la solución de azúcar tratada con amoníaco]

15

(1. Tratamiento de trituración de la biomasa celulósica)

Se utilizó *Erianthus* como biomasa celulósica. El *Erianthus* se trituró con un molino de corte y el tamaño de partícula se controló con un tamiz con una abertura de 4 mm. El diámetro promedio de partícula (d₅₀), medido mediante un procedimiento de difracción láser, fue de aproximadamente 975 μm. El *Erianthus* triturado se secó a una temperatura de 40°C a una presión reducida de 5 kPa durante todo el día y la noche. El contenido de humedad del *Erianthus* seco era aproximadamente el 0,5% en masa con respecto a la masa del *Erianthus* seco.

20

(2. Tratamiento de la biomasa celulósica con amoníaco)

25

La celulosa triturada y seca, en forma de virutas de celulosa, se trató con amoníaco. Se cargó una autoclave de acero inoxidable equipada con un agitador con una capacidad de aproximadamente 5 l con 200 g de las virutas de celulosa. Posteriormente, se repitieron la introducción de gas nitrógeno presurizado en la autoclave y la despresurización para eliminar el aire de la autoclave y reemplazar el aire por gas nitrógeno. Después, la autoclave se calentó a 120°C. Después del calentamiento, la autoclave se despresurizó y el gas nitrógeno se evacuó a presión reducida. Por otra parte, se introdujo amoníaco presurizado en otro recipiente a presión y se calentó a una temperatura ligeramente superior a 120°C. A continuación, se abrió una válvula de una tubería que conectaba la autoclave y el recipiente a presión para introducir amoníaco en la autoclave, de modo que la presión a una temperatura de 120°C fuese de 1,2 MPa. Las virutas de celulosa se trataron con amoníaco en las condiciones de temperatura y presión durante 2,5 horas con agitación. Posteriormente, se despresurizó la autoclave y se evacuó el amoníaco. Adicionalmente, se hizo pasar gas nitrógeno a través de la autoclave para eliminar el amoníaco residual en las partículas de viruta de celulosa. De este modo, se obtuvo biomasa pretratada. Esta biomasa se utilizó como celulosa tratada con amoníaco (producto tratado con amoníaco).

30

35

(3. Hidrólisis de celulosa tratada con amoníaco)

40

Se añadieron 7,6 kg de agua a 0,4 kg de celulosa tratada con amoníaco, de manera que la concentración de la celulosa tratada con amoníaco fue del 5%. A la resultante se añadió una pequeña cantidad de ácido sulfúrico concentrado o hidróxido sódico acuoso para ajustar el pH a 5. Posteriormente, se añadió una preparación de celulosa derivada de *Trichoderma reesei* (Accellerase DUET, disponible a través de la firma Genencor, Inc.) en una cantidad de 1/100 de la cantidad de celulosa seca tratada con amoníaco en términos de la cantidad de proteína enzimática. Se llevó a cabo una reacción de sacarificación a 50°C durante 24 horas. La sustancia obtenida mediante la reacción de sacarificación se utilizó como un hidrolizado.

45

(4. Separación sólido-líquido del hidrolizado)

50

El hidrolizado resultante se centrifugó y se separó en un componente de la solución, así como una celulosa y una lignina no descompuestas. El componente de la solución se sometió a filtración a través de una membrana de microfiltración que tenía un diámetro de microporos de 0,45 μm (Stericup, disponible a través de la firma Millipore Corporation) para eliminar las partículas insolubles en escala micrométrica. El componente de la solución obtenido mediante el procedimiento descrito anteriormente se utilizó como una solución de azúcar tratada con amoníaco.

55

[B. Preparación de solución de azúcar purificada]

(5. Condensación del azúcar a través de una membrana de nanofiltración)

60

La solución de azúcar tratada con amoníaco resultante se sometió a filtración a través de una membrana de nanofiltración (UTC-60, disponible a través de la firma TORAY INDUSTRIES, INC.) a temperatura normal y a una presión de funcionamiento de 4 MPa. La solución concentrada obtenida mediante filtración se utilizó como una solución de azúcar purificada. Como dispositivo de separación por membrana, se utilizó una unidad de membrana plana (SEPA CF-II, disponible a través de la firma GE Osmonics, área eficaz de membrana: 140 cm²).

65

[C. Análisis de la solución de azúcar tratada con amoníaco]

Se analizaron los sacáridos, el ácido orgánico y un compuesto aromático en la solución de azúcar tratada con amoníaco obtenida en "4. Separación sólido-líquido del hidrolizado". A continuación se muestra cada condición de análisis de los sacáridos, el ácido orgánico y el compuesto aromático en la solución de azúcar tratada con amoníaco.

(Condiciones del análisis de HPLC)

1. Condiciones de análisis de los sacáridos

Las concentraciones de glucosa y xilosa en la solución de azúcar tratada con amoníaco se determinaron en las condiciones de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) mostradas a continuación por comparación con una muestra estándar.

Aparato: Sistema ACQUITY UPLC (fabricado por Waters)
 Columna: Columna ACQUITY UPLC BEH Amida 1,7 μm 2,1 x 100 mm (fabricada por Waters)
 Fase móvil: Líquido A; 80% de acetonitrilo + 0,2% de TEA, líquido B; 30% de acetonitrilo + 0,2% de TEA
 Caudal: 0,3 ml/min
 Temperatura: 55°C

2. Condiciones de análisis del ácido orgánico

La concentración de ácido acético en la solución de azúcar tratada con amoníaco se determinó en las condiciones de HPLC mostradas a continuación por comparación con la muestra estándar.

Aparato: Hitachi High-Performance Liquid Chromatograph Lachrom elite (fabricado por Hitachi)
 Columna: GL-C610H-S (fabricada por Hitachi)
 Fase móvil: Ácido perclórico 3 mM
 Líquido de reacción: solución de azul de bromotimol
 Procedimiento de detección: Detector de UV-VIS
 Caudal fase móvil: 0,5 ml/min, líquido de reacción: 0,6 ml/min
 Temperatura: 60 °C

3. Condiciones de análisis del compuesto aromático

Las concentraciones de ácido cumárico, cumaramida y ferulamida en la solución de azúcar tratada con amoníaco se determinaron en las condiciones de HPLC mostradas a continuación por comparación con la muestra estándar. En este momento, se obtuvo el espectro de absorción UV (longitud de onda de medición: 200 nm a 400 nm) de cada pico de detección.

