

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 273**

51 Int. Cl.:

C13K 1/04	(2006.01)
C12P 7/02	(2006.01)
C12P 7/40	(2006.01)
C12P 13/04	(2006.01)
C12P 19/30	(2006.01)
C13B 20/02	(2011.01)
C13B 20/16	(2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2013 PCT/JP2013/065431**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13183617**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2013 E 13801065 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2857528**

54 Título: **Procedimiento para la producción de una solución que contiene azúcar**

30 Prioridad:

05.06.2012 JP 2012127704

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

19.09.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KURIHARA, HIROYUKI y
YAMADA, KATSUSHIGE**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 682 273 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 la producción de una solución que contiene azúcar

5 **SECTOR TÉCNICO**

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar a partir de biomasa.

10 **ANTECEDENTES TÉCNICOS**

En los últimos años, se han estudiado ampliamente procedimientos para producir un líquido que contiene azúcar pretratando biomasa celulósica con un ácido, agua caliente, álcali o similares y añadiéndole posteriormente celulasa para realizar la hidrólisis. El líquido que contiene azúcar obtenido de este modo a veces tiene una concentración de azúcar menor que un líquido que contiene azúcar convencional derivado de un material comestible, tal como almidón o jugo de caña.

En general, en los casos en los que la concentración de azúcar es baja, la concentración de azúcares puede aumentarse destilando agua en el líquido que contiene azúcar mediante, por ejemplo, concentración a presión reducida o concentración por calentamiento. Por ejemplo, se ha dado a conocer un caso en el que se concentran melazas de remolacha en un evaporador (véase el documento de patente 1).

Por otro lado, en el tratamiento de fermentación de metano de desechos orgánicos, han existido problemas causados por la precipitación de metales alcalinotérreos contenidos en los desechos, entre los que se incluyen calcio y magnesio, como obstrucción de tuberías y deterioro de las funciones de las membranas de separación debido a su fijación en las superficies de la membrana (véase el documento de patente 2).

El documento de patente 3 da a conocer un procedimiento para producir glucosa a partir de una materia prima lignocelulósica que comprende (i) pretratar la materia prima lignocelulósica con ácido para producir una materia prima pretratada, (ii) proporcionar una corriente que contiene calcio, que comprende calcio, que se obtiene a partir de la materia prima lignocelulósica, (iii) producir una corriente que contiene carbonato cálcico por precipitación de dicho calcio de la corriente que contiene calcio, (iv) ajustar el pH de una corriente que comprende dicha materia prima pretratada con (a) la corriente que contiene carbonato cálcico, (b) una corriente que contiene hidróxido cálcico que se deriva de dicha corriente que contiene carbonato cálcico, sometiendo dicha corriente que contiene carbonato cálcico a calcinación, o (c) una combinación de la corriente que contiene carbonato cálcico y la corriente que contiene hidróxido cálcico, en el que dicho ajuste del pH de dicha corriente que comprende la materia prima pretratada produce una materia prima lignocelulósica pretratada neutralizada que tiene un pH entre, aproximadamente, 3 y, aproximadamente, 9 y en la que el pH de la materia prima lignocelulósica pretratada neutralizada producida de este modo es mayor que el pH de la composición que comprende la materia prima pretratada producida en la etapa (i), y (v) llevar a cabo la hidrólisis enzimática de dicha materia prima lignocelulósica pretratada neutralizada con enzimas celulasa para producir la glucosa.

El documento de patente 4 da a conocer la producción de ácido succínico, en la que se eliminó un caldo calentado mediante centrifugación o filtración por membrana de las células, se añadió carbonato sódico al sobrenadante para producir la torta precipitada de carbonato magnésico que se recuperó por filtración y el filtrado se hizo pasar a través de una columna de resina catiónica para recuperar la solución de ácido succínico. El pH en el proceso de fermentación se ajustó con carbonato magnésico.

El documento de patente 5 da a conocer un procedimiento que permite eliminar residuos de biomasa que se forman durante la producción de azúcares a partir de biomasa que contiene celulosa, antes de realizar la filtración a través de una membrana de microfiltración y/o membrana de ultrafiltración, evitando de este modo la obstrucción de la membrana de microfiltración y/o membrana de ultrafiltración para asegurar la producción estable a largo plazo de una solución acuosa que contiene azúcar refinada

55 **DOCUMENTOS DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

[Documentos de patente]

60 [Documento de patente 1] JP 2005-27807 A

[Documento de patente 2] WO2009 /041009

[Documento de patente 3] US 2010/184151 A1

65 [Documento de patente 4] CN 101 348 429 A

[Documento de patente 5] WO 2011/162009 A1

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

5 PROBLEMAS A RESOLVER POR LA INVENCIÓN

Los inventores de la presente invención descubrieron problemas en el cultivo de microorganismos utilizando como materia prima de fermentación un líquido que contiene azúcar de biomasa celulósica, especialmente, líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica, que la precipitación de una sustancia insoluble que contiene magnesio como componente principal puede provocar la fijación de incrustaciones en un aparato de fermentación, la obstrucción de las tuberías, la obstrucción de una membrana de separación, la aparición de un problema en un sensor de pH/OD, fijación de incrustaciones a una membrana de separación durante el cultivo continuo, y dificultad en la separación por membrana de un producto de fermentación del líquido de cultivo.

Un objetivo de la presente invención es dar a conocer un procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, procedimiento que pueda evitar los problemas anteriores, es decir, la fijación de incrustaciones a un aparato de fermentación, la obstrucción de tuberías, la obstrucción de una membrana de separación, la aparición de un problema en un sensor de pH/OD y la fijación de incrustaciones a una membrana de separación durante el cultivo continuo, y que permita la separación por membrana de un producto de fermentación del líquido de cultivo.

20 MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS

La presente invención tiene como objetivo resolver los problemas descritos anteriormente, y el procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar de la presente invención comprende las etapas de: obtener un líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica mediante el tratamiento enzimático de una biomasa celulósica; añadir uno o más álcalis a dicho líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica para ajustar el pH a, como mínimo, 8, para precipitar una sustancia o sustancias insolubles que contienen, como mínimo, magnesio; y realizar la filtración a través de una membrana de microfiltración para eliminar la o las sustancias insolubles, para obtener un líquido que contiene azúcar como un permeado, tal como se define en la reivindicación 1.

En un modo preferente del procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar de la presente invención, el líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica es un líquido que contiene azúcar preparado sometiendo un hidrolizado obtenido a partir de una biomasa celulósica mediante tratamiento con enzimas, a uno o más de los tratamientos seleccionados del grupo que comprende concentración mediante membrana, concentración a presión reducida y concentración por calentamiento.

En un modo preferente del procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar de la presente invención, el tamaño promedio de poros de la membrana de microfiltración está dentro del intervalo de 0,01 µm a 1 µm.

En un modo preferente del procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar de la presente invención, la membrana de microfiltración es una membrana de microfiltración de fibras huecas.

En un modo preferente del procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar de la presente invención, se añaden adicionalmente uno o más aditivos seleccionados del grupo que comprende fuentes de nitrógeno, sales metálicas, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agentes antiespumantes y surfactantes.

En la presente invención, se pueden producir diversos tipos de productos químicos utilizando el líquido que contiene azúcar obtenido mediante el procedimiento de producción como materia prima de fermentación.

En la presente invención, se cultiva un microorganismo utilizando, como materia prima de fermentación, un líquido que contiene azúcar obtenido mediante el procedimiento de producción anterior, para permitir la producción de un producto químico en el líquido de cultivo, mientras que el microorganismo y el producto químico se filtran de forma continua o intermitente a través de una membrana de separación. Mediante esto, el producto químico puede ser recuperado.

55 EFECTO DE LA INVENCIÓN

Mediante la presente invención, el problema mencionado anteriormente, es decir, la fijación de incrustaciones en un fermentador o una membrana de separación, se puede suprimir sin utilizar un procedimiento costoso, tal como la cromatografía iónica. Esto puede conseguirse mediante un procedimiento simple en el que se llevan a cabo las siguientes operaciones: se añaden uno o más álcalis a un líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica para ajustar el pH a, como mínimo, 8, para precipitar una o más sustancias insolubles que contienen, como mínimo, magnesio; y la o las sustancias insolubles se eliminan mediante filtración a través de una membrana de microfiltración, para obtener un líquido que contiene azúcar como un permeado. Además, se puede conseguir la mejora del rendimiento de fermentación como un efecto novedoso realizando las operaciones anteriores en los

casos en los que se utiliza un líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica como materia prima de fermentación.

5 El procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, de la presente invención, puede comprender además cultivar un microorganismo, utilizándolo como una materia prima de fermentación, líquido que contiene azúcar que se obtiene mediante el procedimiento tal como el que se ha descrito anteriormente. El líquido que contiene azúcar producido mediante la presente invención se puede utilizar como materia prima de fermentación para diversos tipos de productos químicos.

10 DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un diagrama que ilustra el flujo de bloques de un procedimiento para producir un líquido según la presente invención, el pH se ajustará a, como mínimo, 8.

15 La figura 2 es un diagrama que ilustra el flujo de bloques de otro procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar. Según la presente invención, el pH se ajustará a, como mínimo, 8.

La figura 3 es un cromatógrafo obtenido redisolviendo una sustancia insoluble en una solución acuosa de ácido clorhídrico y posteriormente realizando la separación mediante cromatografía iónica.

20 La figura 4 es una vista esquemática en sección transversal para la explicación de la constitución de un módulo simplificado para el procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar de la presente invención, módulo que utiliza una membrana de fibras huecas.

25 La figura 5 es una vista lateral que ilustra un ejemplo del aparato utilizado en el procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar de la presente invención.

La figura 6 es una vista lateral que ilustra otro ejemplo del aparato utilizado en el procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar de la presente invención.

30 La figura 7 es una vista lateral que ilustra un ejemplo de un aparato para producir un producto químico que utiliza el líquido que contiene azúcar de la presente invención como materia prima de fermentación.

35 MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

Los modos para llevar a cabo la presente invención se describen a continuación.

