

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 821**

51 Int. Cl.:

C12P 19/14	(2006.01)
C12M 1/00	(2006.01)
C12M 1/06	(2006.01)
C12P 19/02	(2006.01)
C13K 1/02	(2006.01)
C13K 13/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2011 PCT/JP2011/055902**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2011 WO11115039**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2011 E 11756224 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2548965**

54 Título: **Procedimiento de fabricación de una solución de azúcar**

30 Prioridad:

15.03.2010 JP 2010057403

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

29.10.2018

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;
MINAMINO, ATSUSHI;
YAMAMOTO, YUKI y
YAMADA, KATSUSHIGE**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 687 821 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 de fabricación de una solución de azúcar

5 SECTOR TÉCNICO

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un líquido de azúcar a partir de celulosa.

10 TÉCNICA ANTERIOR

10 Se han utilizado procesos de producción por fermentación de productos químicos utilizando azúcares como materias primas para la producción de diversos materiales industriales. En la actualidad, como azúcares que se utilizan como materia prima para fermentación, se utilizan industrialmente los derivados de materiales alimentarios, tales como caña de azúcar, almidón y remolacha azucarera. Sin embargo, en vista del hecho de que se espera un aumento de los precios de los alimentos debido a un futuro aumento de la población mundial, o en una visión ética del hecho de que los azúcares como materiales industriales pueden competir con los azúcares para los alimentos, debe construirse en el futuro un proceso para la producción de manera eficaz de un líquido de azúcar a partir de un recurso no alimenticio renovable, es decir, una biomasa que contiene celulosa, o un proceso para utilizar un líquido de azúcar obtenido como materia prima de fermentación para convertir de manera eficaz el líquido de azúcar en un material industrial.

25 Entre los ejemplos de procedimientos descritos para la producción de un líquido de azúcar a partir de una biomasa que contiene celulosa se incluyen procedimientos para la producción de líquidos de azúcar mediante hidrólisis ácida de celulosa y hemicelulosa utilizando ácido sulfúrico concentrado (documentos de patente 1 y 2) y un procedimiento en el que una biomasa que contiene celulosa se somete a tratamiento de hidrólisis utilizando ácido sulfúrico diluido y, a continuación, se trata enzimáticamente con celulasa o similar para la producción de un líquido de azúcar (documento que no es de patente 1). Además, entre los ejemplos de procedimientos descritos que no utilizan ácido se incluye un procedimiento en el que una biomasa que contiene celulosa se hidroliza utilizando agua subcrítica a una temperatura de aproximadamente 250°C a 500°C para la producción de un líquido de azúcar (documento de patente 3), un procedimiento en el que una biomasa que contiene celulosa se somete a un tratamiento de agua subcrítica y, a continuación, se trata enzimáticamente para la producción de un líquido de azúcar (documento de patente 4) y un procedimiento en el que una biomasa que contiene celulosa se somete a un tratamiento de hidrólisis con agua caliente a presión a una temperatura de 240°C a 280°C y, a continuación, se trata enzimáticamente para la producción de un líquido de azúcar (documento de patente 5).

35 En los últimos años, se han estudiado ampliamente procedimientos de hidrólisis de una biomasa que utilizan menos energía y provocan menos carga ambiental, pero producen azúcar con altos rendimientos. Sin embargo, dichos procedimientos que utilizan enzimas tienen el inconveniente de que los costes de las enzimas son elevados.

40 Para resolver estos problemas técnicos, se han propuesto procedimientos de recuperación y reutilización de las enzimas utilizadas en la hidrólisis. Entre los ejemplos de dichos procedimientos descritos se incluye un procedimiento en el que se lleva a cabo una separación sólido-líquido continua con un filtro de centrifugación y el líquido de azúcar obtenido se filtra a través de una membrana de ultrafiltración para recuperar las enzimas (documento de patente 6), un procedimiento en el que se alimenta un surfactante a la etapa de sacarificación enzimática para suprimir la adsorción de la enzima y, por lo tanto, mejorar la eficacia de recuperación (documento de patente 7), un procedimiento en el que el residuo producido mediante sacarificación enzimática se somete a tratamiento eléctrico para recuperar el componente enzimático (documento de patente 8) y un procedimiento en el que el residuo producido mediante sacarificación enzimática se alimenta de nuevo a otro lote de biomasa y, de este modo, se reutilizan las enzimas (documento de patente 9). El documento de patente 10 da a conocer un procedimiento para la sacarificación de celulosas en el que se separa una solución obtenida después de la sacarificación degradativa de materiales celulósicos con celulasas en una parte líquida que contiene sacáridos y materia sólida. Las celulasas se recuperan de dicha parte líquida que contiene sacáridos, mientras que dicha materia sólida se trata con una solución acuosa de pH tamponado, o una solución acuosa, una solución acuosa alcohólica o una solución acuosa de pH tamponado de polisacáridos u oligosacáridos, o una solución acuosa o acuosa de pH tamponado de alcoholes para recuperar las celulasas en la materia sólida.

55 El documento que no es de patente 2 da a conocer el reciclaje de enzimas durante la hidrólisis en la alimentación por lotes de celulosa derivada de *Eucalyptus viminalis* sometida a explosión por vapor.

60 DOCUMENTOS DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Documentos de patente

65 Documento de patente 1: Solicitud de patente PCT japonesa traducida abierta a inspección pública No. 11-506934

Documento de patente 2: JP 2005-229821 A

Documento de patente 3: JP 2003-212888 A

Documento de patente 4: JP 2001-95597 A
 Documento de patente 5: JP 3041380 B
 Documento de patente 6: JP 2006-87319 A
 Documento de patente 7: JP 63-87994 A
 Documento de patente 8: JP 2008-206484 A
 Documento de Patente 9: JP 55-144885 A
 Documento de Patente 10: US-A-4.713.334

Documentos que no son de patente

Documento que no es de patente 1: A. Aden y otros. "Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover" NREL Technical Report (2002)

Documento que no es de patente 2: L. P. RAMOS y otros, APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY; PART A: ENZYME ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY, HUMANA PRESS INC, NUEVA YORK (199403), volumen 45-46, No. 1, páginas 193-207.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

PROBLEMAS A RESOLVER POR LA INVENCIÓN

Los procedimientos para la producción de líquidos de azúcar mediante la recuperación/reutilización de enzimas se han desarrollado, tal como se ha descrito anteriormente, pero los efectos de estos procedimientos han sido insuficientes en vista de la reducción de la cantidad de la enzima utilizada. Por lo tanto, la presente invención tiene como objetivo desarrollar un procedimiento en el que el efecto de reducir la cantidad de enzima sea mayor que el de los procedimientos convencionales.

MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS

Los presentes inventores estudiaron ampliamente resolver los problemas anteriores y, como resultado, inventaron un procedimiento de hidrólisis de celulosa utilizando una celulasa de un hongo filamentoso como carbohidrasa (también denominada en el presente documento: celulasa de un hongo filamentoso), cuyo procedimiento comprende: las etapas, tal como se definen en la reivindicación 1.

Es decir, la presente invención tiene los componentes (1) a (10) indicados a continuación.

(1) Un procedimiento para la producción de un líquido de azúcar mediante la utilización de celulasa de hongo filamentoso procedente de un hongo filamentoso, comprendiendo el procedimiento las etapas (a) a (f), tal como se definen en la reivindicación 1, en el que la celulasa de un hongo filamentoso es una composición de enzimas que comprende celobiohidrolasa, endoglucanasa, exoglucanasa, β -glucosidasa, xilanasas y xilosidasas.

(2) El procedimiento para la producción de un líquido de azúcar, según el punto (1), en el que la celulasa de un hongo filamentoso es celulasa de *Trichoderma*.

(3) El procedimiento para la producción de un líquido de azúcar, según los puntos (1) ó (2), en el que la celulosa deriva de una celulosa pretratada preparada mediante un tratamiento con amoníaco, un tratamiento hidrotérmico o un tratamiento con ácido sulfúrico diluido de la biomasa.

(4) El procedimiento para la producción de un líquido de azúcar, según cualquiera de los puntos (1) a (3), en el que la hidrólisis secundaria es una hidrólisis en presencia de uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en sales inorgánicas (con exclusión de las sales de calcio), disolventes orgánicos hidrófilos, aminoácidos y surfactantes no iónicos, y líquidos de azúcar que comprenden estas sustancias.

(5) El procedimiento para la producción de un líquido de azúcar, según el punto (4), en el que la sal o sales inorgánicas son una o más seleccionadas del grupo que consiste en sales de sodio, sales de potasio, sales de magnesio, sales de ácido sulfúrico, sales de amonio, sales de ácido clorhídrico, sales de ácido fosfórico, sales de ácido acético y sales de ácido nítrico, con exclusión de las sales de calcio.

(6) El procedimiento para la producción de un líquido de azúcar, según el punto (5), en el que la sal o sales inorgánicas son una o más seleccionadas del grupo que consiste en cloruro de sodio, acetato de sodio, sulfato de sodio, hidrogenosulfato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de amonio, hidrogenofosfato de dipotasio, sulfato de amonio, cloruro de magnesio y sulfato de magnesio.

(7) El procedimiento para la producción de un líquido de azúcar, según el punto (4), en el que el disolvente o disolventes orgánicos hidrófilos son uno o más seleccionados del grupo que consiste en metanol, etanol, 1-propanol, isopropanol, N,N-dimetilformamida, butanol, acetona, acetonitrilo, etilenglicol y glicerina.

(8) El procedimiento para la producción de un líquido de azúcar, según el punto (4), en el que el aminoácido o aminoácidos son uno o más seleccionados del grupo que consiste en arginina, cisteína, ácido glutámico, histidina y lisina.

(9) El procedimiento para la producción de un líquido de azúcar, según cualquiera de los puntos (1) a (8), en el que la separación sólido-líquido de un hidrolizado primario y/o un hidrolizado secundario es la filtración con prensado.

(10) El procedimiento para la producción de un líquido de azúcar, según cualquiera de los puntos (1) a (9), comprendiendo el procedimiento, además, la etapa (g) de filtrar el líquido de azúcar de la etapa (f) a través de una

membrana de ósmosis inversa y/o una membrana de nanofiltración para concentrar el líquido de azúcar.

EFFECTO DE LA INVENCION

5 En la presente invención, la hidrólisis primaria va seguida de una separación sólido-líquido, y los componentes enzimáticos residuales contenidos en los sólidos obtenidos se utilizan para realizar la hidrólisis secundaria. Esto produce 1) un efecto para aumentar la producción de azúcar y 2) un efecto para aumentar la cantidad recuperada de enzima. Por lo tanto, la presente invención es económicamente ventajosa sobre las técnicas convencionales.

10 BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra una realización del procedimiento de la presente invención para la producción de un líquido de azúcar.

15 La figura 2 es un diagrama esquemático que muestra una realización de un aparato para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención para la producción de un líquido de azúcar.

La figura 3 es un diagrama esquemático que muestra una realización de un aparato para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención para la producción de un líquido de azúcar.

20 La figura 4 es un diagrama esquemático que muestra una realización en la que la hidrólisis secundaria en el procedimiento de la presente invención para la producción de un líquido de azúcar se lleva a cabo en una cámara de filtración con prensado.

La figura 5 es un diagrama esquemático que muestra una realización de un aparato para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención para la producción de un líquido de azúcar.