Aparato: Hitachi High-Performance Liquid Chromatograph Lachrom elite (fabricado por Hitachi)
 Columna: Synergi 2,5 μm Hydro-RP 100A (fabricado por Phenomenex)
 Procedimiento de detección: Detector de matriz de diodos
 Caudal: 0,6 ml/min
 Temperatura: 40°C

Los sacáridos en la solución de azúcar tratada con amoníaco resultante se analizaron en las condiciones de HPLC descritas en "1. Condiciones de análisis de los sacáridos." Como se confirma a partir del resultado, la glucosa y la xilosa están contenidas como componentes sacáridos principales. El ácido orgánico en la solución de azúcar tratada con amoníaco resultante se analizó en las condiciones de HPLC descritas en "2. Condiciones de análisis del ácido orgánico." Como se ve por el resultado, el ácido acético estaba contenido como componente ácido orgánico principal. El compuesto aromático en la solución de azúcar tratada con amoníaco resultante se analizó en las condiciones de HPLC descritas en "3. Condiciones de análisis del compuesto aromático." El resultado se muestra en la figura 2. Como se ve en la figura 2, se detectaron tres picos principales (véanse los picos 1, 2 y 3) de la solución de azúcar tratada con amoníaco.

Entre estos, se encontró que el pico 3 era un pico de ácido cumárico, puesto que los tiempos de elución de HPLC del pico 3 y de la muestra estándar de ácido cumárico coincidían entre sí. Los tiempos de elución de los dos compuestos restantes (picos 1 y 2) no coincidían con los de ninguna de las muestras estándar de HMF, furfural, vainillina, acetovanillona, ácido ferúlico, coniferil aldehído y guayacol, que se conocen como compuestos aromáticos contenidos en una solución de azúcar derivada de la biomasa celulósica. Los dos picos (picos 1 y 2) se aislaron mediante HPLC y los pesos moleculares de los mismos se analizaron mediante LC/MS (LCMS-IT-TOF y LC20A, fabricado por Shimadzu Corp.).

Como se muestra a partir de los resultados, los pesos moleculares de los picos 1 y 2 fueron 163,063 y 193,074, respectivamente. Se supone que el ácido cumárico y el ácido ferúlico se someten a una reacción de condensación

con moléculas de amoníaco, para producir cumaramida y ferulamida, respectivamente. Los pesos moleculares calculados a partir de las fórmulas estructurales de cumaramida y ferulamida fueron 163,172 y 193,198, respectivamente, y se corresponden con los pesos moleculares obtenidos por LC/MS, respectivamente. Por lo tanto, se estima que los dos picos restantes (picos 1 y 2) en la solución de azúcar de celulosa tratada con amoníaco son cumaramida y ferulamida.

Se prepararon muestras estándar de cumaramida y ferulamida mediante síntesis a medida (contratista: VSN, Inc., laboratorio de síntesis), y se midieron los tiempos de elución de HPLC de las muestras estándar sintetizadas. Como resultado, los tiempos de elución (3,74 min) del pico 1 en la solución de azúcar tratada con amoníaco y la muestra estándar de cumaramida en una solución mixta de las muestras patrón coincidieron completamente entre sí y los tiempos de elución (5,25 min) del pico 2 en la solución de azúcar tratada con amoníaco y la muestra estándar de ferulamida en una solución mixta de las muestras patrón coincidieron completamente entre sí (véase la figura 2).

Las figuras 3 a 6 muestran todos los espectros de absorción UV de los picos 1 y 2 en la solución de azúcar tratada con amoníaco, la muestra estándar de cumaramida y la muestra estándar de ferulamida, que se obtuvieron en la HPLC. En este caso, la longitud de onda de medición es de 200 nm a 400 nm. Como se muestra en las figuras 3 y 5, los espectros de absorción UV del pico 1 en la solución de azúcar tratada con amoníaco y la muestra estándar de cumaramida coincidieron entre sí. Como se muestra en las figuras 4 y 6, los espectros de absorción UV del pico 2 en la solución de azúcar tratada con amoníaco y la muestra estándar de ferulamida coincidieron entre sí.

Como puede verse a partir de los resultados del análisis, los picos 1 y 2 en la solución de azúcar tratada con amoníaco, que es un hidrolizado de celulosa tratada con amoníaco, son la cumaramida y la ferulamida, respectivamente, y la solución de azúcar tratada con amoníaco contenía una gran cantidad de los compuestos.

[D. Análisis de la solución de azúcar purificada]

La tabla 1 muestra la concentración de cada componente en la solución de materia prima (solución de azúcar tratada con amoníaco) antes de la filtración, la solución de azúcar concentrada (solución de azúcar purificada) después de la filtración y una solución de permeación. El análisis de los componentes se realizó de acuerdo con las condiciones de análisis de HPLC descritas en "C. Análisis de la solución de azúcar tratada con amoníaco".

(Tabla 1)

	Glucosa (g/l)	Xilosa (g/l)	Ácido acético (g/l)	Ácido cumárico (g/l)	Cumaramida (g/l)	Ferulamida (g/l)
Solución de la materia prima	17,0	11,0	0,157	0,037	0,491	0,189
Solución de azúcar concentrado	99,6	53,9	0,151	0,079	0,622	0,454
Solución de permeación	1,16	1,4	0,169	0,030	0,317	0,064

Como se desprende de la tabla 1, cuando la solución de azúcar tratada con amoníaco se sometió a filtración a través de la membrana de nanofiltración, los componentes sacáridos, es decir, glucosa y xilosa, en la solución de azúcar concentrada se concentraron 5,9 veces y 4,9 veces, respectivamente. Por otra parte, los componentes no sacáridos (ácido acético, ácido cumárico, cumaramida y ferulamida) se concentraron de aproximadamente 1 a aproximadamente 2,4 veces. Cuando la solución de azúcar tratada con amoníaco se sometió a filtración a través de la membrana de nanofiltración, la mayor parte de los componentes de sacárido en la solución de la materia prima y la mayoría de los componentes no sacáridos podían separarse eficazmente en un lado de no permeación y un lado de permeación, respectivamente.