40 El procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar de la presente invención comprende las etapas de: añadir uno o más álcalis a un líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica para ajustar el pH a, como mínimo, 8, para precipitar una o más sustancias insolubles que contienen, como mínimo, magnesio; y realizar la filtración a través de una membrana de microfiltración para eliminar dicha o dichas sustancias insolubles, para obtener un líquido que contiene azúcar como un permeado.

45 La figura 1 es un diagrama que ilustra el flujo de bloques de un procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar de la presente invención.

50 En primer lugar, se describe la etapa de añadir uno o más álcalis a un líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica para ajustar el pH a, como mínimo, 8, para precipitar una o más sustancias insolubles que contienen, como mínimo, magnesio [Etapa (1)], de la presente invención.

55 El líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica que se utilizará en la presente invención significa un líquido que contiene azúcar que es una solución acuosa que contiene un azúcar obtenido por hidrólisis de un material de biomasa celulósica y se ha procesado a través de una etapa de concentración, mediante una o más operaciones de concentración. En el presente documento, la biomasa celulósica significa una biomasa que contiene celulosa.

60 Entre los ejemplos específicos de la biomasa celulósica se incluyen biombras herbáceas tales como bagazo, pasto varilla, hierba napier, *Erianthus*, rastrojo de maíz, rastrojo de arroz, paja de trigo, piel y cáscara de coco; biombras leñosas tales como árboles, álamos y desechos de materiales de construcción; y biombras derivadas del medio ambiente acuático tales como algas marinas.

Estas biombras contienen, además de celulosa y hemicelulosa (que en lo sucesivo pueden denominarse "celulosa", como un término general para celulosa y hemicelulosa), lignina como macromoléculas aromáticas, y similares.

65 En presente documento, el líquido que contiene azúcar significa un líquido que contiene azúcar obtenido sometiendo la biomasa celulósica a un tratamiento enzimático para realizar la hidrólisis del componente de celulosa y/o el

componente de hemicelulosa contenido en la biomasa celulósica. El líquido que contiene azúcar no se limita al líquido que contiene azúcar inmediatamente después de la hidrólisis, y también se puede considerar una solución acuosa obtenida después de añadir un microorganismo al hidrolizado y realizar la fermentación como el líquido que contiene azúcar, siempre que la solución acuosa contenga azúcar y pueda ser utilizada en la presente invención.

5 Los principales componentes de azúcar del hidrolizado son hexosas, tales como glucosa y pentosas, tales como xilosa. El líquido que contiene azúcar concentrado significa un líquido que contiene azúcar preparado concentrando líquido que contiene azúcar de biomasa celulósica mediante un procedimiento conocido, tal como concentración por evaporación o concentración por membrana. El procedimiento de concentración puede ser una combinación de una pluralidad de procedimientos. El líquido que contiene azúcar concentrado también puede ser una dilución preparada añadiendo agua o similar a un líquido concentrado mediante el procedimiento de concentración anterior, o a un azúcar en estado sólido preparado mediante eliminación de agua por concentración.

10 En la presente invención, se lleva a cabo la operación de añadir un álcali o álcalis a un líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica para ajustar el pH a, como mínimo, 8, para precipitar una o más sustancias insolubles que contienen, como mínimo, magnesio.

Entre los ejemplos preferentes del o de los álcalis que se van a añadir se incluyen amoniaco, amoniaco acuoso, hidróxido sódico e hidróxido potásico.

20 Aunque también se puede utilizar un álcali tal como hidróxido cálcico, el calcio puede provocar la producción de incrustaciones de manera similar al magnesio, por lo que la utilización de dicho álcali no es ventajosa. Como álcali, se utiliza de forma especialmente preferente amoniaco.

25 En los casos en los que se utiliza ácido sulfúrico en la hidrólisis de la biomasa celulósica, el hidrolizado obtenido, así como el líquido que contiene azúcar concentrado, a menudo contienen iones sulfato. Al agregarle amoniaco, se puede producir sulfato de amonio como una sal. Como es bien sabido, el sulfato de amonio se puede utilizar de forma efectiva como fuente de nitrógeno por microorganismos durante su crecimiento, producción fermentativa y similares. Es decir, el álcali que se va a utilizar para el ajuste del pH es más preferentemente amoniaco. Ajustando el pH a, como mínimo, 8, el magnesio disuelto en el líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica puede convertirse en hidróxido magnésico, que puede precipitarse en forma de cristales insolubles. El pH se ajusta preferentemente a, como mínimo, 9, más preferentemente, como mínimo, 10. El límite superior del pH no está limitado, siempre que el pH sea menor que 14, pero, dado que un pH superior a 12 no aumenta especialmente el efecto, el pH preferentemente se establece en no más de 12, a efectos de reducir la cantidad del o de los álcalis utilizados. Es decir, el pH está preferentemente dentro del intervalo de 8 a 12, más preferentemente dentro del intervalo de 9 a 12, de la forma más preferente, dentro del intervalo de 10 a 12.

35 Entre los ejemplos del procedimiento para alimentar el o los álcalis para ajustar el pH se incluyen un procedimiento en el que el líquido que contiene azúcar de biomasa celulósica se somete preliminarmente a titulación con el o los álcalis a utilizar, y se alimenta una cantidad predeterminada del álcali o álcalis; y un procedimiento en el que el o los álcalis se alimentan mientras se controla el aumento en el pH con un sensor de pH o similar hasta que se alcanza un pH predeterminado.

40 Para la homogeneización del o de los álcalis añadidos, se puede llevar a cabo una operación tal como agitación o mezcla. Después del ajuste al pH alcalino, la precipitación del hidróxido magnésico puede llevarse a cabo, si es necesario, mediante una operación tal como la incubación o el enfriamiento. El tiempo de la precipitación puede establecerse arbitrariamente, y la precipitación se lleva a cabo durante, preferentemente, como mínimo, 1 minuto, más preferentemente, como mínimo, 5 minutos, de la forma más preferente, como mínimo, 3 horas.

50 Cuanto mayor es el tiempo de la precipitación después del ajuste al pH alcalino, mayor es el efecto para precipitar suficientemente el hidróxido magnésico. Este tratamiento también tiene un efecto de desinfección, eliminación y/o esterilización por la exposición de los microorganismos, mohos, esporas y similares contenidos en el líquido que contiene azúcar a condiciones alcalinas.

55 La figura 2 es un diagrama que ilustra el flujo de bloques de otro procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar de la presente invención. En la figura 2, el diagrama muestra un flujo que utiliza, en la etapa de precipitación del hidróxido magnésico, un período tal como transporte, mantenimiento/almacenamiento, o transporte/conservación/almacenamiento del líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica. Dado que la precipitación de la o las sustancias insolubles requiere un cierto período de tiempo, los períodos anteriores pueden ser utilizados efectivamente para este propósito. Dado que, en la presente invención, el pH se ajusta con uno o más álcalis, tal como se ha descrito anteriormente, se puede conseguir una calidad de conservación mejorada debido a la prevención de la contaminación microbiana y similares.

60 El tratamiento con membranas de microfiltración puede estar precedido de la adición de uno o más nutrientes y materiales auxiliares necesarios para la utilización de un líquido que contiene azúcar como materia prima de

fermentación, tal como fuentes de nitrógeno, sales metálicas, vitaminas, aminoácidos, azúcares, antibióticos, surfactantes y agentes antiespumantes.

5 Entre los ejemplos de las fuentes de nitrógeno se incluyen sulfato de amonio, fosfato de amonio, caseína, extracto de carne, extracto de levadura, peptona, peptona de soja y licor de maceración de maíz.

10 Entre los ejemplos de las sales metálicas se incluyen las de molibdeno, cobalto, hierro, cobre, zinc, manganeso, níquel, cromo, selenio, yodo, flúor, silicio y vanadio. Entre los ejemplos de las vitaminas se incluyen vitamina B12, tiamina, biotina y vitamina B1.

15 Entre los ejemplos de azúcares se incluyen glucosa, arabinosa, xilosa, fructosa, psicosa, galactosa, manosa, xilulosa, treosa, eritrosa y ribosa. Entre los ejemplos de los aminoácidos se incluyen alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina.

20 Entre los ejemplos de antibióticos se incluyen antibióticos de tetraciclina, antibióticos de β -lactama, antibióticos aminoglucósidos, antibióticos macrólidos y antibióticos de cloranfenicol.

Entre los ejemplos de surfactantes se incluyen surfactantes no iónicos, surfactantes aniónicos y surfactantes catiónicos.

25 En términos de la adición de dichos componentes en los casos de utilizar un líquido que contiene azúcar como materia prima de fermentación, de manera preferente, los componentes necesarios en las cantidades requeridas se añaden en esta etapa de manera preliminar. Esto se lleva a cabo con el fin de evitar que la o las sustancias insolubles se generen nuevamente durante la etapa de fermentación debido a la adición de estos componentes al líquido que contiene azúcar.

30 El líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica utilizado en la presente invención es preferentemente un líquido que contiene azúcar preparado por concentración utilizando una membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa. La membrana de nanofiltración también se denomina nanofiltro (membrana de nanofiltración, membrana NF) y generalmente se define como una "membrana que permite la permeación de iones monovalentes, pero bloquea los iones divalentes". Se considera que la membrana tiene huecos finos que tienen tamaños de aproximadamente varios nanómetros, y se utilizan principalmente para bloquear partículas finas, moléculas, iones, sales y similares en el agua.

35 Una membrana de ósmosis inversa también se denomina membrana RO, y generalmente se define como una "membrana que tiene una función de desalinización también para iones monovalentes". Se considera que la membrana tiene huecos ultrafinos que tienen tamaños de varios angstroms a varios nanómetros, y se utiliza principalmente para la eliminación de componentes iónicos, tales como la desalinización de agua de mar y la producción de agua ultrapura.

40 El material de la membrana de nanofiltración o membrana de ósmosis inversa utilizada en la presente invención puede estar compuesto de un compuesto macromolecular, y entre los ejemplos del compuesto macromolecular se incluyen polímeros de acetato de celulosa, poliamidas, poliésteres, poliimidas, polímeros de vinilo y polisulfonas. La membrana no está limitada a una membrana constituida por uno de los materiales, y puede ser una membrana que comprende una pluralidad de materiales de membrana.