25 La figura 6 es un diagrama esquemático que muestra una realización de un aparato para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención para la producción de un líquido de azúcar.

La figura 7 es un diagrama esquemático que muestra una realización en la que la hidrólisis secundaria en el procedimiento de la presente invención para la producción de un líquido de azúcar se lleva a cabo en una cámara de filtración con prensado.

30 La figura 8 es un diagrama esquemático que muestra una realización de un aparato para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención para la producción de un líquido de azúcar.

La figura 9 es un diagrama que muestra los resultados del análisis de una enzima contenida en el líquido de azúcar secundario obtenido mediante el procedimiento de la presente invención para la producción de un líquido de azúcar.

35 La figura 10 es un diagrama esquemático que muestra una realización en la que la hidrólisis secundaria en el procedimiento de la presente invención para la producción de un líquido de azúcar se lleva a cabo en un tanque de hidrólisis secundaria que está separado del tanque para la hidrólisis primaria.

La figura 11 es un diagrama esquemático que muestra una realización en la que la hidrólisis secundaria en el procedimiento de la presente invención para la producción de un líquido de azúcar se lleva a cabo en un tanque de hidrólisis secundaria que está separado del tanque para la hidrólisis primaria.

40 La figura 12 es un diagrama esquemático que muestra una realización en la que la hidrólisis secundaria en el procedimiento de la presente invención para la producción de un líquido de azúcar se lleva a cabo en un tanque de hidrólisis secundaria que está separado del tanque para la hidrólisis primaria.

La figura 13 es un diagrama esquemático que muestra una realización en la que la hidrólisis primaria y la hidrólisis secundaria en el procedimiento de la presente invención para la producción de un líquido de azúcar se llevan a cabo en el mismo tanque.

45 La figura 14 es un diagrama esquemático que muestra una realización en la que un dispositivo de membrana de microfiltración está colocado aguas arriba de un dispositivo de membrana de ultrafiltración.

La figura 15 es un diagrama esquemático que muestra una realización en la que la filtración de flujo cruzado se lleva a cabo utilizando un módulo de membrana de microfiltración.

50 La figura 16 es un diagrama esquemático que muestra una realización en la que la filtración en línea ("dead-end") se lleva a cabo utilizando un módulo de membrana de microfiltración.

MODO OPTIMO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

Grandes cantidades de celulosas están contenidas en biomásas herbáceas, tales como bagazo, pasto varilla, hierba de napier, *Erianthus*, rastrojo de maíz, paja de arroz y paja de trigo; y biomásas leñosas, tales como árboles y materiales de construcción de desecho. Estas biomásas que contienen celulosa se pueden utilizar, de manera preferente, como materias primas en la presente invención.

60 La biomasa que contiene celulosa contiene, además de celulosa y hemicelulosa (en lo sucesivo denominada "celulosa" como término general para la celulosa y la hemicelulosa), lignina y similares, que son macromoléculas aromáticas. Por lo tanto, en los casos en que se utiliza celulosa derivada de una biomasa como materia prima para un líquido de azúcar en el procedimiento de la presente invención para la producción de un líquido de azúcar, la eficacia de la hidrólisis enzimática puede mejorarse mediante un pretratamiento. Entre los ejemplos del procedimiento de pretratamiento de una biomasa que contiene celulosa se incluyen tratamiento ácido, tratamiento con ácido sulfúrico, tratamiento con ácido sulfúrico diluido, tratamiento alcalino, tratamiento con sosa cáustica, tratamiento con amoníaco, tratamiento hidrotérmico, tratamiento con agua subcrítica, tratamiento de pulverización y tratamiento con vapor. En la presente invención, el procedimiento de pretratamiento es, de manera preferente,

tratamiento con amoníaco, tratamiento hidrotérmico o tratamiento con ácido sulfúrico diluido.

El tratamiento con amoníaco se lleva a cabo según los documentos JP 2008-161125 A y JP 2008-535664 A. Por ejemplo, el amoníaco se añade a la biomasa a una concentración dentro del intervalo del 0,1% al 15% en peso y el tratamiento se lleva a cabo a una temperatura de 4°C a 200°C, de manera preferente, de 90°C a 150°C. El amoníaco que se añade puede estar en estado líquido o gaseoso. Además, la forma del amoníaco que se añade puede ser amoníaco puro o amoníaco acuoso. El número de veces del tratamiento no está limitado y el tratamiento se puede llevar a cabo 1 o más veces. En particular, en los casos en que el tratamiento se lleva a cabo 2 o más veces, las condiciones para el primer tratamiento pueden ser diferentes de las del segundo y posteriores tratamientos. El producto tratado obtenido mediante el tratamiento con amoníaco debe someterse a la neutralización del amoníaco o la eliminación del amoníaco a efectos de llevar a cabo adicionalmente la reacción de hidrólisis enzimática. La neutralización del amoníaco puede llevarse a cabo después de la extracción de los sólidos del hidrolizado mediante la separación sólido-líquido o en el estado en el que están contenidos los sólidos. El reactivo ácido que se utiliza para la neutralización no está limitado. El amoníaco se puede eliminar mediante el mantenimiento del producto tratado con amoníaco bajo presión reducida para permitir la evaporación del amoníaco en estado gaseoso. El amoníaco eliminado se puede recuperar y reutilizar.

En el caso de tratamiento con ácido sulfúrico diluido, la concentración de ácido sulfúrico es, de manera preferente, del 0,1% al 15% en peso, de manera más preferente, del 0,5% al 5% en peso. La temperatura de reacción puede ajustarse dentro del intervalo de 100°C a 300°C y se ajusta, de manera preferente, dentro del intervalo de 120°C a 250°C. El tiempo de reacción puede ajustarse dentro del intervalo de 1 segundo a 60 minutos. El número de veces del tratamiento no está limitado y el tratamiento se puede llevar a cabo 1 o más veces. En particular, en los casos en que el tratamiento se lleva a cabo 2 o más veces, las condiciones para el primer tratamiento pueden ser diferentes de las del segundo y posteriores tratamientos. Dado que el hidrolizado obtenido mediante el tratamiento con ácido sulfúrico diluido contiene ácido, es necesaria la neutralización a efectos de llevar a cabo adicionalmente la reacción de hidrólisis con celulasa o a efectos de utilizar el hidrolizado como materia prima de fermentación.

En el caso de tratamiento hidrotérmico, se añade agua de manera que la biomasa que contiene celulosa está contenida en del 0,1% al 50% en peso, y el tratamiento se lleva a cabo entonces a una temperatura de 100°C a 400°C durante de 1 segundo a 60 minutos. Al realizar el tratamiento bajo dichas condiciones de temperatura, se produce la hidrólisis de la celulosa. El número de veces del tratamiento no está limitado y el tratamiento se puede llevar a cabo 1 o más veces. En particular, en los casos en que el tratamiento se lleva a cabo 2 o más veces, las condiciones para el primer tratamiento pueden ser diferentes de las del segundo y posteriores tratamientos.

La celulasa utilizada en la presente invención es celulasa de un hongo filamentoso. Entre los ejemplos de los hongos filamentosos se incluyen microorganismos, tales como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Humicola*, *Acremonium*, *Irpex*, *Mucor* y *Talaromyces*. Dado que estos microorganismos secretan celulasa en el medio de cultivo, el medio de cultivo se puede utilizar como tal como celulasa no purificada de un hongo filamentoso, o el medio de cultivo puede purificarse y formularse para utilizarse como una mezcla que contiene celulasa de un hongo filamentoso. En los casos en que se utiliza la celulasa de un hongo filamentoso como un producto purificado y formulado, se pueden añadir una sustancia o sustancias distintas de la enzima, tales como un inhibidor de proteasa, dispersante, solubilizante y/o estabilizador para preparar la formulación de celulasa.

La celulasa de un hongo filamentoso utilizada en la presente invención es, de manera preferente, celulasa producida por *Trichoderma* (en lo sucesivo denominada celulasa de *Trichoderma*). En la presente invención, la celulasa de *Trichoderma* es, de manera preferente, celulasa derivada de *Trichoderma reesei*, y entre los ejemplos específicos de microorganismos de *Trichoderma* preferidos de los que derivará la celulasa se incluyen *Trichoderma reesei* QM9414, *Trichoderma reesei* QM9123, *Trichoderma reesei* RutC-30, *Trichoderma reesei* PC3-7, *Trichoderma reesei* CL-847, *Trichoderma reesei* MCG77, *Trichoderma reesei* MCG80 y *Trichoderma viride* QM9123 (*Trichoderma viride* QM9123). La celulasa también puede derivar de una cepa mutante originada del microorganismo *Trichoderma* anteriormente descrito, cepa mutante que se preparó mediante mutagénesis utilizando un mutágeno, irradiación UV o similares para mejorar la productividad de celulasa.

La celulasa de un hongo filamentoso es una composición enzimática que comprende celobiohidrolasa, endoglucanasa, exoglucanasa, β -glucosidasa, xilanasas y xilosidasas, composición enzimática que tiene una actividad para hidrolizar y sacarificar celulosa. Dado que la celulasa de un hongo filamentoso comprende dicha pluralidad de componentes enzimáticos y permite, en la degradación de la celulosa, la hidrólisis eficaz de la celulosa debido a su efecto concertado o efecto complementario, se utiliza, de manera preferente, en la presente invención, la celulasa de un hongo filamentoso.

La celobiohidrolasa es un término general para las celulasas que hidrolizan la celulosa de las partes terminales. El grupo de enzimas que pertenecen a celobiohidrolasa se describen como el número EC: EC 3.2.1.91.

La endoglucanasa es un término general para las celulasas que hidrolizan las cadenas moleculares de celulosa de sus partes centrales. El grupo de enzimas que pertenecen a endoglucanasa se describen como el número EC: EC 3.2.1.4.

La exoglucanasa es un término general para las celulasas que hidrolizan las cadenas moleculares de celulosa de sus partes terminales. El grupo de enzimas que pertenecen a exoglucanasa se describen como el número EC: EC 3.2.1.74.

5 La β -glucosidasa es un término general para las celulasas que actúan sobre celooligosacáridos o celobiosa. El grupo de enzimas que pertenecen a β -glucosidasa se describen como el número EC: EC 3.2.1.21.

10 La xilanasa es un término general para las celulasas que actúan sobre hemicelulosa o, especialmente, xilano. El grupo de enzimas que pertenecen a la xilanasa se describen como el número EC: EC 3.2.1.8.

La xilosidasa es un término general para las celulasas que actúan sobre xilooligosacáridos. El grupo de enzimas que pertenecen a xilosidasa se describen como el número EC: EC 3.2.1.37.

15 Dichos componentes de celulasa de un hongo filamentoso se pueden separar mediante un procedimiento conocido, tal como filtración en gel, intercambio de iones o electroforesis bidimensional, y los componentes separados se pueden someter a un análisis de la secuencia de aminoácidos (análisis N-terminal, análisis C-terminal o espectrometría de masas), seguido de la comparación de las secuencias con una base de datos.