<Ejemplo comparativo 1: Consideración del caso en el que el sacárido se concentra a partir de solución de azúcar tratada con amoníaco usando una membrana de ósmosis inversa>

La filtración se realizó de la misma manera que en "5. Condensación de sacárido a través de una membrana de nanofiltración" en el ejemplo 1, excepto porque se utilizó una membrana de ósmosis inversa (UTC-80, disponible a través de la firma TORAY INDUSTRIES, INC.) como membrana de separación y la presión de funcionamiento fue de 5 MPa. La tabla 2 muestra la concentración de cada componente en la solución de materia prima (solución de azúcar tratada con amoníaco) antes de la filtración, la solución de azúcar concentrada (solución de azúcar purificada) después de la filtración y una solución de permeación. Obsérvese que los componentes se analizaron mediante HPLC de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

(Tabla 2)

	Glucosa (g/l)	Xilosa (g/l)	Ácido acético (g/l)	Ácido cumárico (g/l)	Cumaramida (g/l)	Ferulamida (g/l)
Solución de la materia prima	17,0	11,0	0,157	0,037	0,491	0,189
Solución de azúcar concentrado	102,9	59,5	0,743	0,160	2,050	2,053
Solución de permeación	0,2	0,1	0	0	0	0

Como se desprende claramente de la tabla 2, los componentes monosacáridos, incluidas la glucosa y la xilosa, y otros componentes estaban apenas contenidos en la solución de permeación. Se confirma que, cuando la membrana de ósmosis inversa se utiliza como membrana de separación, los componentes sacáridos y la cumaramida y la ferulamida en la solución de azúcar tratada con amoníaco no pueden separarse.

<Ejemplo 2: Prueba de crecimiento utilizando una solución modelo que contiene cumaramida, ácido cumárico y ferulamida>

En el cultivo principal de "A. Prueba de crecimiento de *Pichia stipitis* usando una solución modelo de azúcar", que se describe a continuación, se añadió cualquiera de entre cumaramida, ácido cumárico y ferulamida a una concentración de 2 ppm a 200 ppm como aditivo en un medio, y el medio se sometió a una prueba de crecimiento. Como control positivo, un medio YPDX sin aditivos se sometió a la misma prueba.

(A. Prueba de crecimiento de *Pichia stipitis* usando una solución modelo de azúcar)

Se cultivó estáticamente una cepa NBRC1687 de *Pichia stipitis* a 25°C en un medio de agar YPDX, producido mediante la adición de agar al 2% a un medio YPDX mostrado en la tabla 3 a continuación (precultivo). Una de las colonias formadas en el medio de agar se inoculó en 10 ml del medio YPDX con un bucle de platino y se cultivó a 25°C y 120 spm en un tubo de ensayo con un volumen de 20 ml durante 48 horas con agitación (precultivo). Se añadió 1 ml de medio después del precultivo a 9 ml de medio YPDX y se continuó el cultivo a 25°C y 60 spm en un tubo de ensayo con un volumen de 20 ml (cultivo principal). 0, 24 y 48 horas después del inicio del cultivo, se realizó el muestreo, se midió la concentración de monosacárido y la absorbancia (DO660). De este modo, se observó el crecimiento de cuerpos de hongos.

(Tabla 3)

Composición	Concentración de la composición (g/l)
Glucosa	10
Xilosa	10
Polipeptona	20
Extracto de levaduras	10

La tabla 4 muestra los resultados del análisis de las concentraciones de glucosa y xilosa en el medio durante la obtención de muestras en este ejemplo.

(Tabla 4)

Glucosa	CP	Cumaramida (ppm)			Ácido cumárico (ppm)			Ferulamida (ppm)		
	0	2	20	200	2	20	200	2	20	200
0 h	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
24 h	2,4	2,3	4,82	5,9	2,6	2,6	3,6	2,3	6,6	6,7
48 h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Xilosa	CP	Cumaramida (ppm)			Ácido cumárico (ppm)			Ferulamida (ppm)		
	0	2	20	200	2	20	200	2	20	200
0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
24 h	2,4	2,3	9,7	9,5	2,6	8,7	9,2	2,3	9,3	9,7
48 h	0	0	0	0,4	0	0	0	0	0	5,2

Como se desprende claramente de la tabla 4, cuando las concentraciones de los aditivos fueron de 20 ppm o más,

el consumo de xilosa se retrasó en todos los aditivos en comparación con el control positivo, y se produjo una inhibición del crecimiento. Por otra parte, cuando las concentraciones de los aditivos eran de 2 ppm, no se observó inhibición del crecimiento en absoluto en todos los aditivos. La cumaramida y la ferulamida fueron superiores al ácido cumárico en la inhibición del crecimiento, esta tendencia se observó que era particularmente importante en la tasa de consumo de glucosa. Específicamente, se descubrió que la cumaramida y la ferulamida eran inhibidores de la fermentación en el cultivo de *Pichia stipitis*.

<Ejemplo 3: Prueba de crecimiento de la solución de azúcar concentrada a través de la membrana de nanofiltración>

Una solución de azúcar concentrada de la solución de azúcar tratada con amoníaco a través de la membrana de nanofiltración (en lo sucesivo denominada solución concentrada por NF 1) se ajustó mediante el procedimiento descrito en "5. Condensación de sacárido a través de una membrana de nanofiltración) en el ejemplo 1. En la solución concentrada por NF 1, se mezcló agua en una cantidad igual a la cantidad de la solución concentrada por NF 1 y se realizó la filtración a través de una membrana de nanofiltración de nuevo en las condiciones descritas en "5. Condensación de sacárido a través de una membrana de nanofiltración" en el ejemplo 1, para obtener una solución concentrada por NF 2. A la solución concentrada por NF 2 se añadió agua en una cantidad igual a la cantidad de la solución concentrada por NF 2 y se realizó la filtración a través de la membrana de nanofiltración de nuevo en las condiciones descritas en "5. Condensación de sacárido a través de una membrana de nanofiltración" del ejemplo 1, para obtener una solución concentrada por NF 3. En la tabla 5 se muestra la concentración de cada componente de las soluciones concentradas de NF 1 a 3 y la solución de azúcar concentrada obtenida a través de una membrana de ósmosis inversa (en lo sucesivo, solución concentrada por OI) mediante el procedimiento descrito en el ejemplo comparativo 1.