45 Como la membrana de nanofiltración a utilizar en la presente invención, es preferente un elemento de membrana enrollado en espiral. Entre los ejemplos específicos de elementos de membrana de nanofiltración preferentes se incluyen un elemento de membrana de nanofiltración de acetato de celulosa GE Sepa, fabricado por GE Osmonics; elementos de membrana de nanofiltración NF99 y NF99HF, fabricados por Alfa-Laval, que tienen capas funcionales de poliamida; elementos de membrana de nanofiltración NF-45, NF-90, NF-200, NF-270 y NF-400, fabricados por FilmTec Corporation, que tienen capas con funcionalidad de poliamida de piperacina reticulada; y elementos de membrana de nanofiltración SU-210, SU-220, SU-600 y SU-610, fabricados por Toray Industries, Inc., que comprenden una membrana de nanofiltración UTC60, fabricados por el mismo fabricante, que comprenden una poliamida de piperacina reticulada como componente principal. Más preferentemente, el elemento de membrana de nanofiltración es NF99, NF99HF; NF-45, NF-90, NF-200, NF-400, SU-210, SU-220, SU-600 o SU-610. Aún más preferentemente, el elemento de membrana de nanofiltración es SU-210, SU-220, SU-600 o SU-610.

50 Entre los ejemplos de la membrana de ósmosis inversa utilizada en la presente invención se incluyen membranas compuestas que comprenden un polímero de acetato de celulosa como capa funcional (en lo sucesivo denominadas también membranas de ósmosis inversa de acetato de celulosa) y membranas compuestas que comprenden una poliamida como capa funcional (en lo sucesivo denominadas también membranas de ósmosis inversa de poliamida).

65 Entre los ejemplos del polímero de acetato de celulosa en el presente documento se incluyen polímeros preparados con uno de ésteres de ácidos orgánicos de celulosa o una mezcla de dos o más de los mismos o ésteres mixtos de

los mismos, tales como acetato de celulosa, diacetato de celulosa, triacetato de celulosa, propionato de celulosa y butirato de celulosa. Entre los ejemplos de la poliamida se incluyen polímeros lineales y polímeros reticulados compuestos de monómeros de diamina alifáticos y/o aromáticos.

5 Entre los ejemplos específicos de la membrana de ósmosis inversa utilizada en la presente invención se incluyen módulos de membrana de ósmosis inversa de poliamida fabricados por TORAY INDUSTRIES, INC. SUL-G10 y SUL-G20, que son módulos de tipo de presión ultrabaja, y SU-710, SU-720, SU-720F, SU-710L, SU-720L, SU-720LF, SU-720R, SU-710P y SU-720P, que son módulos de tipo de baja presión, así como SU-810, SU-820, SU-820L y SU-820FA, que son módulos de alta presión que contienen UTC80 como membrana de ósmosis inversa;
10 membranas de ósmosis inversa de acetato de celulosa fabricadas por el mismo fabricante SC-L100R, SC-L200R, SC-1100, SC-1200, SC-2100, SC-2200, SC-3100, SC-3200, SC-8100 y SC-8200; NTR-759HR, NTR-729HF, NTR-70SWC, ES10-D, ES20-D, ES20-U, ES15-D, ES15-U y LF10-D, fabricados por Nitto Denko Corporation; RO98pHt, RO99, HR98PP y CE4040C-30D, fabricados por Alfa-Laval; GE Sepa, fabricado por GE; BW30-4040, TW30-4040, XLE-4040, LP-4040, LE-4040, SW30-4040 y SW30HRLE-4040, fabricados por FilmTec Corporation;
15 TFC-HR y TFC-ULP, fabricados por KOCH; y ACM-1, ACM-2 y ACM-4, fabricados por TRISEP.

La utilización de la membrana de nanofiltración y/o la membrana de ósmosis inversa para concentrar el líquido que contiene azúcar tiene la ventaja de que se puede aumentar la concentración de azúcar en el líquido que contiene azúcar y que los inhibidores de la fermentación se pueden eliminar como un permeado. En presente documento, el término "inhibidores de la fermentación" significa componentes distintos de azúcares que inhiben la fermentación en la etapa de fermentación en una etapa posterior, y entre los ejemplos específicos de los inhibidores de la fermentación se incluyen compuestos aromáticos, compuestos de furano, ácidos orgánicos y sales inorgánicas monovalentes. Entre los ejemplos representativos de estos inhibidores de fermentación se incluyen compuestos aromáticos y compuestos de furano tales como furfural, hidroximetilfurfural, vainillina, ácido vainílico, ácido siríngico,
20 aldehído coniferílico, ácido cumárico y ácido ferúlico.

Entre los ejemplos de ácidos orgánicos y sales inorgánicas se incluyen ácido acético y ácido fórmico; y sales de potasio y sodio.

30 La concentración de azúcar en el líquido que contiene azúcar concentrado puede establecerse arbitrariamente dentro del intervalo de 50 g/l a 400 g/l dependiendo de, por ejemplo, la utilización del líquido que contiene azúcar concentrado. En casos en los que se desea una eliminación más completa de los inhibidores de la fermentación, puede añadirse agua al líquido que contiene azúcar o al líquido que contiene azúcar concentrado, seguido por la concentración de la dilución resultante a través de una membrana de nanofiltración y/o una membrana de ósmosis inversa hasta una concentración de azúcar deseada. Mediante esto, los inhibidores de la fermentación se pueden eliminar como un permeado. La utilización de una membrana de nanofiltración es más preferente que la utilización de una membrana de ósmosis inversa, ya que una membrana de nanofiltración tiene un mayor efecto de eliminación de los inhibidores de la fermentación. La utilización de una membrana de nanofiltración o la utilización de una membrana de ósmosis inversa puede seleccionarse teniendo en cuenta la concentración de inhibidores de la fermentación contenidos en el líquido que contiene azúcar mezclado, o cómo la fermentación en una etapa posterior está influenciada por los inhibidores de la fermentación.

Se describe a continuación la etapa de filtración a través de una membrana de microfiltración para eliminar la o las sustancias insolubles, para obtener un líquido que contiene azúcar como un permeado [Etapa (2)].
45

El precipitado que contiene hidróxido magnésico producido en la etapa anterior se filtra utilizando una membrana de microfiltración, para obtener un líquido que contiene azúcar como un permeado.

Las membranas de microfiltración también se denominan membranas de filtración, y son membranas de separación que pueden separar y eliminar partículas con tamaños de, aproximadamente, 0,01 a 10 μm de una suspensión de partículas utilizando una diferencia de presión como fuerza motriz. Las membranas de microfiltración tienen poros que tienen tamaños dentro del intervalo de 0,01 a 10 μm en sus superficies, y los componentes particulados más grandes que los poros se pueden separar/eliminar al lado de la membrana.

55 Entre los ejemplos del material de la membrana de microfiltración se incluyen, pero sin que constituyan limitación, acetato de celulosa, poliamida aromática, alcohol polivinílico, polisulfona, fluoruro de polivinilideno, polietileno, poliacrilonitrilo, cerámica, polipropileno, policarbonato y politetrafluoroetileno (Teflon (marca registrada)). Preferentemente, la membrana es una membrana de microfiltración de fluoruro de polivinilo en vistas de la resistencia a la contaminación, resistencia química, resistencia, rendimiento de filtración y similares.

60 Preferentemente, el tamaño promedio de poro de la membrana de microfiltración utilizada en la presente invención es de 0,01 μm a 1 μm . Esto se debe a que el tamaño de la o las sustancias insolubles en el líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica a precipitar por la precipitación alcalina es de, aproximadamente, 2 μm y, por lo tanto, la o las sustancias insolubles precipitadas pueden eliminarse casi completamente por filtración utilizando una membrana de microfiltración en los casos en los que la membrana de microfiltración tiene un tamaño
65

de poro promedio de 1 μm . Por otro lado, en los que casos en los que el tamaño de poro promedio de la membrana de microfiltración es menor a 0,01 μm , la eliminación completa de la o las sustancias insolubles precipitadas es teóricamente posible, pero el caudal (flujo) de filtración es bajo, y la filtración requiere alta presión en estos casos, lo que es problemático. Además, la utilización de una membrana de este tipo a menudo conduce a la aparición de obstrucciones (incrustaciones) sobre la superficie de la membrana, dentro de la membrana, o en huecos diminutos en el módulo, debido a la o las sustancias insolubles. De este modo, es preferente utilizar una membrana con un tamaño de poro promedio de, como mínimo, 0,01 μm , es decir, una membrana de microfiltración.

El tratamiento de la membrana de microfiltración puede ir precedido de un tratamiento previo mediante una separación conocida entre sólido y líquido, por ejemplo, centrifugación utilizando un decantador de tornillo o similar; filtración, tal como filtración por presión o por succión; o filtración de membrana tal como microfiltración. El pretratamiento puede ser un medio eficaz, especialmente en los casos en los que el líquido que contiene azúcar celulósico concentrado contiene una gran cantidad de sólidos orgánicos, lignina, celulosa no degradada, xilano, oligosacáridos y similares, independientemente del ajuste del pH. Debe observarse que, incluso en los casos en que se lleva a cabo tal separación sólido-líquido, la o las sustancias insolubles que contienen hidróxido magnésico no se pueden eliminar sin realizar la filtración a través de una membrana de microfiltración.

Entre los ejemplos del modo de filtración a través de una membrana de ultrafiltración se incluyen la filtración de flujo tangencial y la filtración de flujo frontal. En vista de la prevención del ensuciamiento y la fijación del flujo, es preferente la filtración de flujo tangencial. Las membranas de microfiltración se pueden clasificar en membranas planas y membranas de fibras huecas. Es preferente una membrana de fibras huecas. En los casos en los que se utiliza una membrana de fibras huecas, se puede llevar a cabo un lavado inverso para eliminar la suciedad o los componentes de incrustación unidos a la superficie de la membrana, aplicando presión desde el lado secundario de la membrana utilizando una solución que contiene un agente. Las membranas de fibras huecas se pueden clasificar en dos tipos: membranas de fibras huecas de presión interna (para filtración desde el lado interno al externo) y membranas de fibras huecas de presión externa (para filtración desde el lado externo al lado interno). En los casos de membranas de fibras huecas de tipo presión interna, se producen sustancias insolubles que contienen magnesio dentro del hueco, y esto puede causar la obstrucción de la membrana, lo que no es preferente. De este modo, se puede utilizar preferentemente una membrana de fibras huecas de tipo de presión externa. Dado que, en particular, el componente precipitado en condiciones alcalinas en la presente invención es hidróxido magnésico, el lavado inverso se lleva a cabo preferentemente utilizando un agente ácido. Entre los ejemplos del agente ácido que se puede utilizar preferentemente se incluyen aquellos que tienen un pH dentro del intervalo de 0,4 a 4, incluyendo ácido sulfúrico, ácido clorhídrico o similares.