20 La actividad enzimática de celulasa de un hongo filamentoso se puede evaluar en base a sus actividades hidrolíticas sobre polisacáridos, tales como la actividad de degradación de Avicel, la actividad de degradación de la carboximetil celulosa (CMC), la actividad de degradación de celobiosa, la actividad de degradación de xilano y la actividad de degradación de manano. Los principales componentes de celulasa implicados en la actividad de degradación de Avicel son la celobiohidrolasa y la exoglucanasa, que degradan la celulosa a partir de sus partes terminales. Los principales componentes de celulasa implicados en la actividad de degradación de xilano son la xilanasa y la xilosidasa. El principal componente de celulasa implicado en la actividad de degradación de celobiosa es la β -glucosidasa. Los principales componentes de celulasa implicados en la actividad de degradación de CMC son la celobiohidrolasa, la exoglucanasa y la endoglucanasa. El término "principal" en el presente documento se utiliza para significar que el componente o componentes están implicados en la degradación en un grado máximo, aunque otros componentes de enzimas también estén implicados en la degradación.

30 Como la celulasa de un hongo filamentoso, se utiliza, de manera preferente, un producto enzimático en bruto. El producto enzimático en bruto deriva del sobrenadante de cultivo obtenido después de cultivar un microorganismo que pertenece a un género de hongo filamentoso durante un periodo arbitrario en un medio preparado, de manera que el microorganismo produce celulasa. Los componentes del medio que se utiliza no están limitados, y se puede utilizar, en general, un medio complementado con celulosa a efectos de promover la producción de la celulasa. Como un producto enzimático en bruto, el líquido de cultivo se puede utilizar tal como es, o se puede utilizar, de manera preferente, el sobrenadante de cultivo procesado solamente mediante la extracción del hongo filamentoso.

35 Las relaciones en peso de los componentes enzimáticos en el producto enzimático en bruto no están limitadas, y, por ejemplo, el líquido de cultivo derivado de *Trichoderma reesei* contiene del 50% al 95% en peso de celobiohidrolasa y también contiene como otros componentes endoglucanasa, β -glucosidasa, exoglucanasa, xilanasa y xilosidasa.

40 Los microorganismos que pertenecen a *Trichoderma* producen componentes de celulasa fuertes en el líquido de cultivo, mientras que la actividad de la β -glucosidasa en el líquido de cultivo es baja, ya que la β -glucosidasa es retenida en las células o sobre las superficies celulares. Por lo tanto, la β -glucosidasa de una especie diferente o de la misma especie se puede añadir al producto enzimático en bruto. Como la β -glucosidasa de una especie diferente, se puede utilizar, de manera preferente, la β -glucosidasa derivada de *Aspergillus*. Entre los ejemplos de la β -glucosidasa derivada de *Aspergillus* se incluye Novozyme 188, que está disponible comercialmente de Novozyme. El procedimiento de adición de la β -glucosidasa de una especie diferente o de la misma especie al producto enzimático en bruto puede ser un procedimiento en el que se introduce un gen en un microorganismo que pertenece a *Trichoderma* para llevar a cabo la recombinación genética del microorganismo, de manera que la β -glucosidasa es producida en el líquido de cultivo, y, a continuación, se cultiva el microorganismo que pertenece a *Trichoderma*, seguido por el aislamiento del líquido de cultivo.

45 En la presente invención, la hidrólisis de la celulosa con la celulasa de un hongo filamentoso se lleva a cabo en dos etapas, es decir, la hidrólisis primaria y la hidrólisis secundaria. Las etapas se describen a continuación en orden.

60 La hidrólisis primaria en la presente invención significa que se añade carbohidrasa a la celulosa que no ha entrado en contacto con la carbohidrasa para llevar a cabo la hidrólisis. La enzima utilizada para la hidrólisis primaria puede ser la enzima fresca o recuperada mencionada más adelante y, en vista de la reducción de la cantidad de enzima utilizada, especialmente en la cantidad de enzima fresca utilizada, es preferente utilizar una mezcla de tanto la enzima recuperada como la enzima fresca.

La temperatura de reacción durante la hidrólisis primaria está, de manera preferente, dentro del intervalo de 40°C a 60°C, y, especialmente en los casos en que se utiliza celulasa de *Trichoderma*, la temperatura de reacción está, de manera más preferente, dentro del intervalo de 45°C a 55°C.

El tiempo de reacción de la hidrólisis primaria está, de manera preferente, dentro del intervalo de 2 horas a 200 horas. En los casos en que el tiempo de reacción es inferior a 2 horas, la producción de azúcar es insuficiente, lo cual no es preferente. Por otro lado, en los casos en que el tiempo de reacción es de más de 200 horas, la actividad enzimática disminuye, lo que no es preferente, ya que, en la hidrólisis secundaria mencionada más adelante, la producción de azúcar es insuficiente y la enzima no se puede recuperar.

El pH durante la hidrólisis primaria está, de manera preferente, dentro del intervalo de 4,0 a 5,5. En los casos en que se utiliza celulasa de *Trichoderma* como la celulasa de un hongo filamentoso, el pH óptimo de reacción es de 5,0, pero, especialmente en el caso de la hidrólisis primaria, el pH cambia durante la hidrólisis. Por lo tanto, es preferente llevar a cabo la hidrólisis mientras se mantiene un pH constante utilizando un ácido o alcali.

El hidrolizado primario contiene un líquido de azúcar primario y sólidos, y los sólidos contienen componentes de polisacáridos, tales como celulosa y hemicelulosa no degradadas, y componentes que no pueden ser degradados originalmente con carbohidrasa, tales como lignina. Además, una cantidad relativamente grande de celulasa de un hongo filamentoso está adherida a los sólidos. Por lo tanto, en la presente invención, a efectos de realizar la hidrólisis secundaria mencionada más adelante utilizando los componentes de polisacáridos y celulasa de un hongo filamentoso contenidos en los sólidos obtenidos mediante el hidrolizado primario, los sólidos obtenidos se recuperan mediante separación sólido-líquido. Entre los ejemplos del procedimiento de separación sólido-líquido se incluyen centrifugación y filtración con prensado, y, en la presente invención, es preferente la recuperación de los sólidos mediante filtración con prensado.

Una razón por la cual es preferente la filtración con prensado para la separación sólido-líquido es que 1) se puede conseguir una producción elevada de líquido de azúcar. La presente invención pretende conseguir una mejora de la recuperación de azúcar y la recuperación de enzimas en comparación con las de las técnicas convencionales. Por lo tanto, el procedimiento de separación sólido-líquido es, de manera preferente, aquel con el que pueden recuperarse de una vez mayores cantidades de componentes del líquido de azúcar. La recuperación de los componentes del líquido de azúcar mediante la separación sólido-líquido se puede mejorar especialmente mediante el aumento de la cantidad de agua que se añade después de la hidrólisis secundaria. Sin embargo, un aumento de la cantidad de agua que se añade provoca una disminución de la concentración de azúcar en el líquido de azúcar secundario, lo cual no es preferente. Por lo tanto, en vista de la supresión de la cantidad de agua utilizada, a la vez que se consigue una alta recuperación del azúcar, la separación sólido-líquido se realiza, de manera preferente, mediante filtración con prensado. Otra razón por la que es preferente la filtración con prensado es que 2) se puede obtener un filtrado transparente. En la presente invención, el líquido de azúcar primario y/o el líquido de azúcar secundario obtenido mediante la separación sólido-líquido se filtran a través de una membrana de ultrafiltración para recuperar componentes enzimáticos. El líquido de azúcar que se pasa a través de la membrana de ultrafiltración contiene, de manera preferente, sólo pequeñas cantidades de sólidos y componentes en partículas en vista de la prevención de incrustaciones de la membrana, y, en el caso de filtración con prensado, el filtrado contiene sólo pequeñas cantidades de sólidos y componentes en partículas y puede, por lo tanto, utilizarse, de manera preferente, en la presente invención.

La hidrólisis secundaria en la presente invención significa que la segunda hidrólisis se realiza para los sólidos obtenidos mediante la separación sólido-líquido del hidrolizado primario, utilizando sólo la celulasa de un hongo filamentoso adsorbido sobre los sólidos. Es decir, en la hidrólisis secundaria, la hidrólisis de los sólidos se lleva a cabo solamente con la enzima adsorbida, sin adición adicional de carbohidrasa.

A diferencia de las técnicas convencionales (en las que sólo se realiza la hidrólisis primaria), la presente invención se caracteriza por que se lleva a cabo la hidrólisis secundaria sin adición adicional de la enzima para mejorar la producción del azúcar y/o la tasa de recuperación de la enzima. La producción de azúcar y/o la recuperación de la enzima pueden, naturalmente, realizarse también en las técnicas convencionales, pero, mediante la realización de la hidrólisis secundaria de la presente invención, se pueden recuperar más azúcar y enzima. Una razón principal para esto es la prevención de la inhibición de la enzima mediante la extracción del azúcar producido. El hidrolizado después de la hidrólisis primaria contiene una gran cantidad de componentes de azúcar. Mediante la realización de la separación sólido-líquido para extraer los azúcares (glucosa, xilosa y oligosacáridos) producidos mediante la hidrólisis y la adición adicional de agua, se puede disminuir la concentración de los azúcares producidos contenidos como componentes de la solución. Mediante esto, se puede evitar la inhibición de la enzima por los productos y la hidrólisis secundaria se puede llevar a cabo de manera suficiente con sólo la enzima adsorbida sobre los sólidos. Por lo tanto, incluso con la misma cantidad de enzima utilizada como en una técnica convencional, se puede recuperar más azúcar y/o enzima mediante la realización de la hidrólisis secundaria de la presente invención.

La cantidad de agua que se añade en la presente invención no está limitada y la adición se lleva a cabo, de manera preferente, de manera que la concentración de sólidos antes de la hidrólisis secundaria es entre el 1% en peso y el

20% en peso. En los casos en que la concentración de sólidos es mayor que el 20% en peso, y en los casos en que la concentración de sólidos es menor que el 1% en peso, la producción de azúcar y/o la cantidad recuperada de enzima puede ser baja, lo cual es ineficaz y no es preferente.

5 La temperatura de reacción durante la hidrólisis secundaria está, de manera preferente, dentro del intervalo de 40°C a 60°C, y, especialmente en los casos en que se utiliza celulasa de *Trichoderma*, la temperatura de reacción está, de manera más preferente, dentro del intervalo de 40°C a 55°C, de manera aún más preferente, a 50°C.

10 El tiempo de reacción de la hidrólisis secundaria está, de manera preferente, dentro del intervalo de 5 a 180 minutos. En los casos en que el tiempo de reacción es de menos de 5 minutos, la eficacia de recuperación de la enzima adsorbida es baja, mientras que incluso en los casos en que la reacción se lleva a cabo durante no menos de 180 minutos, la eficacia de recuperación de la enzima adsorbida no aumenta, lo cual es ineficaz.

15 El pH durante la hidrólisis secundaria está, de manera preferente, dentro del intervalo de 6,0 a 8,0. En los casos en que se utiliza celulasa de *Trichoderma* como la celulasa de un hongo filamentoso, el pH óptimo de reacción es de 5,0, y, especialmente en el caso de hidrólisis primaria, la reacción se realiza, de manera preferente, a un pH de 5,0. Por otro lado, en la hidrólisis secundaria, dado que el objetivo principal es la recuperación de la enzima adsorbida, la reacción se lleva a cabo, de manera preferente, a un pH dentro del intervalo de 6,0 a 8,0, en la que la eficacia de recuperación de la enzima adsorbida es elevada. A un pH de menos de 6,0, disminuye la cantidad de recuperación de enzima, mientras que con un pH superior a 8,0, la carbohidrasa se desactiva, lo cual no es preferente. Es decir, a un pH dentro del intervalo de 6,0 a 8,0, el grado de desactivación de carbohidrasa es extremadamente bajo y la eficacia de recuperación de la carbohidrasa puede ser elevada.