Se realizó una prueba de crecimiento utilizando cada solución de azúcar mediante un procedimiento descrito en "B. Prueba de crecimiento de *Pichia stipitis* utilizando una solución concentrada de solución de azúcar tratada con amoníaco", descrita más adelante. Los resultados de la prueba se muestran en la tabla 5. En los resultados de la prueba de crecimiento, los casos en los que la absorbancia (DO660) 48 horas después del inicio del cultivo es del 50% al 100%, del 10% al 50% y menos del 10% con respecto al control positivo están representados por ++, +, y -, respectivamente. La absorbancia (DO660) del control positivo después de 48 horas fue de aproximadamente 15.

(B. Prueba de crecimiento de *Pichia stipitis* usando una solución concentrada de azúcar tratada con amoníaco)

En una prueba de crecimiento utilizando la solución concentrada de la solución de azúcar tratada con amoníaco, se realizó el cultivo de la misma manera que en "A. Prueba de crecimiento de *Pichia stipitis* usando una solución modelo de azúcar", a excepción de que se utilizó un medio en el que se añadieron polipeptona y un extracto de levadura a la solución concentrada de la solución de azúcar tratada con amoníaco para que las concentraciones de la misma fueran iguales a las del medio YPDX descrito en la tabla 3 como medio para un cultivo principal. El control positivo se cultivó de la misma manera que en "A. Prueba de crecimiento de *Pichia stipitis* utilizando una solución concentrada de azúcar."

(Tabla 5)

	Glucosa (g/l)	Xilosa (g/l)	Acido cumárico (g/l)	Cumaramida (g/l)	Ferulamida (g/l)	(a) + (b) (ppm)	Crecimiento de microorganismo
Solución concentrada por NF 1	99,6	53,9	0,079	0,622	0,454	1076	+
Solución concentrada por NF 2	98,3	51,5	0,053	0,436	0,345	781	+
Solución concentrada por NF 3	97,7	50,2	0,032	0,213	0,217	430	++
Solución concentrada por OI (ejemplo comparativo)	102,9	59,5	0,160	2,050	0,809	2859	-

Como se desprende claramente de la tabla 5, cada vez que se repitió la adición de agua a la solución concentrada por NF y la nanofiltración, las concentraciones de ácido cumárico, cumaramida y ferulamida disminuyeron. Por otro lado, cuando se realizó la filtración a través de la membrana de ósmosis inversa, estas sustancias se concentraron marcadamente. A partir de los resultados de la prueba de crecimiento, cuando la concentración total de cumaramida y ferulamida en la solución de azúcar es de 1.100 ppm o menos, el crecimiento es posible. A partir de los resultados, se confirmó que la eliminación de cumaramida y ferulamida requería un tratamiento con una membrana de nanofiltración, pero no con membrana de ósmosis inversa. Como puede verse a partir de los resultados y del ejemplo 2, cuando se realizó la purificación en la nanofiltración, de manera que la concentración total de cumaramida y ferulamida era de 1.100 ppm o menos, era posible un crecimiento eficaz de un microorganismo.

<Ejemplo: 4 Prueba de producción de etanol utilizando una solución de azúcar tratada con amoníaco>

Se produjo etanol utilizando la solución de azúcar concentrada (solución concentrada por NF) obtenida de la solución de azúcar tratada con amoníaco a través de la membrana de nanofiltración y la solución de azúcar concentrada (solución concentrada por OI) obtenida usando la membrana de ósmosis inversa mediante el procedimiento descrito en el ejemplo comparativo 1 de acuerdo con "C. Prueba de producción de etanol de *Pichia stipitis* usando una solución de azúcar tratada con amoníaco", descrita a continuación. Las propiedades de fermentación de los mismos se compararon entre sí.

<C. Prueba de producción de etanol de *Pichia stipitis* utilizando una solución de azúcar tratada con amoníaco>

La prueba de producción de etanol a partir de la solución de azúcar tratada con amoníaco se realizó de acuerdo con un procedimiento de fermentación en dos etapas descrito en la solicitud de patente japonesa abierta a inspección pública no. 2009-296983. Se cultivó *Saccharomyces cerevisiae* utilizando una solución concentrada de la solución de azúcar tratada con amoníaco para convertir glucosa en etanol como fermentación primaria. En este caso, se confirmó que, incluso cuando se utilizó cualquiera de entre la solución concentrada por NF y la solución concentrada por OI, no se inhibió la fermentación.

Posteriormente, se cultivó *Pichia stipitis* utilizando una solución de fermentación primaria cuya concentración de etanol se ajustó a 10 g/l con un evaporador rotatorio para convertir la xilosa de la solución de fermentación primaria en etanol como fermentación secundaria. En la fermentación secundaria, la relación entre el tiempo de fermentación y la concentración de etanol de la solución de fermentación primaria derivada de la solución concentrada por NF y la solución de fermentación primaria derivada de la solución concentrada por OI se muestra en la figura 7, y la relación entre el tiempo de fermentación y la concentración de xilosa de la solución de fermentación primaria derivada de la solución concentrada por NF y la solución de fermentación primaria derivada de la solución concentrada por OI se muestra en la figura 8. Como se muestra en las figuras 7 and 8, la producción de etanol por la solución de fermentación primaria derivada de la solución concentrada por OI fue inhibida en gran medida en la fermentación secundaria por *Pichia stipitis*. La tasa de consumo de xilosa, la tasa de producción de etanol y la concentración final de producción de etanol disminuyeron en comparación con la producción de etanol por la solución de fermentación primaria derivada de la solución concentrada por NF. Por lo tanto, era evidente que un inhibidor de la fermentación alcohólica se había concentrado significativamente mediante la concentración a través de la membrana de ósmosis inversa en comparación con la concentración a través de la membrana de nanofiltración.

<Ejemplo 5: Verificación de la inhibición de la producción de etanol mediante la solución de permeación después de la filtración con membrana>

Se produjo etanol utilizando un filtrado (solución de permeación) obtenido durante la producción de la solución concentrada por NF y la solución concentrada por OI. Las soluciones de permeación derivadas de la solución concentrada por NF y la solución concentrada por OI se denominan solución de permeación por NF y solución de permeación por OI, respectivamente. Cada solución de permeación se concentró 3 veces con un evaporador rotatorio. A la solución de permeación concentrada se añadieron un extracto de levadura, polipeptona y xilosa, de manera que las concentraciones finales fueron del 0,5%, 1,0% y 7,0%, respectivamente. Al medio líquido preparado se añadió *Pichia stipitis* para producir etanol. Como control, se utilizó un medio líquido en el que un extracto de levadura, polipeptona y xilosa se añadieron al agua, de manera que la composición era la misma que se ha descrito anteriormente, y se llevó a cabo la misma verificación.