[Procedimiento para producir un producto químico utilizando líquido que contiene azúcar como materia prima de fermentación]

Mediante el cultivo de microorganismos que tienen capacidades para producir diversos productos químicos utilizando, como materia prima de fermentación, el líquido que contiene azúcar obtenido mediante la presente invención, se pueden fabricar los productos químicos. En el presente documento, "cultivar un microorganismo utilizando el líquido que contiene azúcar como materia prima de fermentación" significa que uno o más de los componentes de azúcar y las fuentes de amino contenidas en el líquido que contiene azúcar se utilizan como nutrientes para un microorganismo, para permitir el crecimiento del microorganismo y la conversión metabólica de los azúcares.

Entre los ejemplos específicos de los productos químicos se incluyen alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos, ácidos nucleicos y enzimas, que son sustancias producidas en masa en la industria de la fermentación. Dichos productos químicos se producen y se acumulan dentro y fuera del cuerpo vivo en el proceso de metabolismo utilizando los componentes de azúcar contenidos en el líquido que contiene azúcar como fuentes de carbono. Entre los ejemplos específicos de los productos químicos que pueden ser producidos por los microorganismos se incluyen alcoholes tales como etanol, 1,3-propanodiol, 1,4-propanodiol y glicerol; ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido málico, ácido itacónico y ácido cítrico; nucleósidos tales como inosina y guanosina; nucleótidos tales como ácido inosínico y ácido guanílico; y compuestos de amina tales como cadaverina. El líquido que contiene azúcar de la presente invención también se puede aplicar a la producción de enzimas, antibióticos, proteínas recombinantes y similares. Los microorganismos que se van a utilizar para la producción de estos productos químicos no están limitados, siempre que los microorganismos sean capaces de producir eficientemente los productos químicos de interés. Entre los ejemplos de los microorganismos se incluyen *E. coli*, levaduras, hongos filamentosos y Basidiomicetos.

Tal como se ha descrito anteriormente, el líquido que contiene azúcar obtenido mediante el procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar de la presente invención es un líquido que contiene azúcar del cual se ha eliminado el componente magnésico. De este modo, el líquido que contiene azúcar puede utilizarse preferentemente en un procedimiento para producir un producto químico mediante filtración intermitente o continua, utilizando una membrana de separación. La membrana de separación que se utilizará en la presente invención puede ser cualquiera de las membranas de polímeros orgánicos, tales como las membranas de PVDF; y membranas de separación inorgánica tales como membranas de zeolita. Dado que el líquido que contiene azúcar procesado por la

presente invención es un líquido que contiene azúcar a partir del cual se ha eliminado el componente magnésico, el líquido que contiene azúcar tiene una filtrabilidad excelente a largo plazo, lo que es ventajoso.

[Aparato para producir líquido que contiene azúcar]

Se describe a continuación el aparato para producir el líquido que contiene azúcar de la presente invención.

La figura 5 es una vista lateral que ilustra un ejemplo del aparato utilizado en el procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar de la presente invención.

En la figura 5, el líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica se retiene en un tanque de precipitación -1-. El pH en el tanque de precipitación -1- se ajusta posteriormente. Entre los ejemplos del procedimiento para el ajuste del pH se incluyen un procedimiento en el que se añade un álcali desde un tanque de almacenamiento de álcali -6-, y un procedimiento en el que se suministra un álcali en estado gaseoso tal como amoníaco gaseoso desde un tubo difusor -3-. Durante la adición del álcali, la cantidad de álcali que se va a añadir se puede controlar controlando el pH en el tanque de precipitación -1- con un sensor de pH -4- mientras se envía una señal desde el sensor a una bomba de control de suministro de álcali -5-. También en los casos en los que se utiliza amoníaco gaseoso, el pH puede ajustarse de manera similar mientras que la cantidad de gas se controla con una válvula. Se puede suministrar aire desde el tubo difusor -3- mientras se mezcla el líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica retenido en el tanque de precipitación -1-, para lograr un pH uniforme y para promover la precipitación de hidróxido magnésico.

El tanque de precipitación -1- puede estar equipado con un termostato -2-. El termostato -2- puede llevar a cabo la incubación o el enfriamiento y, preferentemente, se lleva a cabo el enfriamiento para hacer que la precipitación del hidróxido magnésico sea más probable. La temperatura para el enfriamiento no está limitada, siempre que el líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica no se congele. El tanque de precipitación -1- está conectado a un módulo de membrana de microfiltración -8- a través de una bomba de membrana de microfiltración -7-. La membrana de microfiltración mencionada anteriormente está dispuesta en el módulo de membrana de microfiltración -8-. El módulo de membrana de microfiltración -8- puede estar dotado de un suministro de aire comprimido -9- colocado dentro del módulo, para el lavado de la superficie de la membrana mediante aireación. Utilizando periódicamente el suministro de aire comprimido -9-, se pueden eliminar los componentes de suciedad adheridos o depositados sobre la superficie de la membrana de microfiltración.

El componente de filtrado desde el módulo de membrana de microfiltración -8- se recoge en un tanque de filtrado de MF -11-. El componente sólido separado en el lado primario del módulo de membrana de microfiltración -8- se descarga según sea apropiado. En los casos en los que el módulo de membrana de microfiltración -8- es una membrana de fibras huecas de tipo presión externa, se puede llevar a cabo un lavado inverso de la membrana de fibras huecas con el filtrado almacenado en el tanque de filtrado MF -11-, aplicando presión del lado del filtrado utilizando una bomba de lavado inverso -10-. En este caso, la membrana de fibras huecas de tipo de presión externa puede lavarse con una solución acuosa de ácido suministrada desde una tubería de suministro de ácido -12-, suministrando el ácido desde la tubería de suministro de ácido -12- a la tubería, cerrando una válvula de lavado -13-, y posteriormente aplicando presión con la bomba de lavado inverso -10-. Mediante el suministro del ácido, pueden eliminarse por disolución el hidróxido magnésico y similares precipitados sobre la superficie de la membrana del módulo de membrana de microfiltración -8- y en los canales. Mediante esto, se puede recuperar el flujo de filtración del módulo de membrana de microfiltración -8-. Se puede suministrar un material auxiliar al tanque de precipitación -1-. Cuando se añade un material auxiliar al líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica, en algunos casos se produce la generación de un precipitado insoluble. Al añadir de manera preliminar el material auxiliar al tanque de precipitación -1-, dicho precipitado se puede eliminar mediante el módulo de membrana de microfiltración -8-. Se puede suministrar un gas al tanque de precipitación -1-. En los casos en que el amoníaco gaseoso, que está en estado gaseoso, se alimenta como el álcali, de forma especialmente preferente, el amoníaco gaseoso se suministra desde el tubo difusor -3-.

La figura 6 es una vista lateral que ilustra otro ejemplo del aparato utilizado en el procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar de la presente invención. Este aparato es el mismo que el aparato mostrado en la figura 5, excepto que se incluye una línea -14- de retorno de flujo tangencial. En este aparato, se genera un flujo de líquido sobre la superficie de la membrana del módulo de membrana de microfiltración -8- mediante una bomba de membrana de microfiltración -7-, para permitir la filtración de flujo tangencial.

[Aparato de fermentación]

A continuación, se describe un aparato para producir un producto químico que utiliza el líquido que contiene azúcar de la presente invención como materia prima de fermentación.

La figura 7 es una vista lateral que ilustra un ejemplo de un aparato para producir un producto químico que utiliza el líquido que contiene azúcar de la presente invención como materia prima de fermentación.

En la figura 7, un aparato de fermentación -15- está dotado de un fermentador -21- y un agitador -19-. En el fermentador -15-, se coloca una incubadora -18- para el ajuste de la temperatura a una temperatura óptima para el cultivo del microorganismo utilizado. En particular, en los casos en los que la producción de fermentación del producto químico se lleva a cabo en condiciones aeróbicas, se puede controlar la cantidad de gas alimentado al fermentador -21- a través de un tubo de aireación -16- colocando un sensor de OD 17 en el fermentador -21- y midiendo el nivel de oxígeno disuelto durante la fermentación, mientras utiliza una señal del sensor para controlar una válvula. El gas se selecciona de nitrógeno, oxígeno, aire y similares. Puede proporcionarse un sensor de pH -20-, y las señales del sensor pueden utilizarse para controlar el suministro de un ácido desde un tanque de suministro de ácido -22- y la alimentación de un álcali desde un tanque de suministro de álcali -23-. El fermentador -21- puede estar dotado de un módulo de membrana de microfiltración -24- para la separación de las células microbianas de un producto químico producido en el líquido de cultivo. En el módulo de membrana de microfiltración -24-, la filtración de flujo tangencial se lleva a cabo preferentemente utilizando una bomba de flujo tangencial -25-. El filtrado del módulo de membrana de microfiltración -24- se recoge en un tanque de almacenamiento de filtrado de cultivo -26-. El caudal de líquido que contiene azúcar se controla preferentemente mediante un controlador de caudal de líquido que contiene azúcar -27-, de manera que la cantidad de líquido que contiene azúcar alimentada al fermentador -21- es la misma que la cantidad de filtrado de la membrana de microfiltración.

EJEMPLOS

Se describe a continuación el procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar de la presente invención de forma concreta, por medio de ejemplos. Sin embargo, la presente invención no queda limitada por estos ejemplos.

(Ejemplo de referencia 1) Medición de la concentración de azúcar

Las concentraciones de glucosa y xilosa contenidas en el líquido que contiene azúcar se midieron en las condiciones de HPLC descritas a continuación, basándose en la comparación con muestras patrón.