25 El hidrolizado secundario contiene un líquido de azúcar secundario y sólidos, y, de manera similar al caso de la hidrólisis primaria, éstos pueden separarse unos de otros mediante separación sólido-líquido, de manera preferente, filtración con prensado.

30 En la hidrólisis secundaria, pueden añadirse uno o más compuestos seleccionados de surfactantes no iónicos, aminoácidos, sales inorgánicas (con exclusión de sales de calcio) y disolventes orgánicos hidrófilos. Mediante la adición de dicho compuesto o compuestos, se puede aumentar cualquiera de uno o más de la producción de azúcar, la cantidad de enzima recuperada y la actividad de la enzima recuperada. En particular, en los casos en que la actividad de la enzima recuperada es elevada, puede reducirse la cantidad de la enzima fresca que se añade después de la reutilización de la enzima recuperada, lo cual s preferente económicamente.

35 La hidrólisis secundaria puede llevarse a cabo en presencia de un surfactante y el surfactante es, de manera preferente, un surfactante no iónico. Esto es porque, en los casos en que se utiliza un surfactante catiónico, un surfactante aniónico o un surfactante anfótero, el surfactante promueve la desactivación de carbohidrasa y tiene una acción inhibitoria sobre la reacción de hidrólisis secundaria. Además, la actividad de la enzima recuperada también se reduce, lo cual no es preferente. Por otro lado, con un surfactante no iónico, se pueden obtener una alta eficacia de producción de azúcar y una alta eficacia de recuperación de la enzima, de manera que se utiliza, de manera preferente, un surfactante no iónico.

45 El surfactante no iónico también se denomina tensioactivo no iónico y es un surfactante cuyo resto hidrófilo está constituido por un no electrólito. Entre los ejemplos específicos del surfactante no iónico se incluyen éteres de alquil polioxietileno, copolímeros de bloques de polioxipropileno, éteres de alilalquil polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, ésteres de ácidos grasos de sorbitán polioxietileno, éteres de nonilfenil polioxietileno, éteres de naftil polioxietileno, éteres de octilfenil polioxietileno, polioxietileno alquil aminas, ésteres de ácidos grasos de glicerina y óxidos de polioxietileno de serie de acetileno, y éstos se pueden utilizar individualmente o como una mezcla de dos o más de los mismos. El surfactante no iónico es, de manera preferente, un copolímero de bloques de polioxipropileno. El peso molecular del copolímero de bloques de polioxipropileno está, de manera preferente, dentro del intervalo de 500 a 15.000.

50 El surfactante no iónico se añade, de manera preferente, en una concentración dentro del intervalo del 0,05% al 5% en peso. En los casos en que la concentración es inferior al 0,05% en peso, la eficacia de recuperación de la carbohidrasa es baja, mientras que en los casos en que la concentración es superior al 5% en peso, se promueve la desactivación de carbohidrasa, lo cual económicamente no es ventajoso y, por lo tanto, no es preferente.

55 La hidrólisis secundaria se puede llevar a cabo en presencia de una sal o sales inorgánicas, con exclusión de las sales de calcio, y entre los ejemplos de la sal o sales inorgánicas que se pueden utilizar se incluyen sales de sodio, sales de potasio, sales de magnesio, sales de ácido sulfúrico, sales de amonio, sales de ácido clorhídrico, sales de ácido fosfórico, sales de ácido acético y sales de ácido nítrico. Entre los ejemplos de sales inorgánicas más preferentes se incluyen cloruro de sodio, acetato de sodio, sulfato de sodio, hidrogenosulfato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de sodio, cloruro de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio, sulfato de amonio, cloruro de magnesio y sulfato de magnesio. Entre éstas, las más preferentes son cloruro de sodio, sulfato de sodio e hidrogenosulfato de sodio, que son sales de sodio; y cloruro de magnesio y sulfato de magnesio, que son sales de magnesio. Mediante la adición de dicha sal o sales inorgánicas, se pueden incrementar la actividad de

degradación de Avicel y la actividad de degradación de xilano en la enzima recuperada.

Además, como alternativa a dichas sales inorgánicas, se puede utilizar agua de mar. El agua de mar es una solución acuosa de sales inorgánicas que contiene del 2,6% al 2,7% de cloruro de sodio, del 0,3% al 0,4% de cloruro de magnesio, del 0,1% al 0,2% de sulfato de magnesio y aproximadamente el 0,07% de cloruro de potasio y que se produce en la naturaleza en mayor cantidad. Por lo tanto, el agua de mar se puede utilizar como una solución acuosa de sales inorgánicas en la hidrólisis secundaria. El pH del agua de mar depende principalmente de su composición de sales y, en general, dentro del intervalo de 8,2 a 8,5. El agua de mar se puede utilizar en la hidrólisis secundaria, ya sea sin modificar el pH o después de ajustar el pH a un valor arbitrario. Es preferente ajustar el pH a un valor dentro del intervalo de 5 a 8,3 en vista de la mejora de la actividad de celulasa de la enzima recuperada. Para el ajuste del pH, se puede utilizar un ácido común, tal como ácido sulfúrico o ácido clorhídrico, y el ácido no está limitado.

Además, como alternativa a dicha sal o sales inorgánicas, se puede utilizar ceniza preparada sometiendo la biomasa que contiene celulosa, un producto pretratado de la biomasa que contiene celulosa, el residuo de sacarificación obtenido después de la hidrólisis de la biomasa que contiene celulosa, o similares, a combustión en una caldera. Dicha ceniza contiene una gran cantidad de sales de potasio y se puede preparar una solución acuosa de sales inorgánicas mediante la disolución de las sales en agua.

La sal o sales inorgánicas se añaden, de manera preferente, a una concentración dentro del intervalo del 0,05% al 5% en peso. En los casos en que la concentración es inferior al 0,05% en peso, la eficacia de recuperación de la carbohidrasa es baja, mientras que en los casos en que la concentración es superior al 5% en peso, se promueve la desactivación de carbohidrasa, lo cual no es económicamente ventajoso y, por lo tanto, no es preferente. En los casos en que se utiliza agua de mar como la solución acuosa de sales inorgánicas, la tasa de dilución del agua de mar se ajusta, de manera preferente, dentro del intervalo de 1/10 a 1.

La hidrólisis secundaria puede llevarse a cabo en presencia de un disolvente o disolventes orgánicos hidrófilos. El disolvente orgánico hidrófilo en la presente invención significa aquel que tiene una solubilidad no inferior a 100 g/l en agua a 20°C. Por otra parte, un disolvente orgánico que tiene una solubilidad menos de 100 g/l en las condiciones anteriores se denomina disolvente orgánico hidrófobo. Entre los ejemplos de disolventes orgánicos hidrófobos se incluyen, pero sin limitarse a, 1-butanol (74 g/l), 1-pentanol (27 g/l), 1-hexanol (5,8 g/l), acetato de etilo (83 g/l), hexano (cantidad en trazas) y cloroformo (cantidad en trazas). Entre los ejemplos representativos del disolvente orgánico hidrófilo en la presente invención se incluyen metanol, etanol, 1-propanol, isopropanol, dimetilsulfóxido, N,N-dimetilformamida, acetona, acetonitrilo, etilenglicol y glicerina. Mediante la adición de dicho disolvente orgánico hidrófilo, se puede aumentar la actividad de degradación de Avicel de la enzima recuperada, lo cual es preferente.

El disolvente o disolventes orgánicos hidrófilos anteriores se añaden, de manera preferente, a una concentración dentro del intervalo del 0,05% al 5% en peso. En los casos en que la concentración es inferior al 0,05% en peso, la eficacia de recuperación de la carbohidrasa es baja, mientras que en los casos en que la concentración es superior al 5% en peso, se promueve la desactivación de carbohidrasa, lo cual no es económicamente ventajoso y, por lo tanto, no es preferente.

La hidrólisis secundaria se puede llevar a cabo en presencia de un aminoácido o aminoácidos, y entre los ejemplos del aminoácido o aminoácidos que se pueden utilizar 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, y derivados de los mismos. Entre estos aminoácidos, son preferentes alanina, arginina, asparagina, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano y valina, que tienen una alta solubilidad en agua. Los más preferentes son arginina, cisteína, ácido glutámico, histidina y lisina, con los que se puede obtener enzima recuperada que tiene una alta actividad de degradación de Avicel.

El aminoácido o aminoácidos anteriores se añaden, de manera preferente, a una concentración dentro del intervalo del 0,05% al 5% en peso. En los casos en que la concentración es inferior al 0,05% en peso, la eficacia de recuperación de la carbohidrasa es baja, mientras que en los casos en que la concentración es superior al 5% en peso, se promueve la desactivación de carbohidrasa, lo cual no es económicamente ventajoso y, por lo tanto, no es preferente.

En la presente invención, el líquido de azúcar primario y/o el líquido de azúcar secundario se filtran a través de una membrana de ultrafiltración, y la carbohidrasa se separa/recupera de la parte de la alimentación, y se recupera una solución de azúcar de la parte de permeado. El punto de corte del peso molecular de la membrana de ultrafiltración utilizada en la presente invención no está limitado, siempre que permita la permeación de glucosa (peso molecular, 180), que es un monosacárido, y permita el bloqueo de la enzima. Más específicamente, el punto de corte del peso molecular puede estar dentro del intervalo de 500 a 50.000, y la membrana de ultrafiltración tiene un corte de peso molecular, de manera preferente, dentro del intervalo de 5.000 a 50.000, de manera más preferente, dentro del intervalo de 10.000 a 30.000. Entre los ejemplos del material que se puede utilizar para la membrana funcional de la membrana de ultrafiltración se incluyen poliéter sulfona (PES), polisulfona (PS), poliacrilonitrilo (PAN), fluoruro de

polivinilideno (PVDF), celulosa regenerada, celulosa, éster de celulosa, polisulfona sulfonada, poliéter sulfona sulfonada, poliolefina, alcohol de polivinilo, metacrilato de polimetilo y politetrafluoroetileno. Dado que la celulosa regenerada, la celulosa y el éster de celulosa experimentan una degradación por la celulosa, se utiliza, de manera preferente, una membrana de ultrafiltración que utiliza un material de polímero sintético, tal como PES o PVDF. Entre los ejemplos del procedimiento de filtración a través de una membrana de ultrafiltración se incluyen la filtración en línea y la filtración de flujo cruzado, y el procedimiento es, de manera preferente, la filtración de flujo cruzado en vista de la supresión de las incrustaciones de la membrana. Entre los ejemplos de la forma de la membrana de ultrafiltración que se pueden utilizar según sea apropiado se incluyen la membrana plana, la membrana enrollada en espiral, la membrana tubular y la membrana de fibra hueca. Entre los ejemplos específicos de la membrana de ultrafiltración se incluyen el tipo G-5, tipo G-10, tipo G-20, tipo G-50, tipo PW y tipo HWS UF, fabricados por DESAL; HFM-180, HFM-183, HFM-251, HFM-300, HFM-116, HFM-183, HFM-300, HFK-131, HFK-328, MPT-U20, MPS-U20P y MPS-U20S, fabricadas por KOCH; SPE1, SPE3, SPE5, SPE10, SPE30, SPV5, SPV50 y SOW30, fabricadas por Synder; productos de Microza (marca registrada), serie UF, fabricadas por Asahi Kasei Corporation, que tienen puntos de corte de peso molecular de 3.000 a 100.000; y NTR7410 y NTR7450, fabricadas por Nitto Denko Corporation.