La figura 9 muestra la relación entre el tiempo de fermentación y la concentración de etanol de la solución concentrada por NF y la solución concentrada por OI. La figura 10 muestra la relación entre el tiempo de fermentación y la concentración de xilosa de la solución concentrada por NF y la solución concentrada por OI. Como se muestra en las figuras 9 y 10, el consumo de xilosa y la producción de etanol, que eran los mismos que los del control, se realizaron en un medio que contenía la solución de permeación por OI. En un medio que contenía la solución de permeación por NF, la tasa de consumo de xilosa disminuyó hasta aproximadamente el 75% de la del control, y la tasa de producción de etanol disminuyó hasta aproximadamente el 60%. Como es evidente a partir de los resultados, un inhibidor de la producción de etanol penetró en la membrana de nanofiltración en un tratamiento de concentración de la solución de azúcar tratada con amoníaco a través de la membrana de nanofiltración y se acumuló en el filtrado. Por lo tanto, el inhibidor de la producción de etanol puede eliminarse mediante el tratamiento de concentración a través de la membrana de nanofiltración.

<Ejemplo 6: Concentración de celulosa tratada con amoníaco durante la sacarificación>

A 0,4 kg de celulosa tratada con amoníaco descrita en "2. Tratamiento de la biomasa celulósica con amoníaco", del ejemplo 1, se añadió agua según la cantidad a añadir durante la preparación descrita en la tabla 6 para ajustar la concentración de celulosa tratada con amoníaco al 5, 10, 15 y 20%. A la resultante se añadió una pequeña cantidad de ácido sulfúrico concentrado para ajustar el pH a 5 y, después, se añadió una preparación de celulasa (Accelerase DUET, disponible a través de la firma Genencor) en una cantidad de 1/100 de la cantidad de celulosa seca tratada con amoníaco en términos de la cantidad de proteína enzimática. Se llevó a cabo una reacción de

sacarificación enzimática a 50°C durante 24 horas. El hidrolizado resultante se centrifugó y se separó en un componente de la solución, así como una celulosa y una lignina no descompuestas. El componente de la solución se sometió a filtración a través de una membrana de microfiltración que tenía un diámetro de microporos de 0,45 µm (Stericup, disponible a través de la firma Millipore Corporation) para eliminar las partículas insolubles en escala micrométrica. El componente de la solución obtenido mediante el procedimiento se sometió a un tratamiento de membrana de nanofiltración de acuerdo con "5. Condensación de sacárido a través de una membrana de nanofiltración" del ejemplo 1, para obtener una solución concentrada por NF. La relación de concentración se ajustó de manera que la concentración de glucosa en la solución concentrada era de aproximadamente el 10%. La concentración de cada componente de la solución concentrada se muestra en la tabla 7.

(Tabla 6)

Concentración de celulosa tratada con amoníaco (% en masa) durante la sacarificación enzimática	Cantidad de agua añadida durante la preparación (kg)
5	7,6
10	3,6
15	2,6
20	1,6

(Tabla 7)

Concentración de celulosa tratada con amoníaco (% en masa) durante la sacarificación enzimática	Concentración en la solución concentrada por NF (g/l)				
	Glucosa	Xilosa	Cumaramida (a)	Ferulamida (b)	(a) + (b) (ppm)
5	99,6	53,9	0,62	0,45	1.070
10	101,2	53,4	0,61	0,47	1.080
15	100,4	52,2	0,72	0,53	1.250
20	102,3	52,8	0,80	0,59	1.390

Como se desprende claramente de la tabla 7, cuando la concentración de celulosa tratada con amoníaco durante la sacarificación enzimática fue del 5% y del 10%, la concentración total de cumaramida y ferulamida en la solución concentrada por NF fue de 1.100 ppm o menos. Cuando la concentración de celulosa tratada con amoníaco durante la sacarificación enzimática fue del 15% y del 20%, las concentraciones totales de cumaramida y ferulamida aumentaron marcadamente y fueron de 1.250 ppm y 1.390 ppm, respectivamente. Como puede verse a partir de los resultados y en el ejemplo 5, cuando la concentración total de cumaramida y ferulamida en la solución de azúcar es de 1.100 ppm o menos, un microorganismo es viable y el microorganismo puede producir etanol de forma eficiente. Por lo tanto, es preferente que la concentración de celulosa tratada con amoníaco durante la sacarificación enzimática sea del 10% o menos.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir una solución de azúcar, que comprende:

5 una etapa de pretratamiento, que consiste en tratar la biomasa celulósica con un agente de tratamiento que contiene amoníaco para obtener un producto tratado con amoníaco;
una etapa de preparación de una solución de azúcar tratada con amoníaco, que consiste en sacarificar
enzimáticamente el producto tratado con amoníaco para obtener una solución de azúcar tratada con amoníaco; y
10 una etapa de preparación de una solución de azúcar purificada para eliminar la cumaramida y/o la ferulamida en la
solución de azúcar tratada con amoníaco mediante purificación y determinar la concentración de cumaramida y/o
ferulamida para obtener una solución de azúcar purificada que tiene una concentración de cumaramida y/o
ferulamida de 10 a 1.100 ppm.

15 2. Procedimiento para producir una solución de azúcar, según la reivindicación 1, en el que la biomasa celulósica
contiene biomasa herbácea.

20 3. Procedimiento para producir una solución de azúcar, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que se
usa una membrana de nanofiltración en un tratamiento de purificación de la solución de azúcar tratada con
amoníaco.

25 4. Procedimiento para producir una solución de azúcar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el
producto tratado con amoníaco se sacarifica enzimáticamente con una solución que tiene una concentración de una
materia sólida del producto tratado con amoníaco en un intervalo del 1 al 10% en masa durante la sacarificación
enzimática del producto tratado con amoníaco.

5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además la utilización de la
solución de azúcar obtenida como materia prima de la fermentación para producir etanol.