Columna: Luna NH2 (fabricada por Phenomenex, Inc.)
 Fase móvil: Milliq: acetonitrilo = 25:75 (caudal, 0,6 ml/minuto)
 Solución de reacción: ninguna
 Procedimiento de detección: RI (índice de refracción diferencial)
 Temperatura: 30°C

(Ejemplo de referencia 2) Producción de líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica 1

Como celulosa, se utilizó paja de arroz. La celulosa se sumergió en agua y se sometió a tratamiento utilizando un autoclave (fabricado por Nitto Koatsu Co., Ltd.) con agitación a una temperatura de 180°C durante 20 minutos. A continuación, se llevó a cabo la centrifugación (3.000 G) para separar el componente de solución (líquido tratado hidrotérmicamente) del sólido (fracción de celulosa). A cada uno de los líquidos tratados hidrotérmicamente y a la fracción de celulosa, se les añadió "Accellerase DUET" (concentración de enzima, 40 g/l), fabricada por Genencor (concentración final, 1 mg/l), seguido de la incubación a una temperatura de 50°C durante 24 horas para realizar la hidrólisis. Los productos de descomposición obtenidos del líquido tratado hidrotérmicamente y la fracción de celulosa se sometieron a separación sólido-líquido por centrifugación, y cada sobrenadante se filtró posteriormente a través de una membrana de microfiltración. La concentración de azúcar en cada uno de los productos de descomposición del líquido tratado hidrotérmicamente y la fracción de celulosa se midió de acuerdo con el ejemplo de referencia 1. Los resultados se resumen en la tabla 1 y la tabla 2.

El enriquecimiento de azúcar a través de una membrana de nanofiltración se llevó a cabo con los productos de descomposición de la fracción de celulosa y el líquido tratado hidrotérmicamente, para obtener el líquido que contiene azúcar concentrado 1 y el líquido que contiene azúcar concentrado 2. Como membrana de nanofiltración, se cortó y utilizó una membrana plana "UTC-60", que se utiliza en una membrana de nanofiltración fabricada por Toray Industries, Inc. "SU-610". La concentración de azúcar en cada uno de los hidrolizados y los líquidos que contienen azúcar de biomasa celulósica concentrados se midió de acuerdo con el ejemplo de referencia 1. Los resultados se muestran en la tabla 1 y la tabla 2. La turbidez (unidades nefelométricas de turbidez, NTU) de cada líquido que contiene azúcar se cuantificó utilizando un turbidímetro de laboratorio de alto rendimiento (2100N) fabricado por HACH. El pH del líquido que contiene azúcar concentrado 1 fue 4,8, y el pH del líquido que contiene azúcar concentrado 2 fue 3,8.

[Tabla 1]

	Glucosa (g/l)	Xilosa (g/l)	Turbidez (NTU)
Producto de descomposición de la fracción de celulosa	58	14	0
Líquido que contiene azúcar concentrado 1	180	41	0

[Tabla 2]

	Glucosa (g/l)	Xilosa (g/l)	Turbidez (NTU)
Producto de descomposición del líquido tratado hidrotérmicamente	2	12	0
Líquido que contiene azúcar concentrado 2	19	96	1

(Ejemplo de referencia 3) Producción de líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica 2

5 Los productos de descomposición de la fracción de celulosa y el líquido tratado hidrotérmicamente, preparados según el procedimiento descrito en el ejemplo de referencia 2, se concentraron a presión reducida, para obtener el líquido que contiene azúcar concentrado 3 y el líquido que contiene azúcar concentrado 4. La concentración a presión reducida se llevó a cabo utilizando un evaporador rotativo (fabricado por As One Corporation) a 80°C reduciendo la presión a 200 hPa, para llevar a cabo el enriquecimiento en azúcar. La concentración de azúcar y la turbidez de cada uno de los líquidos que contienen azúcar concentrados obtenidos se midieron de acuerdo con el ejemplo de referencia 2. Los resultados se muestran en la tabla 3.

[Tabla 3]

	Glucosa (g/l)	Xilosa (g/l)	Turbidez (NTU)
Líquido que contiene azúcar concentrado 3	139	35	5
Líquido que contiene azúcar concentrado 4	8	76	14

Las turbideces fueron más elevadas que las observadas en el ejemplo de referencia 2, en el que se llevó a cabo la concentración a través de una membrana. Se supone que esto se debe a la desnaturalización del azúcar por el calentamiento.

(Ejemplo 1) Ajuste del pH del líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica a, como mínimo, 8, mediante adición de álcali

Se ajustó el pH de cada uno de los líquidos concentrados de biomasa celulósica 1 y 2 preparados en el ejemplo de referencia 1 utilizando hidróxido sódico (1 N) a 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ó 13. Los líquidos que contienen azúcar después del ajuste a los pH predeterminados se dejaron reposar durante 1 hora a una temperatura de 25°C. Posteriormente, se midió la turbidez (unidades nefelométricas de turbidez, NTU). La turbidez de cada líquido que contiene azúcar se cuantificó utilizando un turbidímetro de laboratorio de alto rendimiento (2100N) fabricado por HACH. Los resultados se muestran en la tabla 4. La turbidez de cada líquido que contiene azúcar antes del ajuste del pH fue de 0 (cero) NTU.

[Tabla 4]

pH	No tratado	6	7	8	9	10	11	12	13
Líquido que contiene azúcar concentrado 1	0	3	10	14	27	32	52	52	56
Líquido que contiene azúcar concentrado 2	1	1	12	16	86	154	178	183	180
Líquido que contiene azúcar concentrado 3	5	7	20	28	35	49	65	68	64
Líquido que contiene azúcar concentrado 4	14	14	27	36	97	204	234	245	250

Se descubrieron turbideces notablemente mayores en todos los líquidos de azúcar concentrados (1 a 4) a pH de, como mínimo, 7 (no según la presente invención), especialmente a los pH de, como mínimo, 8 (según la presente invención). En particular, las turbideces de los líquidos que contienen azúcar concentrados 2 y 4, que se obtuvieron a partir de líquidos tratados hidrotérmicamente, alcanzaron finalmente valores más altos en comparación con las turbideces de los líquidos que contienen azúcar concentrados 1 y 3. Sobre la base de la comparación de las turbideces entre los líquidos que contienen azúcar concentrados 1 y 2 y los líquidos que contienen azúcar concentrados 3 y 4, se descubrió que la concentración por evaporación permite que la turbidez del líquido que contiene azúcar alcance finalmente un valor más elevado.

(Ejemplo 2) Análisis por cromatografía iónica de sustancias insolubles

El pH del líquido que contiene azúcar concentrado 1 obtenido en el ejemplo 1 se ajustó a 10, y el líquido que contiene azúcar resultante se dejó en reposo durante 1 hora, seguido de centrifugación (15.000 rpm, 5 minutos) de 1 ml de la muestra para separar y recoger una sustancia insoluble como un precipitado. Al precipitado obtenido, se añadió 1 ml de solución acuosa de ácido sulfúrico 1 N para redissolver la sustancia insoluble. La solución resultante se sometió a continuación a análisis de cromatografía iónica (análisis de cationes) en las siguientes condiciones.

Condiciones de análisis:

Columna: Ion Pac AS22 (fabricada por DIONEX)
 Fase móvil: Na₂CO₃ 4,5 mM/NaHCO₃ 1,4 mM (caudal, 1,0 ml/minuto)
 Solución de reacción: ninguna
 Procedimiento de detección: conductividad eléctrica (mediante la utilización de una supresora)
 Temperatura: 30°C

El gráfico cromatográfico obtenido mediante el análisis anterior se muestra en la figura 3. Como resultado del análisis, se pudieron encontrar picos en las posiciones correspondientes al ion sodio (ion Na), ion potasio (ion K), ion magnesio (ion Mg) e ion calcio (ion Ca), y entre estos, se descubrió que el ion Mg estaba contenido en una cantidad extremadamente grande. Dado que se sabe que los álcalis y las sales formadas por el ion Na o el ion K tienen una solubilidad elevada incluso en condiciones alcalinas, se suponía que estos iones eran componentes disueltos en el líquido que contiene azúcar, que también contenía la sustancia insoluble. Por otro lado, se sabe que el ion Mg forma hidróxido magnésico (Mg(OH)₂) en condiciones alcalinas, y su producto de solubilidad (K_{sp}) es 1,2x10⁻¹². De este modo, este ion está especialmente insolubilizado en condiciones alcalinas. Es decir, se confirmó que la sustancia insoluble generada después del ajuste de pH contenía, como mínimo, magnesio (hidróxido magnésico) como componente.

(Ejemplo 3) Análisis del tamaño de partículas del componente insoluble que contiene magnesio

Utilizando 1 ml de la muestra en el ejemplo 3 preparado ajustando el pH del líquido que contiene azúcar concentrado 1 a 10 y dejando reposar el líquido que contiene azúcar resultante durante 1 hora, se llevó a cabo la medición del tamaño de partículas de la sustancia insoluble mediante el procedimiento de dispersión dinámica de la luz. (Otsuka Electronics Co. Ltd.). El número acumulativo se estableció en 100. Los resultados se muestran en la tabla 5.

[Tabla 5]

Tamaño de partículas (nm)	f (Is)
1446,31	0
1561,04	3,2
1684,88	7,3
1818,53	11,5
1962,79	14,4
2118,5	15,1
2286,55	13,3
2467,94	9,8
2663,71	5,6
2875,02	2,1
3103,08	0
3349,24	0

Se descubrió que los tamaños de partícula de la sustancia insoluble muestran una distribución centrada alrededor de 2.000 nm (2 µm).

(Ejemplo 4) Tratamiento con membrana de microfiltración de líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica después del ajuste del pH

Se ajustó a 10 el pH del líquido que contiene azúcar concentrado 1, el líquido que contiene azúcar concentrado 2, el líquido que contiene azúcar concentrado 3 y el líquido que contiene azúcar concentrado 4 preparados en el ejemplo de referencia 2 y ejemplo de referencia 3 utilizando amoniaco acuoso al 28% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y los líquidos que contienen azúcar resultantes se dejaron reposar durante 1 hora, para proporcionar soluciones acuosas que contienen azúcar (líquido que contiene azúcar concentrado 1A, líquido que contiene azúcar concentrado 2A, líquido que contiene azúcar concentrado 3A y líquido que contiene azúcar concentrado 4A). Utilizando cada solución acuosa que contiene azúcar como muestra de prueba (1 l), se realizó la filtración utilizando membranas de microfiltración que tenían diferentes tamaños promedio de poro. Los tipos y los diámetros promedio de poro de las membranas utilizadas se resumen en la tabla 6.