En los casos en que se añaden un compuesto o compuestos, tales como un surfactante o surfactantes no iónicos, sal o sales inorgánicas, disolvente o disolventes orgánicos hidrófilos, aminoácido o aminoácidos para la hidrólisis secundaria, el líquido de azúcar secundario, naturalmente, contiene estos compuestos añadidos. Dichos compuestos pueden tener acciones inhibitorias sobre la etapa de fermentación posterior dependiendo de sus tipos y las cantidades de adición. En tal caso, sólo la enzima recuperada se puede separar/recuperar del líquido de azúcar secundario utilizando una membrana de ultrafiltración y el líquido de azúcar que contiene sales inorgánicas obtenido en la parte de permeado se puede tratar como un líquido de desecho.

En la presente invención, es preferente filtrar el líquido de azúcar primario y el líquido de azúcar secundario a través de una membrana de ultrafiltración y filtrar adicionalmente el líquido de azúcar obtenido de la parte del permeado a través de una membrana de ósmosis inversa y/o una membrana de nanofiltración. En la presente invención, es probable que el líquido de azúcar secundario tenga una concentración de azúcar inferior en comparación con el líquido de azúcar primario debido, por ejemplo, 1) dado que el líquido de azúcar secundario se produce mediante la reacción de hidrólisis utilizando sólo carbohidrasa adherida a los sólidos, la cantidad absoluta de carbohidrasa es más pequeña; y 2) la eficacia de la hidrólisis de la lignocelulosa que se ha permanecido como sólido es baja. Por lo tanto, en los casos en que sólo se utiliza el líquido de azúcar secundario, o una mezcla del líquido de azúcar secundario y el líquido de azúcar primario en la etapa de fermentación posterior, la concentración del producto de fermentación puede llegar a ser baja debido a la baja concentración de azúcar. Sin embargo, mediante la filtración del líquido de azúcar a través de una membrana de ósmosis inversa y/o una membrana de nanofiltración, se puede evitar la disminución de la concentración de azúcar en el líquido de azúcar. La concentración de azúcar significa en el presente documento la cantidad total de los componentes de monosacárido, especialmente glucosa y xilosa. La tasa de concentración en dicha concentración de azúcar no está limitada, siempre que se lleve a cabo la concentración para lograr una concentración apropiada para la etapa de fermentación posterior. La concentración de azúcar en la solución de azúcar antes de la concentración no está limitada y es, de manera preferente, de 10 g/l a 100 g/l. La concentración de azúcar después de la concentración no está limitada y el líquido de azúcar se puede utilizar, en general, de manera preferente, en la etapa de fermentación posterior en los casos en que la concentración de azúcar es de 50 g/l a 200 g/l.

Entre los ejemplos del material de la membrana de nanofiltración o membrana de ósmosis inversa que se puede utilizar en la presente invención se incluyen materiales poliméricos, tales como polímeros de acetato de celulosa, poliamidas, poliésteres, polimidas, polímeros de vinilo y polisulfonas. La membrana no se limita a una membrana constituida por solamente uno de los materiales y puede ser una membrana que comprende una pluralidad de materiales de membrana.

Como membrana de nanofiltración para utilizar en la presente invención, es preferente un elemento de membrana enrollado en espiral. Entre los ejemplos específicos del elemento de membrana de nanofiltración preferente 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 funcionales de piperazina poliamida reticuladas; 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, fabricada por el mismo fabricante, que comprende una piperazina poliamida reticulada como una componente principal. El elemento de membrana de nanofiltración es, de manera más preferente, NF99 o NF99HF; NF-45, NF-90, NF-200 o NF-400; o SU-210, SU-220, SU-600 o SU-610. El elemento de membrana de nanofiltración es, de manera aún más preferente, SU-210, SU-220, SU-600 o SU-610.

Como membrana de ósmosis inversa para utilizar en la presente invención, es preferente un elemento de membrana enrollado en espiral como en el caso de la membrana de nanofiltración. Entre los ejemplos específicos del elemento de membrana de ósmosis inversa preferente se incluyen módulos de membrana de ósmosis inversa de poliamida fabricados por TORAY INDUSTRIES, INC. SU-710, SU-720, SU-720F, SU-710L, SU-720L, SU-720LF, SU-720R,

SU-710P y SU-720P, que son módulos del tipo de baja presión, así como SU-810, SU-820, SU-820L y SU-820FA que contiene UTC70 como membrana de ósmosis inversa, que son módulos del tipo de alta presión; 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, fabricadas por Nitto Denko Corporation; RO98pHt, RO99, HR98PP y CE4040C-30D, fabricadas por Alfa-Laval; GE Sepa, fabricadas por GE; y BW30-4040, TW30-4040, XLE-4040, LP-4040, LE-4040, SW30-4040 y SW30HRLE-4040, fabricadas por FilmTec Corporation.

El aparato para llevar a cabo el procedimiento anteriormente descrito de la presente invención para la producción de un líquido de azúcar se describe a continuación. El aparato para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención para la producción de un líquido de azúcar debe comprender como constituyentes, como mínimo: un tanque de agitación -2- para llevar a cabo la hidrólisis primaria; un tanque de hidrólisis secundaria -28- o dispositivo de filtración con prensado -8- para llevar a cabo la hidrólisis secundaria; un dispositivo o dispositivos de separación sólido-líquido (-8-, -25-, -30-) para el hidrolizado primario y el hidrolizado secundario; y el dispositivo de membrana de ultrafiltración (-12-, -33-) para separar la carbohidrasa y el líquido de azúcar del líquido de azúcar primario y/o el líquido de azúcar secundario. Para describir realizaciones de dicho aparato, se muestran ejemplos específicos de la figura 2 a la figura 8 y de la figura 10 a la figura 16. Los aparatos de la figura 2 a la figura 8 y de la figura 10 a la figura 16 se clasificaron en de la forma 1 a la forma 4 en base a sus características. La forma 1 es una forma de aparato en la que la hidrólisis secundaria se lleva a cabo en un tanque de filtración con prensado -8-, y corresponde a de la figura 2 a la figura 8.

La forma 1 es una realización en la que el agua se hace circular en la cámara de filtración con prensado y es una forma de aparato con la que la hidrólisis secundaria de la presente invención puede llevarse a cabo, siempre que el aparato tenga un dispositivo de filtración con prensado -8- para la separación sólido-líquido. Esto tiene la ventaja de que la constitución del aparato es simple y, por tanto, puede suprimirse el coste para el aparato. Sin embargo, tiene el inconveniente de que el líquido de azúcar primario y el líquido de azúcar secundario se contaminan entre sí en el aparato.

La forma 2 es una forma de aparato que comprende un tanque de hidrólisis secundaria -28- para realizar la hidrólisis secundaria. La forma 2 comprende un tanque de agitación -2- y un tanque de hidrólisis secundaria -28- por separado. La forma 2 tiene la ventaja de que los sólidos se pueden resuspender en el tanque de hidrólisis secundaria -28- y la eficacia de la hidrólisis secundaria es elevada. Dependiendo especialmente de los tipos y las concentraciones de los compuestos añadidos para la hidrólisis secundaria, los compuestos pueden tener acciones inhibitorias sobre la fermentación posterior de un líquido de azúcar. Por lo tanto, en vista de evitar la contaminación del líquido de azúcar primario y el líquido de azúcar secundario entre sí, es ventajoso tener, como en la forma 2, el tanque de hidrólisis secundaria -28- dedicado a la hidrólisis secundaria por separado del tanque de agitación -2- para llevar a cabo la hidrólisis primaria, y tener, además, una separación sólido-líquido -30- dedicada al líquido de azúcar secundario y un dispositivo de membrana de ultrafiltración -33- dedicado al líquido de azúcar secundario. Sin embargo, la forma 2 tiene el inconveniente de que, a medida que aumenta el número total de equipos, incluyendo el tanque de hidrólisis secundaria -28-, aumenta el coste de los equipos.

Se muestra en una figura la forma 3, que es una forma de aparato en la que la hidrólisis secundaria se lleva a cabo en el tanque de agitación -2- en el que también se lleva a cabo la hidrólisis primaria. La forma 3 es una forma de aparato en la que el hidrolizado obtenido en el tanque de agitación -2- se somete a separación sólido-líquido y, a continuación, se devuelve de nuevo al tanque de agitación -2-, seguido por la adición de agua al mismo para llevar a cabo la hidrólisis secundaria. La forma 3 tiene la ventaja de que el número de equipos puede ser el más pequeño y se puede reducir el coste de los equipos. Sin embargo, la forma 3 tiene el inconveniente de que el líquido de azúcar primario y el líquido de azúcar secundario se contaminan entre sí en el aparato.

En las figuras se muestran parcialmente ejemplos de la forma 4, que es una realización en la que un dispositivo de membrana de microfiltración -36- está colocado entre un dispositivo de separación sólido-líquido -25- y un dispositivo de membrana de ultrafiltración -12-. La colocación del dispositivo de membrana de microfiltración tiene la ventaja de que pueden eliminarse las micropartículas insolubles que no podían ser eliminadas de manera suficiente mediante la separación sólido-líquido y se puede reducir en una etapa posterior la obstrucción de la membrana en el dispositivo de membrana de ultrafiltración -12-.

[Tabla 1]

Forma	Características del aparato	Figuras correspondientes
1	Forma de aparato en la que la hidrólisis secundaria se lleva a cabo en un dispositivo de tanque de filtración con prensado	Figura 2 a figura 8
2	Forma de aparato en la que la hidrólisis secundaria se lleva a cabo en un tanque de hidrólisis secundaria	Figura 10 a figura 12
3	Forma de aparato en la que la hidrólisis secundaria se lleva a cabo en un tanque de agitación que también se utiliza para la hidrólisis primaria	Figura 13
4	Forma de aparato en la que un dispositivo de membrana de microfiltración está colocado aguas arriba de un dispositivo de membrana de ultrafiltración (diagrama parcial)	Figura 14 a figura 16

La forma 1, que es una realización en la que la hidrólisis secundaria se lleva a cabo en un dispositivo de filtración con prensado, se describe a continuación utilizando los diagramas esquemáticos mostrados en las figuras 2 a 8.

5 Entre los ejemplos del aparato para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención para la producción de un líquido de azúcar se incluyen un aparato que comprende como constituyentes un tanque de agitación para la hidrólisis primaria -2-, un dispositivo de filtración con prensado -8- que tiene un tanque de suministro de agua caliente -6-, un conducto de circulación -10- para la circulación del filtrado desde el dispositivo de filtración con
10 prensado -8- al tanque de suministro de agua caliente -6-, y el dispositivo de membrana de ultrafiltración -12- para la separación de la carbohidrasa y la solución de azúcar a partir del líquido de azúcar primario y/o el líquido de azúcar secundario. El aparato para el procedimiento de la presente invención para la producción de un líquido de azúcar se describe a continuación con referencia a los ejemplos del aparato mostrado en las figuras.