FIG.1

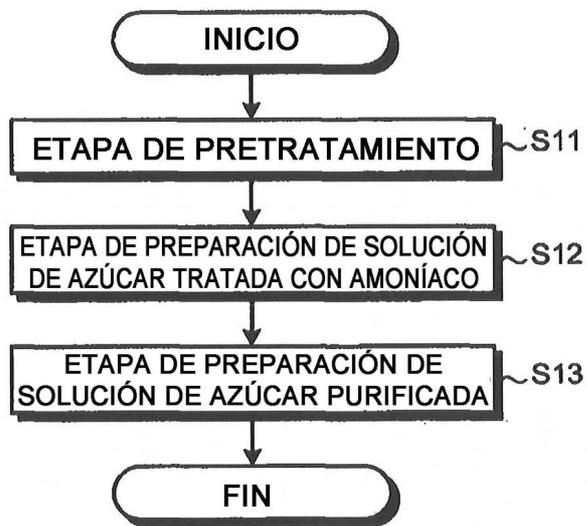


FIG.2

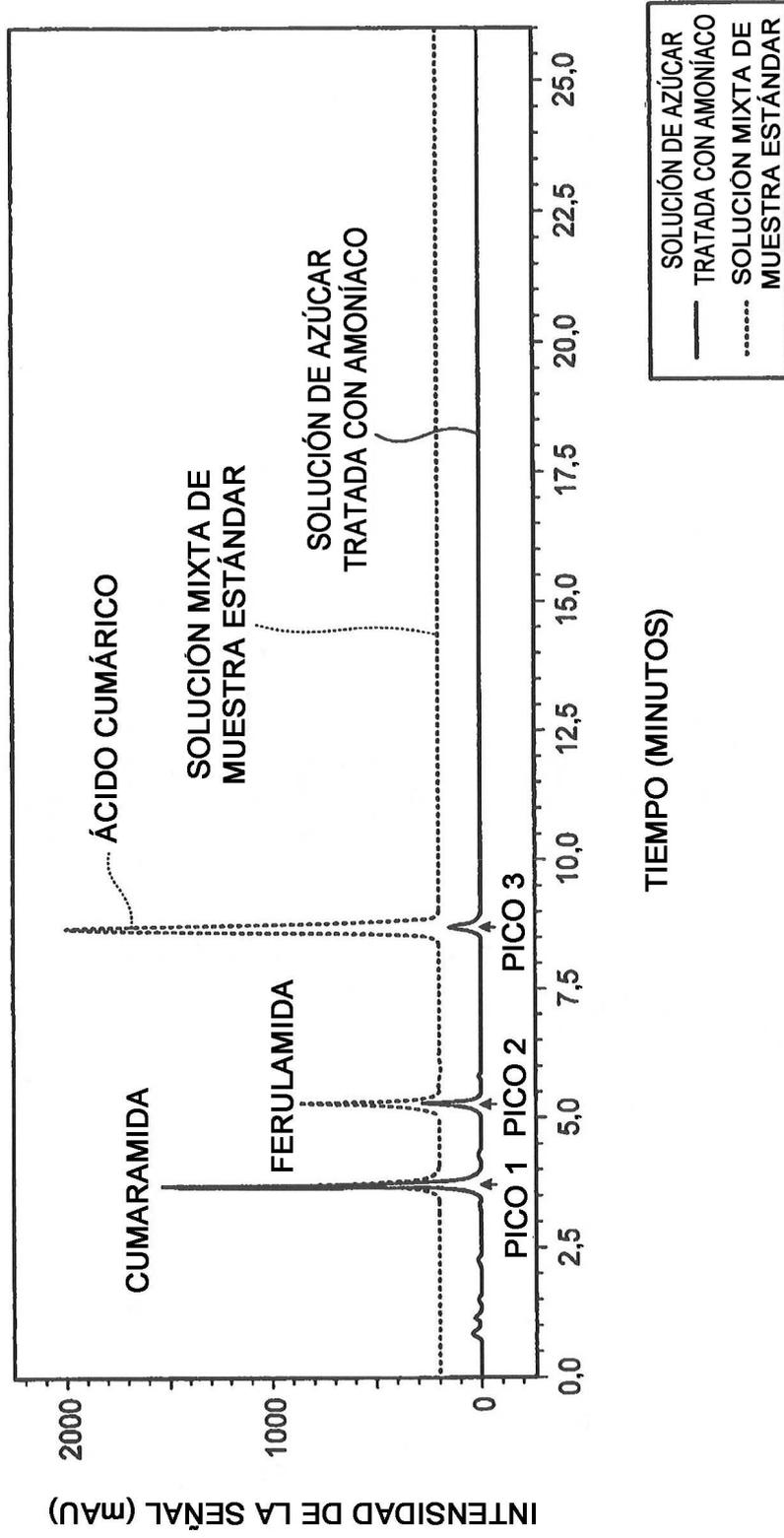


FIG.3

[PICO DE LA SOLUCIÓN DE AZÚCAR TRATADA CON AMONÍACO 1]

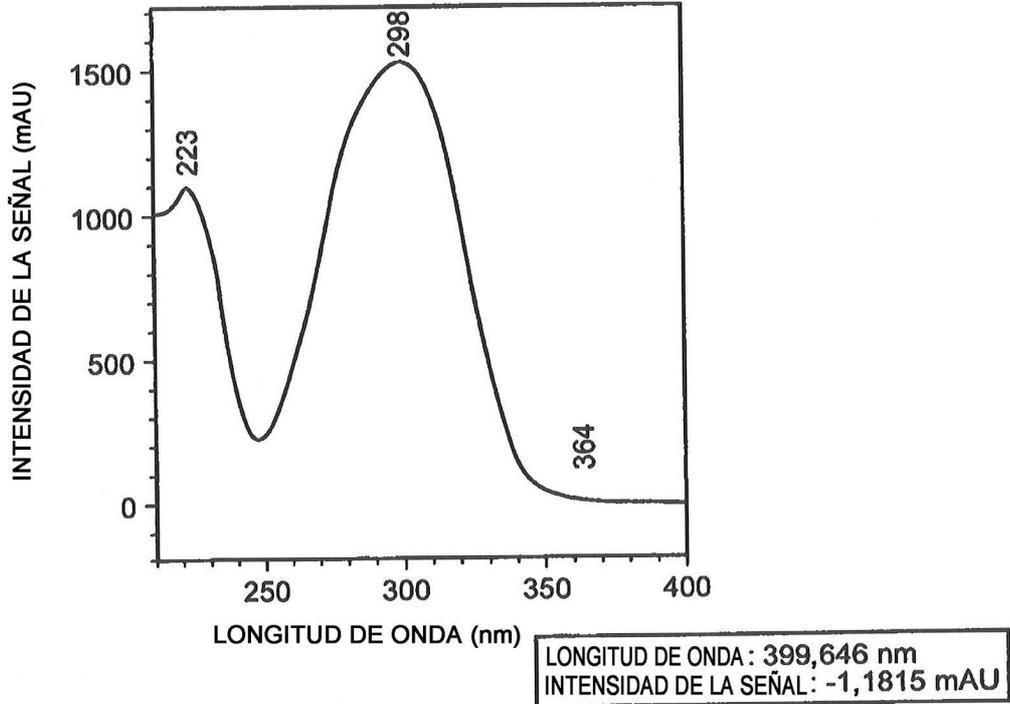


FIG.4

[PICO DE LA SOLUCIÓN DE AZÚCAR TRATADA CON AMONÍACO 2]