[Tabla 6]

Nombre del producto	Tamaño promedio de poro (μm)		Fabricante
MF-40	0,4	Filtro de membrana Yumicron (marca registrada)	Yuasa Co., Ltd.
MF-60	0,6		Yuasa Co., Ltd.
MF-90	0,9		Yuasa Co., Ltd.
MF-250	2,5		Yuasa Co., Ltd.
HVLP	0,4	Durapore (marca registrada)	MILLIPORE

5 La filtración de flujo tangencial se realizó suministrando cada uno de los líquidos que contienen azúcar concentrados 1A a 4A a una presión de 30 kPa a una temperatura de 25°C, y se intentó recoger 0,5 l de una solución de azúcar del lado del permeado de la membrana. La filtración de flujo tangencial se llevó a cabo ajustando cada membrana de microfiltración de modo que la velocidad lineal de la superficie de la membrana fuera de 30 cm/s y el flujo de permeación de la membrana fue de 0,1 m/día. Como resultado, todos los líquidos que contienen azúcar concentrados mostraron, solo en los casos en los que se utilizó MF-250, disminuciones en las velocidades de filtración en relación con los observados inmediatamente después de la filtración, y la filtración resultó imposible después de la recolección de, aproximadamente, 100 ml de la solución que contiene azúcar. Se supuso que esto se debía a que la entrada de partículas de sustancias insolubles en los poros de la membrana de microfiltración provocaba incrustaciones, ya que el tamaño promedio de poros de MF-250, 2,5 μm , era cercano al tamaño de partícula promedio, 2 μm de la sustancia insoluble generada en el líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica. Por otro lado, con las membranas de microfiltración con tamaños de partícula promedio de 0,4 μm a 0,9 μm , no se produjo obstrucción de las membranas y se pudo completar la filtración de 0,5 l del líquido que contiene azúcar. Como resultado de la medición de la turbidez de cada filtrado, se descubrió que la turbidez era 0 (cero) NTU para todas las membranas excepto para la MF-250.

20 (Ejemplo 5) Producción fermentativa de etanol utilizando líquido que contiene azúcar como materia prima de fermentación

25 Se utilizaron los filtrados obtenidos utilizando la membrana de microfiltración (HVLP) en el ejemplo 4 (el líquido que contiene azúcar 1 y el líquido que contiene azúcar 3) para llevar a cabo pruebas de fermentación de etanol utilizando una levadura (*Saccharomyces cerevisiae* OC-2: levadura de vino).

30 Se precultivó la levadura anterior utilizando medio YPD (2% de glucosa, 1% de extracto de levadura (Bacto Yeast Extract/BD) y 2% de polipeptona (Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.)) durante 1 día a una temperatura de 25°C. Los pH del líquido que contiene azúcar concentrado 1 y el líquido que contiene azúcar concentrado 3 se ajustaron a 6 utilizando ácido sulfúrico 1 N, y los líquidos de azúcar resultantes se diluyeron a las concentraciones de azúcar mostradas en la tabla 7 utilizando agua estéril antes de su utilización. A estos líquidos que contienen azúcar concentrados, se añadió el líquido precultivado al 5%. Después de la adición de la levadura, la incubación se llevó a cabo a una temperatura de 25°C durante 35 horas. Las concentraciones de etanol acumuladas en los líquidos de cultivo obtenidos mediante esta operación se cuantificaron por cromatografía de gases. La evaluación se llevó a cabo mediante detección y cálculo con un detector de ionización de sal hidrógeno utilizando el dispositivo Shimadzu GC-2010 GC Capilar TC-1 (GL Science) 15 metros L x 0,53 mm DI, df 1,5 μm . Los resultados de medición obtenidos se muestran en la tabla 7.

40 [Tabla 7]

	Glucosa (g/l)	Xilosa (g/l)	Etanol (g/l)
Líquido que contiene azúcar 1	45	10	18
Líquido que contiene azúcar 3	45	11	12

45 Se descubrió que el etanol puede producirse con el líquido que contiene azúcar 1 o el líquido que contiene azúcar 3. El líquido que contiene azúcar 3 mostró una menor productividad de etanol que el líquido que contiene azúcar 1.

(Ejemplo comparativo 1) Producción fermentativa de etanol utilizando líquido que contiene azúcar como materia prima de fermentación 2

50 Para comparación, se utilizaron los líquidos de azúcar antes de la filtración a través de la membrana de microfiltración del ejemplo 4 (el líquido concentrado que contiene azúcar 1A y el líquido concentrado de azúcar 3A

en el ejemplo 4, para los cuales solo se realizó el ajuste de pH) para realizar pruebas de fermentación de etanol según el ejemplo 5. Los resultados se muestran en la tabla 8. Se descubrió que las concentraciones de etanol acumuladas en los líquidos de cultivo obtenidos eran inferiores a las observadas utilizando los líquidos de azúcar de la presente invención en el Ejemplo 5, que se trataron con la membrana de microfiltración.

5

[Tabla 8]

	Glucosa (g/l)	Xilosa (g/l)	Etanol (g/l)
Líquido que contiene azúcar concentrado 1A	45	10	13
Líquido que contiene azúcar concentrado 3A	45	11	10

(Ejemplo 6) Producción fermentativa de ácido láctico utilizando líquido que contiene azúcar como materia prima de fermentación

10

Utilizando los filtrados obtenidos en el ejemplo 4 utilizando una membrana de microfiltración (HVLP) (el líquido que contiene azúcar concentrado 1 y el líquido que contiene azúcar concentrado 3) y la cepa de *Lactococcus lactis* JCM7638, se estudió la producción fermentativa de ácido láctico.

15

Para la bacteria de ácido láctico anterior, se ajustó el pH del líquido que contiene azúcar concentrado 1 y el líquido que contiene azúcar concentrado 3 a 6 utilizando ácido sulfúrico 1 N, y los líquidos de azúcar resultantes se diluyeron con agua estéril hasta las concentraciones de azúcar mostradas en la tabla 9. A estos líquidos que contienen azúcar, se añadió un líquido precultivado que contenía la bacteria de ácido láctico al 5%. Después de la adición de una levadura, la incubación se llevó a cabo a una temperatura de 25°C durante 35 horas. El cultivo estático se realizó durante 24 horas a una temperatura de 37°C. La concentración de ácido L-láctico contenida en el líquido de cultivo se analizó en las siguientes condiciones.

20

Columna: Shim-Pack SPR-H (fabricada por Shimadzu Corporation)

25

Fase móvil: ácido p-toluenosulfónico 5 mM (caudal, 0,8 ml/min)

Solución de reacción: ácido p-toluenosulfónico 5 mM, Bis-Tris 20 mM, EDTA-2Na 0,1 mM (caudal, 0,8 ml/min)

Procedimiento de detección: conductividad eléctrica

Temperatura: 45°C

30

Los resultados de la fermentación de ácido L-láctico utilizando el líquido que contiene azúcar 1 y el líquido que contiene azúcar 3 se muestran en la tabla 9.

[Tabla 9]

	Glucosa (g/l)	Xilosa (g/l)	Ácido L-láctico (g/l)
Líquido que contiene azúcar 1	45	10	40
Líquido que contiene azúcar 3	45	11	30

35

Se descubrió que el ácido L-láctico se puede producir con el líquido que contiene azúcar 1 o el líquido que contiene azúcar 3. El líquido que contiene azúcar 3 mostró una productividad de ácido láctico menor que el líquido que contiene azúcar 1.

40

(Ejemplo comparativo 2) Producción fermentativa de ácido láctico utilizando líquido que contiene azúcar como materia prima de fermentación 2

Para comparación, se utilizaron los líquidos de azúcar antes de la filtración a través de la membrana de microfiltración en el ejemplo 4 (el líquido que contiene azúcar concentrado 1A y el líquido que contiene azúcar concentrado 3A, a los cuales solo se realizó el ajuste de pH) para realizar cultivo estático de la cepa de *Lactococcus lactis* JCM7638 durante 24 horas a una temperatura de 37°C. El procedimiento fue el mismo que en el ejemplo 6, excepto que los líquidos que contienen azúcar concentrados no se han sometido a microfiltración. Los resultados de la fermentación utilizando el líquido que contiene azúcar concentrado 1A y el líquido que contiene azúcar concentrado 3A se muestran en la tabla 10. Se observaron concentraciones más bajas de ácido L-láctico que en el ejemplo 6.

50

[Tabla 10]

	Glucosa (g/l)	Xilosa (g/l)	Ácido L-láctico (g/l)
Líquido que contiene azúcar concentrado 1A	45	10	32
Líquido que contiene azúcar concentrado 3A	45	11	28

(Ejemplo 7) Filtración a través de membrana de microfiltración de fibras huecas y lavado de membrana de fibras huecas

5 Se utilizó el líquido que contiene azúcar en el ejemplo 4 antes de la filtración a través de la membrana de microfiltración (el líquido que contiene azúcar concentrado 1AA) para realizar la filtración a través de una membrana de ultrafiltración de fibras huecas con un tamaño de poro promedio de 0,08 μm ("TORAYFIL" (marca registrada) HFS, por Toray Industries, Inc.). TORAYFIL HFS es una membrana de fibras huecas de PVDF de tipo de presión externa, en la que se filtra una solución desde el lado externo al lado interno de las fibras huecas. TORAYFIL HFS se cortó en una pieza de 10 cm, y un extremo de la membrana se selló utilizando un adhesivo de silicona. En el otro extremo, se unió un tubo de silicona (Laboran, 2 x 4) utilizando el adhesivo anterior, para proporcionar un módulo de membrana simplificado (figura 4). En la figura 4, el tubo de silicona -28- está conectado a la membrana de microfiltración de fibras huecas -30- con el adhesivo de silicona -29-, de manera que puede filtrarse una solución fuera de la membrana de microfiltración de fibras huecas mediante la reducción de la presión en la membrana de microfiltración de fibras huecas -30-. Un extremo de la membrana de microfiltración de fibras huecas -30- se selló con el adhesivo de silicona -29-.