15 La figura 2 y la figura 3 son diagramas esquemáticos que muestran aparatos, cada uno de los cuales utiliza un dispositivo de filtración con prensado -8- que tiene una entrada de agua caliente -15- y una entrada de hidrolizado -14-, tal como se muestra en la figura 4, por separado. La figura 5 y la figura 6 son diagramas esquemáticos que muestran aparatos, cada uno de los cuales utiliza un dispositivo de filtración con prensado -8- que tiene una entrada de hidrolizado que es a la vez entrada de agua caliente -21-, tal como se muestra en la figura 7. La figura 2 y la
20 figura 5 son diagramas esquemáticos que muestran aparatos, cada uno de los cuales tiene un tanque de agitación -2- y un tanque de suministro de agua caliente -6-, por separado. Por otro lado, la figura 3 y la figura 6 son diagramas esquemáticos que muestran aparatos, cada uno de los cuales utiliza un tanque de agitación -2- también como tanque de suministro de agua caliente.

25 El aparato mostrado en la figura 2 se describe a continuación en detalle. El tanque de agitación -2- para llevar a cabo la hidrólisis primaria tiene una entrada -3- para el suministro de celulosa, un dispositivo de agitación -4- para la agitación/mezcla de lignocelulosa y un termostato -1- para mantener la temperatura del tanque de agitación. El hidrolizado primario obtenido en el tanque de agitación -2- se alimenta al dispositivo de filtración con prensado -8- desde una entrada del hidrolizado -14-. En el dispositivo de filtración con prensado -8-, la separación sólido-líquido se lleva a cabo por compresión con un compresor -9-, y el agua caliente se suministra desde un tanque de
30 suministro de agua caliente -6- a los sólidos retenidos en la cámara de filtración con prensado a través de una entrada de agua caliente -15-. El tanque de suministro de agua caliente -6- tiene un conducto de suministro de agua -5-, un termostato del tanque de suministro de agua caliente -7- para mantener la temperatura del agua caliente en un valor predeterminado, y un conducto de circulación -10- para la circulación del filtrado obtenido mediante la filtración con prensado. El líquido de azúcar primario y/o el líquido de azúcar secundario obtenidos mediante la
35 filtración con prensado se retienen en un tanque de recuperación de filtrado -11-, y se filtran a través de un dispositivo de membrana de ultrafiltración -12-. La carbohidrasa recuperada se recupera y/o se reutiliza a través de un conducto de recuperación de la carbohidrasa.

40 El aparato mostrado en la figura 3 se describe a continuación en detalle. El tanque de agitación -2- para llevar a cabo la hidrólisis primaria tiene una entrada -3- para la alimentación de celulosa, un dispositivo de agitación -4- para la agitación/mezcla de celulosa y un termostato -1- para mantener la temperatura del tanque de agitación. El hidrolizado primario obtenido en el tanque de agitación -2- se alimenta al dispositivo de filtración con prensado -8- desde una entrada del hidrolizado -14-. En el dispositivo de filtración con prensado -8-, la separación sólido-líquido se lleva a cabo por compresión con un compresor -9- y el agua caliente se suministra desde un tanque de agitación
45 -2- a los sólidos retenidos en la cámara de filtración con prensado a través de una entrada de agua caliente -15-. Una entrada de hidrolizado -14- y una entrada de agua caliente -15- están conectadas al dispositivo de filtración con prensado -8-, y el flujo se puede cambiar con una válvula. El líquido de azúcar primario y/o el líquido de azúcar secundario obtenidos mediante la filtración con prensado se retienen en un tanque de recuperación de filtrado -11-, y se filtran a través de un dispositivo de membrana de ultrafiltración -12-. La carbohidrasa recuperado se recupera y/o
50 se reutiliza a través de un conducto de recuperación de la carbohidrasa.

55 El aparato mostrado en la figura 5 se describe a continuación en detalle. El tanque de agitación -2- para llevar a cabo la hidrólisis primaria tiene una entrada -3- para la alimentación de celulosa, un dispositivo de agitación -4- para la agitación/mezcla de celulosa y un termostato -1- para mantener la temperatura del tanque de agitación. El hidrolizado primario obtenido en el tanque de agitación -2- se alimenta al dispositivo de filtración con prensado -8- desde una entrada de hidrolizado que es a la vez entrada de agua caliente -21-. En el dispositivo de filtración con
60 prensado -8-, la separación sólido-líquido se lleva a cabo por compresión con un compresor -9- y el agua caliente se suministra desde un tanque de suministro de agua caliente -6- a los sólidos retenidos en la cámara de filtración con prensado a través de la entrada de hidrolizado que es a la vez entrada de agua caliente -21-. El tanque de suministro de agua caliente -6- tiene un conducto de suministro de agua -5-, un termostato del tanque de suministro de agua caliente -7- para mantener la temperatura del agua caliente en un valor predeterminado y un conducto de
65 circulación -10- para la circulación del filtrado obtenido mediante filtración con prensado. El líquido de azúcar primario y/o el líquido de azúcar secundario obtenidos mediante la filtración con prensado se retienen en un tanque de recuperación de filtrado -11- y se filtran a través de un dispositivo de membrana de ultrafiltración -12-. La carbohidrasa recuperada se recupera y/o se reutiliza a través de un conducto de recuperación de la carbohidrasa.

El aparato mostrado en la figura 6 se describe a continuación en detalle. El tanque de agitación -2- para llevar a cabo la hidrólisis primaria tiene una entrada -3- para la alimentación de celulosa, un dispositivo de agitación -4- para la agitación/mezcla de celulosa y un termostato -1- para mantener la temperatura del tanque de agitación. El hidrolizado primario obtenido en el tanque de agitación -2- se alimenta al dispositivo de filtración con prensado -8- desde una entrada de hidrolizado que es a la vez entrada de agua caliente -21-. En el dispositivo de filtración con prensado -8-, la separación sólido-líquido se lleva a cabo por compresión con un compresor -9-, y el agua caliente se suministra desde el tanque de agitación -2- a los sólidos retenidos en la cámara de filtración con prensado a través de la entrada de hidrolizado que es a la vez entrada de agua caliente -21-. El líquido de azúcar primario y/o el líquido de azúcar secundario obtenidos mediante la filtración con prensado se retienen en un tanque de recuperación de filtrado -11- y se filtran a través de un dispositivo de membrana de ultrafiltración -12-. La carbohidrasa recuperada se recupera y/o se reutiliza a través de un conducto de recuperación de la carbohidrasa.

En los aparatos descritos anteriormente, la hidrólisis secundaria se puede llevar a cabo sometiendo el hidrolizado primario a filtración con prensado y alimentando y/o circulando agua caliente a una temperatura de 40°C a 60°C al tanque de la cámara de filtración que retiene los sólidos obtenidos. Dado que los sólidos después de la filtración con prensado tienen un bajo contenido de humedad y baja fluidez, la realización de la hidrólisis secundaria en un recipiente de agitación separado o similar requiere potencia para suministrar energía para dispersar de nuevo los sólidos. Mediante la alimentación de agua caliente precalentada a una temperatura dentro del intervalo de 40°C a 60°C en el tanque de suministro de agua caliente -6- a la cámara de filtración con prensado, se puede aumentar la actividad de los componentes enzimáticos adsorbidos en los sólidos, de manera que se puede llevar a cabo la hidrólisis secundaria de la presente invención. En los casos en que la cantidad de agua caliente alimentada es demasiado grande, la concentración de azúcar en el líquido de azúcar secundario es demasiado baja, lo cual no es preferente. Por otro lado, en los casos en que la cantidad de agua caliente alimentada es demasiado pequeña, no se puede mantener de manera suficiente la temperatura de reacción en la cámara de filtración, lo cual no es preferente. Cabe señalar que, mediante el calentamiento del agua una vez alimentada a una temperatura de 40°C a 60°C y la circulación del agua de nuevo, se puede mantener la temperatura de reacción y se puede incrementar la concentración de azúcar en el líquido de azúcar secundario. El tiempo de la alimentación y/o circulación de agua caliente está, de manera preferente, dentro del intervalo de 5 minutos a 180 minutos. En los casos en que el tiempo es inferior a 5 minutos, la hidrólisis secundaria no puede llevarse a cabo de manera suficiente, mientras que en los casos en que el tiempo es superior a 180 minutos, la tasa de producción de azúcar tiende a estar saturada, lo cual no es preferente desde el punto de vista de la energía.

El dispositivo de filtración con prensado se muestra en la figura 4 y la figura 7 como diagramas esquemáticos. En el dispositivo mostrado en la figura 4, el hidrolizado primario se alimenta desde la entrada del hidrolizado -14- a la cámara de filtración con prensado -20-, y la separación sólido-líquido se lleva a cabo mediante compresión con una placa de presión -19-. A continuación, se alimenta agua caliente a través de la entrada de agua caliente -15- para poner en contacto el agua caliente con los sólidos (hidrolizado primario) -18-, seguido por su filtración a través de una tela filtrante -17-. El filtrado se hace circular adicionalmente a través de un termostato y se alimenta de nuevo a la cámara de filtración con prensado a través de la entrada de agua caliente -15-. Al permitir dicha circulación, la hidrólisis secundaria se puede llevar a cabo en la cámara de filtración con prensado. La figura 7 es un diagrama esquemático que muestra un procedimiento para suministrar agua caliente a través de una entrada de hidrolizado que es a la vez entrada de agua caliente -21-. Es decir, el hidrolizado primario se alimenta a través de la entrada de hidrolizado que es a la vez entrada de agua -21- a la cámara de filtración con prensado -20- y se somete a compresión con una placa de presión -19-, mediante lo cual se lleva a cabo una separación sólido-líquido. A continuación, el agua caliente se alimenta a través de la entrada de hidrolizado que es a la vez entrada de agua caliente -21- para poner en contacto el agua caliente con los sólidos (hidrolizado primario) -18-, seguido por su filtración a través de una tela filtrante -17-. El filtrado se hace circular adicionalmente a través de un termostato y se alimenta de nuevo a la cámara de filtración con prensado a través de la entrada de hidrolizado que es a la vez entrada de agua caliente -21-. Al permitir dicha circulación, la hidrólisis secundaria se puede llevar a cabo en la cámara de filtración con prensado. El tiempo de la alimentación y/o circulación de agua caliente a la cámara de filtración con prensado está, de manera preferente, dentro del intervalo de 5 minutos a 180 minutos. En los casos en que el tiempo es inferior a 5 minutos, la hidrólisis secundaria no puede llevarse a cabo de manera suficiente, mientras que en los casos en que el tiempo es superior a 180 minutos, la tasa de producción de azúcar tiende a estar saturada, lo cual no es preferente desde el punto de vista de la energía. En los casos en que la cantidad de agua caliente alimentada es demasiado grande, la concentración de azúcar en el líquido de azúcar secundario es demasiado baja, lo cual no es preferente. Por otro lado, en los casos en que la cantidad de agua caliente alimentada es demasiado pequeña, la temperatura de reacción en la cámara de filtración no se puede mantener de manera suficiente, lo cual no es preferente. En dichos casos, mediante el calentamiento del agua una vez alimentada a una temperatura de 40°C a 60°C y la circulación del agua de nuevo, se puede mantener la temperatura de reacción y se puede incrementar la concentración de azúcar en el líquido de azúcar secundario.