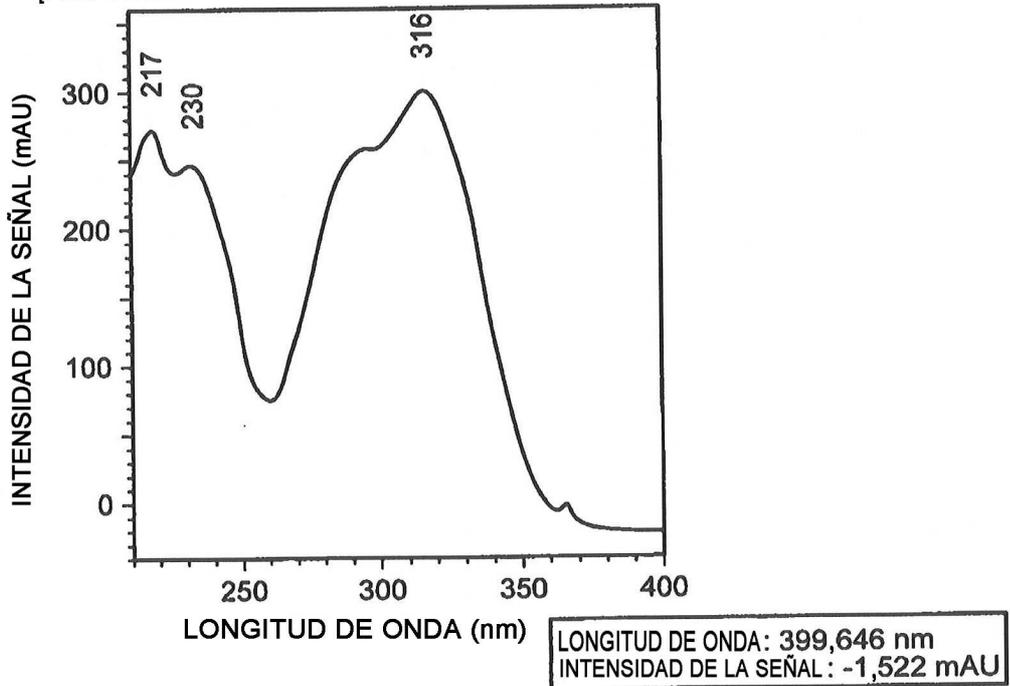


FIG.5

[MUESTRA ESTÁNDAR DE CUMARAMIDA]

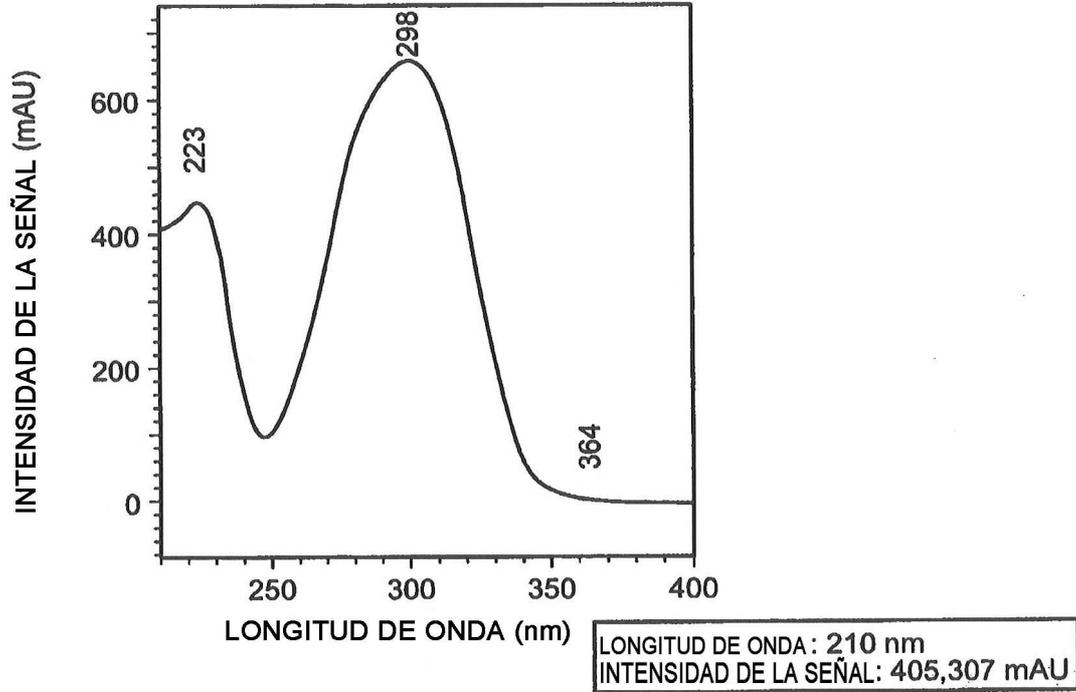


FIG.6

[MUESTRA ESTÁNDAR DE FERULAMIDA]