El flujo de filtración inicial se ajustó a 1 m/día y se llevó a cabo la filtración durante 24 horas. Como resultado, se obtuvieron aproximadamente 100 ml de un filtrado.

20 Como resultado de la medición del flujo de la membrana después de 24 horas de la filtración, se descubrió que el flujo de la membrana había disminuido a 0,2 m/día. Al tubo de silicona, se le conectó una solución acuosa de ácido sulfúrico 1 N, y se llevó a cabo un lavado inverso desde el interior hacia el exterior de las fibras huecas a un flujo de membrana de 0,1 m/día. Posteriormente, el módulo de membrana simplificado se lavó bien con agua de RO y se reinició la filtración del líquido que contiene azúcar concentrado. Como resultado de la medición del flujo de filtración en este momento, se pudo confirmar que el flujo de filtración se había recuperado a 1 m/día.

(Ejemplo 8) Filtración del líquido de cultivo a través de una membrana de microfiltración de fibras huecas

30 Utilizando el módulo de fibras huecas simplificado preparado en el ejemplo 7, se filtraron el líquido de cultivo 1 obtenido después del cultivo del líquido que contiene azúcar 1 del ejemplo 6, y el líquido de cultivo 1A obtenido después del cultivo del líquido que contiene azúcar 1A del ejemplo de referencia 2 y se evaluó el rendimiento de separación del producto, una solución acuosa de ácido láctico, de las células microbianas (bacteria de ácido láctico).

35 La separación se llevó a cabo colocando el módulo simplificado de fibras huecas del ejemplo 7 en un vaso de precipitados que contenía 100 ml de cada líquido de cultivo, colocando una barra de agitación magnética en el vaso de precipitados, y realizando la filtración con agitación a 100 rpm utilizando un agitador. El flujo de filtración inicial se estableció en 0,5 m/día cuando se inició la filtración. En el caso del líquido de cultivo 1A, la filtración se hizo imposible 20 minutos después del inicio. En el caso del líquido de cultivo 1, la filtración pudo continuar durante, como mínimo, 2 horas, y se pudieron obtener 8 ml de un filtrado (solución acuosa de ácido láctico). Es decir, se demostró que, en la producción del producto químico (ácido láctico), la utilización del líquido que contiene azúcar concentrado obtenido mediante la presente invención (líquido que contiene azúcar concentrado 1) es más preferente para la separación (separación de membrana) del producto de fermentación (solución acuosa de ácido láctico) del líquido de cultivo después de la fermentación.

45 (Ejemplo 9) Fermentación continua de ácido L-láctico

Utilizando el aparato de cultivo continuo, descrito en el documento JP 2008-237213 A (figura 2) junto con el filtrado obtenido utilizando la membrana de microfiltración (HVLP) en el ejemplo 4 (líquido que contiene azúcar 1) o el líquido que contiene azúcar concentrado antes de la filtración a través de la membrana de microfiltración en ejemplo 5 (líquido que contiene azúcar concentrado 1A), se llevó a cabo la fermentación continua con la bacteria de ácido láctico descrita en el ejemplo 7. Como resultado, en el caso del líquido que contiene azúcar concentrado 1A, se descubrió obstrucción de la membrana y el cultivo se hizo imposible después de 200 horas del cultivo. Por otro lado, en el caso del líquido que contiene azúcar 1, que se trató con la membrana de microfiltración, el cultivo continuo fue posible durante, como mínimo, 500 horas. Es decir, se pudo confirmar que un líquido que contiene azúcar producido mediante la presente invención se puede utilizar preferentemente como un líquido que contiene azúcar a utilizar para cultivo continuo.

DESCRIPCIÓN DE SÍMBOLOS

- 60 1. Tanque de precipitación
 2. Termostato
 3. Tubo difusor
 4. Sensor de pH
 5. Bomba de suministro de álcali
 65 6. Tanque de almacenamiento de álcali
 7. Bomba de la membrana de microfiltración

- 8. Módulo de la membrana de microfiltración
- 9. Suministro de aire comprimido
- 10. Bomba de lavado inverso
- 11. Tanque de filtrado MF
- 5 12. Línea de suministro de ácido
- 13. Válvula de lavado
- 14. Línea de retorno de flujo tangencial
- 15. Aparato de fermentación
- 16. Tubo de ventilación
- 10 17. Sensor de OD
- 18. Incubadora
- 19. Agitador
- 20. Sensor de pH (fermentación)
- 21. Fermentador
- 15 22. Tanque de suministro de ácido
- 23. Tanque de suministro de álcali
- 24. Módulo de membrana de microfiltración
- 25. Bomba de flujo tangencial
- 20 26. Tanque de almacenamiento de filtrado de cultivo
- 27. Controlador de caudal del líquido que contiene azúcar
- 28. Tubo de silicona
- 29. Adhesivo de silicona
- 30. Membrana de microfiltración de fibras huecas

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de: obtener un líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica mediante el tratamiento enzimático de una biomasa celulósica; añadir uno o más álcalis a dicho líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica para ajustar el pH a, como mínimo, 8, para precipitar una sustancia o sustancias insolubles que contienen, como mínimo, magnesio; y realizar la filtración a través de una membrana de microfiltración para eliminar dicha o dichas sustancias insolubles, para obtener un líquido que contiene azúcar como un permeado.
- 10 2. Procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según la reivindicación 1, en el que dicho líquido que contiene azúcar concentrado de biomasa celulósica es un líquido que contiene azúcar preparado mediante uno o más de los tratamientos seleccionados del grupo que comprende concentración mediante membrana, concentración a presión reducida y concentración por calentamiento.
- 15 3. Procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según la reivindicación 1 ó 2, en el que el tamaño promedio de poros de dicha membrana de microfiltración está dentro del intervalo de 0,01 μm a 1 μm .
- 20 4. Procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha membrana de microfiltración es una membrana de microfiltración de fibras huecas.
5. Procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se añaden adicionalmente uno o más aditivos seleccionados del grupo que comprende fuentes de nitrógeno, sales metálicas, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agentes antiespumantes y surfactantes.
- 25 6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo dicho procedimiento además cultivar un microorganismo utilizando, como materia prima de fermentación, un líquido que contiene azúcar obtenido mediante el procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 30 7. Procedimiento, según la reivindicación 6, para permitir la producción de un producto químico en un líquido de cultivo, a la vez que dicho microorganismo y dicho producto químico se filtran de forma continua o intermitente a través de una membrana de separación para recuperar dicho producto químico.