La figura 8 es un diagrama esquemático que muestra un aparato en el que un dispositivo de concentración de azúcar que tiene una membrana de ósmosis inversa y/o una membrana de nanofiltración para concentrar el líquido de azúcar está unido adicionalmente al aparato mostrado en la figura 2. De manera más específica, este aparato comprende, en la parte del filtrado del dispositivo de membrana de ultrafiltración -12-, un tanque de solución de azúcar -22-; un dispositivo de membrana de nanofiltración y/o un dispositivo de membrana de ósmosis inversa -23-

conectado al mismo a través de una bomba; y un conducto de filtrado -24-. En los casos en que el dispositivo de membrana de nanofiltración y/o el dispositivo de membrana de ósmosis inversa están conectados al aparato mostrado en las figuras 3, 5 ó 6, el dispositivo de membrana de nanofiltración y/o el dispositivo de membrana de ósmosis inversa pueden estar conectados, de la misma manera que en la figura 8, aguas abajo del dispositivo de membrana de ultrafiltración -12-, que está incluido en el aparato mostrado en las figuras 3, 5 o 6 de manera similar al aparato mostrado en la figura 2.

La forma 2, que es una realización en la que la hidrólisis secundaria se lleva a cabo en un tanque de hidrólisis secundaria, se describe a continuación con referencia a de la figura 10 a la figura 12.

La figura 10 es un diagrama que muestra un ejemplo de un sistema de aparatos que tiene un tanque de agitación para la hidrólisis primaria -2- y un tanque de hidrólisis secundaria -28-, por separado. El dispositivo de separación sólido-líquido -25- no está limitado, siempre que se permita la separación sólido-líquido del hidrolizado primario utilizando una centrifugadora, prensa de filtro, filtro de cinta o similares. Los sólidos obtenidos con el dispositivo de separación sólido-líquido -25- se transfieren al tanque de hidrólisis secundaria -28- mediante un medio de transferencia de sólidos -26-. El medio de transferencia de sólidos -26- no está limitado, siempre que sea adecuado para las propiedades de los sólidos, y entre los ejemplos del medio se incluyen un transportador de correa y una bomba de tornillo. El tanque de hidrólisis secundaria -28- comprende, como mínimo, un termostato -2- (tanque de hidrólisis secundaria) -27- para llevar a cabo la hidrólisis secundaria. El tanque de hidrólisis secundaria -28- puede comprender, además, un dispositivo de agitación -2- (tanque de hidrólisis secundaria) -29- para la mezcla de los sólidos mediante agitación. El tanque de hidrólisis secundaria -28- comprende, además, un dispositivo de separación sólido-líquido -2- (tanque de hidrólisis secundaria) -30- para llevar a cabo la separación sólido-líquido del hidrolizado secundario. El líquido de azúcar secundario separado a través del dispositivo de separación sólido-líquido -2- (tanque de hidrólisis secundaria) -30- se transfiere a un tanque de recuperación de líquido de azúcar secundario -32-. El líquido de azúcar secundario en el tanque de recuperación de líquido de azúcar secundario -32- se filtra a través de un dispositivo de membrana de ultrafiltración de líquido de azúcar secundario -33- para recuperar la enzima.

La figura 11 muestra una realización de un sistema de aparatos que tiene un tanque de agitación -2- para llevar a cabo la hidrólisis primaria y un tanque de hidrólisis secundaria -28-, por separado, y un dispositivo de separación sólido-líquido -25- y un dispositivo de separación sólido-líquido -2- (hidrolizado secundario) -30-, por separado, mientras que un dispositivo de membrana de ultrafiltración -12- está compartido por el líquido de azúcar primario y el líquido de azúcar secundario. Como en la figura 10, el hidrolizado secundario obtenido en el tanque de hidrólisis secundaria -28- se somete a separación sólido-líquido en el dispositivo de separación sólido-líquido -2- (hidrolizado secundario) -30- y se transfiere a un tanque de filtrado -11- a través de un conducto de transferencia de líquido de azúcar secundario -34-. El líquido de azúcar primario y el líquido de azúcar secundario recuperados en el tanque de filtrado -11- se filtran a través de una membrana de ultrafiltración -12- a la vez o de manera secuencial, y, de este modo, se separan la enzima y el azúcar.

La figura 12 muestra una realización de un sistema de aparatos que tiene un tanque de agitación -2- para llevar a cabo la hidrólisis primaria y un tanque de hidrólisis secundaria -28-, por separado, mientras que un dispositivo de separación sólido-líquido -25- y un dispositivo de membrana de ultrafiltración -12- son habitualmente utilizados por el líquido de azúcar primario y el líquido de azúcar secundario. El hidrolizado secundario obtenido en un tanque de hidrólisis secundaria -28- se transfiere a un dispositivo de separación sólido-líquido -25- a través de un conducto de transferencia de hidrolizado secundario -35- y se separa en el líquido de azúcar secundario y sólidos. El líquido de azúcar primario y el líquido de azúcar secundario separados en el dispositivo de separación sólido-líquido -25- se recuperan en un tanque de recuperación de filtrado -11- y se filtran a través de una membrana de ultrafiltración -12- a la vez o de manera secuencial, y, de este modo, se separan la enzima y el azúcar.

La forma 3, que es una realización en la que la hidrólisis secundaria se lleva a cabo en un tanque que también se utiliza para la hidrólisis primaria, se describe a continuación con referencia a la figura 13.

El aparato mostrado en la figura 13 es una realización en la que el hidrolizado primario obtenido en un tanque de agitación -2- para llevar a cabo la hidrólisis primaria se separa mediante un dispositivo de separación sólido-líquido -25-, y los sólidos obtenidos se hacen circular al tanque de hidrólisis primaria a través de un conducto de transferencia -35-, seguido de la realización de la hidrólisis secundaria en el tanque de hidrólisis primaria. El líquido de azúcar primario y el líquido de azúcar secundario separados en el dispositivo de separación sólido-líquido -25- se recogen en un tanque de recuperación de filtrado -11- y se filtran a través de un dispositivo de membrana de ultrafiltración -12- para separar la enzima y el azúcar.

Las formas de aparato en las que un dispositivo de membrana de microfiltración está colocado aguas arriba de un dispositivo de membrana de ultrafiltración se describen a continuación con referencia a de la figura 14 a la figura 16. La figura 14 muestra una realización (diagrama parcial) en la que un dispositivo de membrana de microfiltración -36- está colocado aguas arriba de un dispositivo de membrana de ultrafiltración -12-. El dispositivo de membrana de microfiltración -36- no está limitado, siempre que pueda eliminar los componentes de micropartículas insolubles contenidos en el líquido de azúcar primario y/o el líquido de azúcar secundario obtenidos en el dispositivo de

separación sólido-líquido -33- o el dispositivo de filtración con prensado -8-, y entre los ejemplos del dispositivo de membrana de microfiltración -36- se incluyen membranas de microfiltración que tienen tamaños promedio de poro en el intervalo de 0,01 μm a 1 μm . El procedimiento de filtración en el dispositivo de membrana de microfiltración -36- puede ser o bien filtración de flujo cruzado (figura 15) o bien filtración en línea (figura 16).

La figura 15 muestra una realización del dispositivo de membrana de microfiltración -36- para realizar la microfiltración mediante filtración de flujo cruzado. El líquido de azúcar primario y/o el líquido de azúcar secundario pueden almacenarse en un tanque de líquido en bruto de la membrana de microfiltración -37- y se filtran a través de una membrana de microfiltración -38- mientras se hace circular mediante una bomba.

La figura 16 muestra una realización en la que la microfiltración se lleva a cabo mediante filtración en línea. El líquido de azúcar primario y/o el líquido de azúcar secundario se almacenan en un tanque de líquido en bruto de la membrana de microfiltración -37- y se filtran a través de una membrana de microfiltración -38-. En el caso de filtración en línea, se puede disponer, según sea apropiado, un dispositivo de suministro de aire comprimido -39- para realizar un lavado con burbujas de aire de la superficie de la membrana, y se puede colocar una bomba de lavado inverso -40- para el lavado inverso. El lavado inverso se puede llevar a cabo con el filtrado recuperado en un tanque de recuperación de microfiltrado -41-, o, en algunos casos, con un líquido o agente líquido de lavado de la membrana común. La membrana de microfiltración -38- puede estar en forma de o bien una membrana plana o bien una membrana de fibra hueca. La membrana de fibra hueca puede ser o bien una membrana de tipo de presión interna o bien una membrana de tipo de presión externa.

EJEMPLOS

La presente invención se describe a continuación de manera más específica a modo de ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos ejemplos.

(Ejemplo de referencia 1) Preparación de celulosa pretratada

1. Preparación de celulosa pretratada 1 (tratamiento con ácido sulfúrico diluido)

Como celulosa, se utilizó paja de arroz. La celulosa se sumergió en una solución acuosa de ácido sulfúrico al 1% y se sometió a tratamiento utilizando un autoclave (fabricado por Nitto Koatsu Co., Ltd.) a 150°C durante 30 minutos. Después del tratamiento, se llevó a cabo una separación sólido-líquido para separar la celulosa tratada con ácido sulfúrico de la solución acuosa de ácido sulfúrico (en lo sucesivo denominado "líquido del tratamiento con ácido sulfúrico diluido"). Posteriormente, la celulosa tratada con ácido sulfúrico se mezcló con el líquido del tratamiento con ácido sulfúrico diluido con agitación, de manera que la concentración del contenido de sólidos es del 10% en peso, y el pH se ajustó a aproximadamente 5 con hidróxido de sodio. La mezcla resultante se utilizó en los ejemplos a continuación como la celulosa pretratada 1.

2. Preparación de celulosa pretratada 2 (tratamiento con amoníaco)

Como celulosa, se utilizó paja de arroz. La celulosa se alimentó a un reactor compacto (fabricado por Taiatsu Techno Corporation, TVS-N2 30 ml) y se enfrió con nitrógeno líquido. En este reactor, se hizo fluir gas amoníaco y la muestra se sumergió completamente en amoníaco líquido. La tapa del reactor se cerró y el reactor se dejó en reposo a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos. Posteriormente, el reactor se introdujo en un baño de aceite a 150°C durante 1 hora. A continuación, el reactor se extrajo del baño de aceite y se dejó que escape gas amoníaco en una campana de extracción, seguido de la aspiración del interior del reactor a 10 Pa con una bomba de vacío, secando de este modo la celulosa. El producto resultante se utilizó en los ejemplos a continuación como la celulosa pretratada 2.

3. Preparación de celulosa pretratada 3 (tratamiento hidrotérmico)

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.) a 180°C durante 20 minutos con agitación. El tratamiento se llevó a cabo a una presión de 10 MPa. Después del tratamiento, se llevó a cabo una separación sólido-líquido mediante centrifugación (3.000 G) para separar el componente de biomasa procesado del componente de solución (en lo sucesivo denominado "líquido tratado hidrotérmicamente"). El componente de biomasa procesado se utilizó en los ejemplos a continuación como la celulosa pretratada 3.