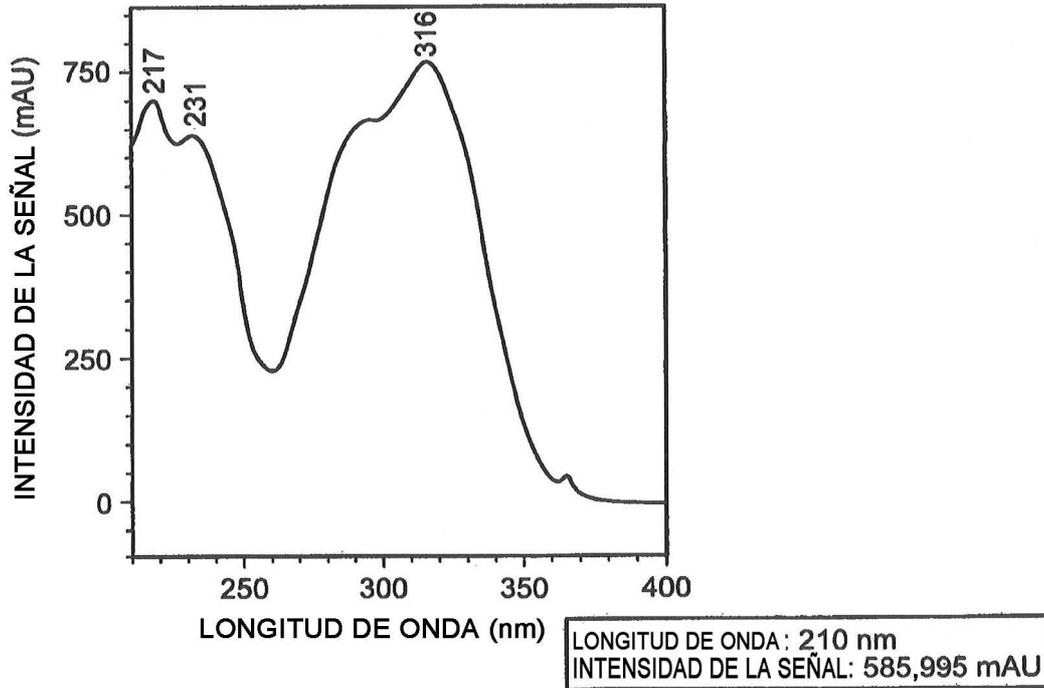


FIG.7

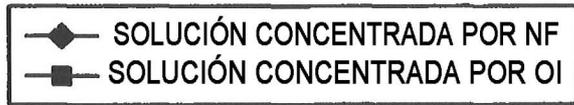
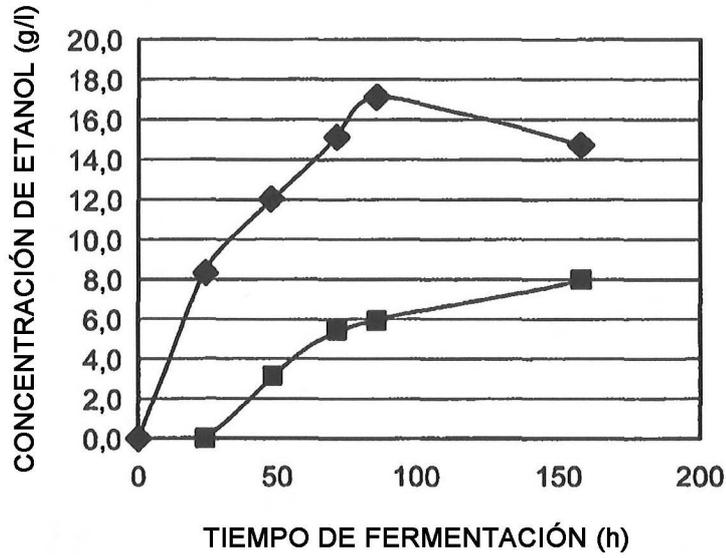


FIG.8

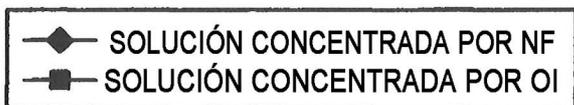
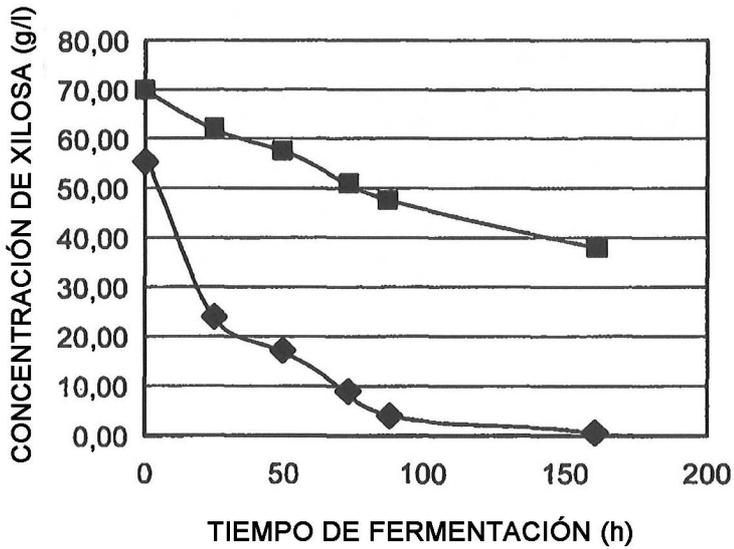


FIG.9

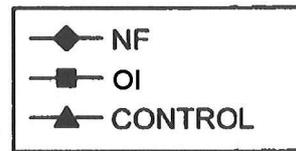
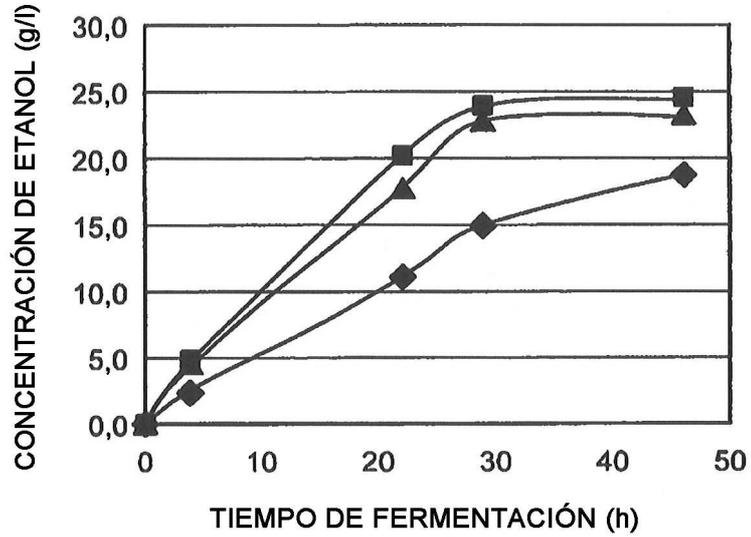


FIG.10