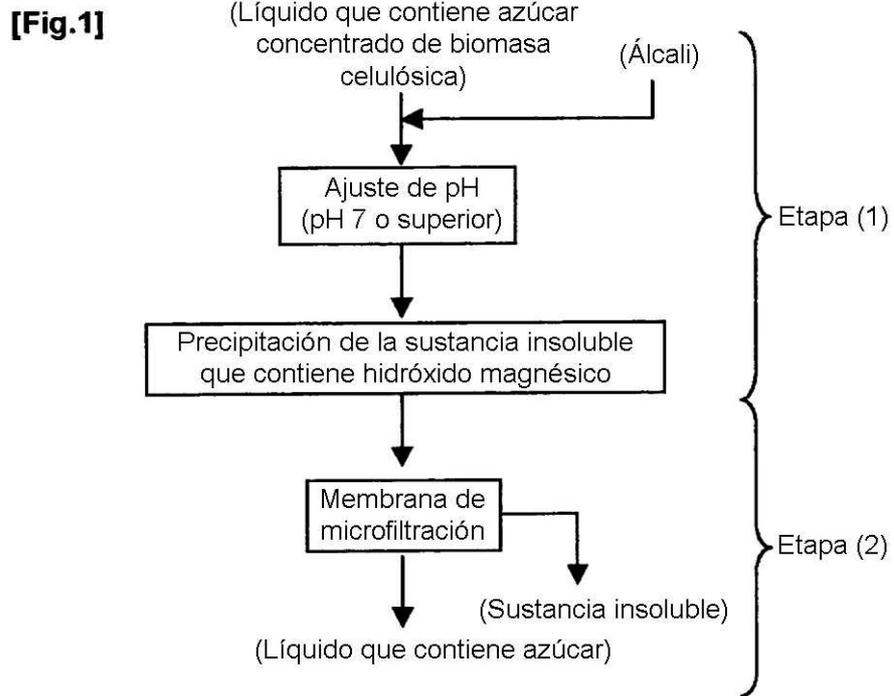


Fig.1

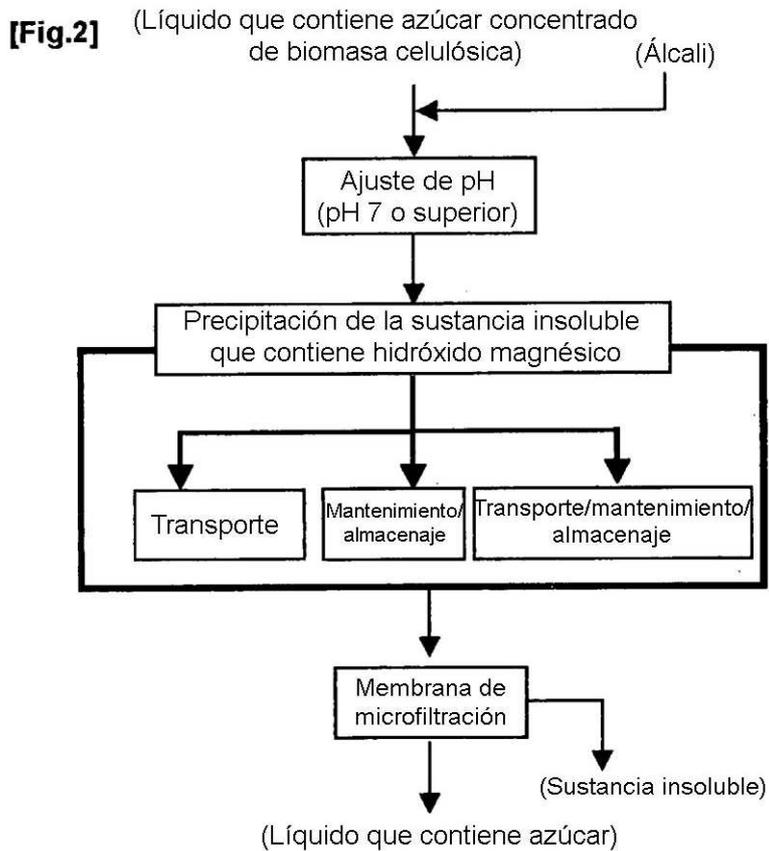


Fig.2

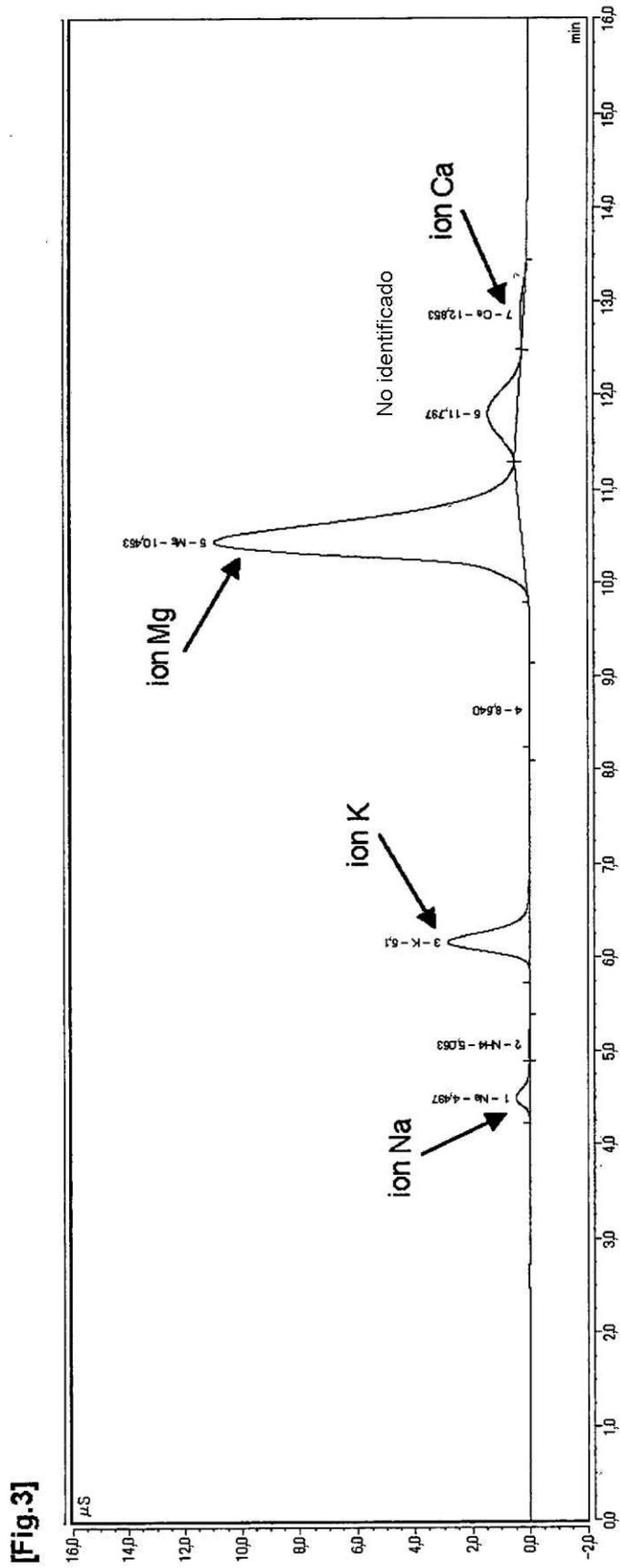


Fig.3

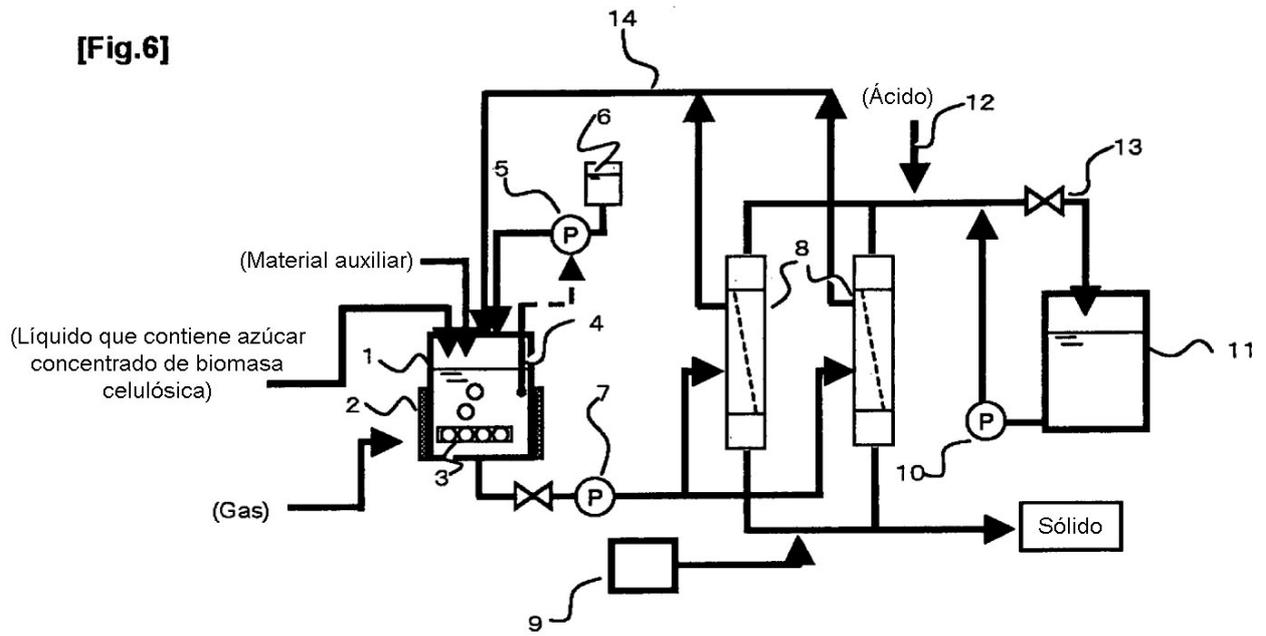
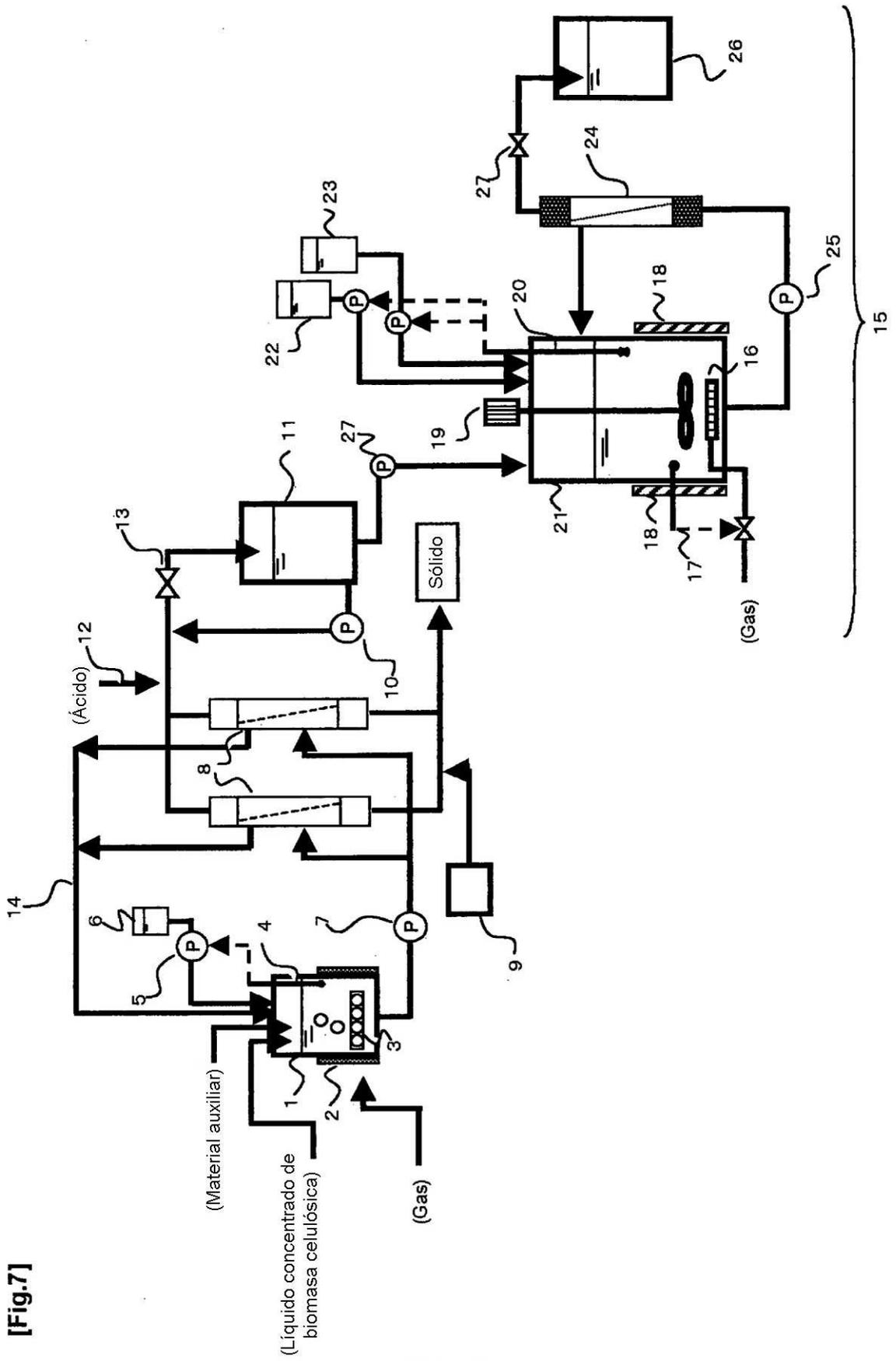


Fig.6



[Fig.7]

Fig.7