(Ejemplo de referencia 2) Medición de la concentración de azúcar

Las concentraciones de glucosa y xilosa contenidas en el líquido de azúcar se midieron en las condiciones de HPLC descritas a continuación en base a la comparación con muestras estándar.

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: IR (índice de refracción diferencial)
Temperatura: 30°C

(Ejemplo de referencia 3) Preparación de celulasa de *Trichoderma*

5

La celulasa de *Trichoderma* se preparó mediante el siguiente procedimiento.

[Precultivo]

10

Se preparó la mezcla de licor de maíz fermentado al 5% (p/v), glucosa al 2% (p/v), tartrato de amonio al 0,37% (p/v), sulfato de amonio al 0,14% (p/v), dihidrogenofosfato de potasio al 0,2% (p/v), dihidrato de cloruro de calcio al 0,03% (p/v), heptahidrato de sulfato de magnesio al 0,03% (p/v), cloruro de zinc al 0,02% (p/v), hexahidrato de cloruro de hierro (III) al 0,01% (p/v), pentahidrato de sulfato de cobre (II) al 0,004% (p/v), tetrahidrato de cloruro de manganeso al 0,0008% (p/v), ácido bórico al 0,0006% (p/v) y tetrahidrato de heptamolibdato de hexaamonio al 0,0026% (p/v) en agua destilada, y se colocaron 100 ml de esta mezcla en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con deflector, seguido de esterilización mediante autoclave a 121°C durante 15 minutos. Después de dejar enfriar la mezcla, se añadieron a la misma PE-M y Tween 80, cada uno de los cuales se esterilizó mediante tratamiento en autoclave a 121°C durante 15 minutos por separado de la mezcla, al 0,01% (p/v) cada uno. A este medio de precultivo, se inoculó *Trichoderma reesei* PC3-7 a 1×10^5 células/ml y las células se cultivaron a 28°C durante 72 horas con agitación a 180 rpm para llevar a cabo el precultivo (agitador: BIO-SHAKER BR-40LF, fabricado por TAITEC CORPORATION).

15

20

[Cultivo principal]

25

Se preparó la mezcla de licor de maíz fermentado al 5% (p/v), glucosa al 2% (p/v), celulosa (Avicel) al 10% (p/v), tartrato de amonio al 0,37% (p/v), sulfato de amonio al 0,14% (p/v), dihidrogenofosfato de potasio al 0,2% (p/v), dihidrato de cloruro de calcio al 0,03% (p/v), heptahidrato de sulfato de magnesio al 0,03% (p/v), cloruro de zinc al 0,02% (p/v), hexahidrato de cloruro de hierro (III) al 0,01% (p/v), pentahidrato de sulfato de cobre (II) al 0,004% (p/v), tetrahidrato de cloruro de manganeso al 0,0008% (p/v), ácido bórico al 0,0006% (p/v) y tetrahidrato de heptamolibdato de hexaamonio al 0,0026% (p/v) en agua destilada, y se colocaron 2,5 l de esta mezcla en un frasco de agitación de 5 l (fabricado por ABLE, DPC-2A), seguido de la esterilización en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Después de dejar enfriar la mezcla, se añadieron a la misma PE-M y Tween 80, cada uno de los cuales se esterilizó mediante tratamiento en autoclave a 121°C durante 15 minutos por separado de la mezcla, al 0,1% (p/v) cada uno. A la mezcla resultante, se inocularon 250 ml de precultivo de *Trichoderma reesei* PC3-7 preparada previamente con un medio líquido mediante el procedimiento descrito anteriormente. Las células se cultivaron a 28°C durante 87 horas a 300 rpm a una velocidad de aireación de 1 vvm. Después de la centrifugación, el sobrenadante se sometió a filtración de membrana (Stericup-GV, fabricada por Millipore, material: PVDF). Al líquido de cultivo preparado en las condiciones descritas anteriormente, se añadió β -glucosidasa (Novozyme 188) en una relación en peso de proteína de 1/100, y se utilizó la mezcla resultante como celulasa de *Trichoderma* en los ejemplos siguientes.

30

35

40

(Ejemplo de referencia 4) Procedimiento de medición de la actividad de celulasa

La actividad de celulasa se midió y se evaluó mediante los siguientes procedimientos con respecto a cuatro tipos de actividades de degradación: 1) actividad de degradación de Avicel; 2) actividad de degradación de carboximetil celulosa (CMC); 3) actividad de degradación de celobiosa; y 4) actividad de degradación de xilano.

45

1) Actividad de degradación de Avicel

50

A un líquido de enzimas (preparado en condiciones predeterminadas), se añadió Avicel (celulosa microcristalina, fabricada por Merck) a 1 g/l y se añadió tampón acetato de sodio (pH 5,0) a 100 mM, dejando posteriormente que la mezcla resultante reaccione a 50°C durante 24 horas. Este líquido de reacción se preparó en un tubo de 1 ml y la reacción se dejó continuar mediante mezcla por rotación en las condiciones descritas anteriormente. A continuación, el tubo se sometió a centrifugación y se midió la concentración de glucosa en el componente del sobrenadante. La medición de la concentración de glucosa se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el ejemplo de referencia 2. Se utilizó la concentración de la glucosa producida (g/l) como tal como el valor de actividad de la actividad de degradación de Avicel.

55

2) Actividad de degradación de CMC

60

A un líquido de enzimas, se añadió carboximetil celulosa a 10 g/l y se añadió tampón acetato de sodio (pH 5,0) a 100 mM, dejando posteriormente que la mezcla resultante reaccione a 50°C durante 0,5 horas. Este líquido de reacción se preparó en un tubo de 1 ml y la reacción se dejó continuar mediante mezcla por rotación en las condiciones descritas anteriormente. A continuación, el tubo se sometió a centrifugación y se midió la concentración de glucosa en el componente del sobrenadante. La medición de la concentración de glucosa se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el ejemplo de referencia 2. Se utilizó la concentración de la glucosa producida (g/l) como tal como el valor de actividad de la actividad de degradación de CMC.

65

3) Actividad de degradación de celobiosa

5 A un líquido de enzimas, se añadió celobiosa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a 500 mg/l y se añadió tampón acetato de sodio (pH 5,0) a 100 mM, dejando posteriormente que la mezcla resultante reaccione a 50°C durante 0,5 horas. Este líquido de reacción se preparó en un tubo de 1 ml y la reacción se dejó continuar mediante mezcla por rotación en las condiciones descritas anteriormente. A continuación, el tubo se sometió a centrifugación y se midió la concentración de glucosa en el componente del sobrenadante. La medición de la concentración de glucosa se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el ejemplo de referencia 2. Se utilizó la concentración de la glucosa producida (g/l) como tal como el valor de actividad de la actividad de degradación de celobiosa.

4) Actividad de degradación de xilano

15 A un líquido de enzimas, se añadió xilano (xilano de madera de abedul, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a 10 g/l y se añadió tampón acetato de sodio (pH 5,0) a 100 mM, dejando posteriormente que la mezcla resultante reaccione a 50°C durante 4 horas. Este líquido de reacción se preparó en un tubo de 1 ml y la reacción se dejó continuar mediante mezcla por rotación en las condiciones descritas anteriormente. A continuación, el tubo se sometió a centrifugación y se midió la concentración de xilosa en el componente del sobrenadante. La medición de la concentración de xilosa se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el ejemplo de referencia 2. Se utilizó la concentración de la xilosa producida (g/l) como tal como el valor de actividad de la actividad de degradación de xilosa.

(Ejemplo 1) Hidrólisis de celulosa con celulasa de *Trichoderma*

25 Los resultados de la hidrólisis primaria y la hidrólisis secundaria en la hidrólisis de celulosa utilizando celulasa de *Trichoderma* se describen en los ejemplos a continuación. El procedimiento del experimento fue el siguiente.

(Etapa 1: Hidrólisis primaria)

30 A cada una de las celulosas pretratadas 1 a 3 (1 g cada una), se añadió agua destilada y se añadieron 10 mg de celulasa de *Trichoderma*, seguido de la adición de agua destilada, de manera que el peso total es de 10 g. Además, se añadieron a las mismas ácido sulfúrico diluido o sosa cáustica diluida para ajustar el pH de la composición a un valor dentro del intervalo de 4,5 a 5,3. La composición después del ajuste del pH se transfirió a un tubo de ensayo con brazo lateral (φ30 NS14/23, fabricado por Tokyo Rikakikai Co., Ltd.) y la composición se transfirió a un reactor con brazo lateral (φ30 NS14/23, fabricado por Tokyo Rikakikai Co., Ltd.), seguido por la realización de la hidrólisis a 50°C durante 24 horas con incubación y agitación (agitador mecánico compacto CPS-1000, fabricado por Tokyo Rikakikai Co., Ltd., adaptador de conversión, entrada de alimentación con una llave de paso de tres vías, incubadora MG-2200). El hidrolizado se sometió a una separación sólido-líquido mediante centrifugación (3.000 G, 10 minutos), y, de este modo, el hidrolizado se separó en el líquido de azúcar primario (6 ml) y los sólidos. Las concentraciones de glucosa y xilosa en el líquido de azúcar primario obtenido se midieron mediante los procedimientos descritos en el ejemplo de referencia 2. La producción de azúcar (mg) en el líquido de azúcar primario se calculó según la siguiente ecuación. La tabla 2 muestra un resumen de los resultados.

45 Producción de azúcar (mg) en el líquido de azúcar primario = {concentración de azúcar (g/l) después de 24 horas de incubación - concentración de azúcar (g/l) después de 0 horas de incubación} x 6 (ml)

[Tabla 2]

		Concentración de azúcar			Producción de azúcar (mg) (24 h, 5 mL)
		0 h	6 h	24 h	
Celulosa pretratada 1	Glucosa	0	18	36	216
	Xilosa	0	6	15	90
Celulosa pretratada 2	Glucosa	0	27	46	276
	Xilosa	0	6	8	48
Celulosa pretratada 3	Glucosa	0	28	35	210
	Xilosa	0	4	7	42

(Etapa 2: Hidrólisis secundaria)

50 A los sólidos obtenidos en la etapa 1, se añadió agua destilada, de manera que el peso total es de 10 g. Además, se añadieron a los mismos ácido sulfúrico diluido o sosa cáustica diluida para ajustar el pH de la composición a un valor dentro del intervalo de 4,5 a 5,3. La composición se transfirió a un tubo de ensayo con brazo lateral (φ30 NS14/23, fabricado por Tokyo Rikakikai Co., Ltd.) y la composición se transfirió a un reactor con brazo lateral (φ30 NS14/23, fabricado por Tokyo Rikakikai Co., Ltd.), seguido por la realización de la hidrólisis secundaria a 50°C durante 1 hora con incubación y agitación (agitador mecánico compacto CPS-1000, fabricado por Tokyo Rikakikai Co., Ltd., adaptador de conversión, entrada de alimentación con una llave de paso de tres vías, incubadora MG-2200). El

hidrolizado se sometió a una separación sólido-líquido mediante centrifugación (3.000 G, 10 minutos), y, de este modo, el hidrolizado se separó en el líquido de azúcar secundario (6 ml) y los sólidos. Las concentraciones de glucosa y xilosa en el líquido de azúcar secundario obtenido se midieron mediante los procedimientos descritos en el ejemplo de referencia 2. La producción de azúcar (mg) en el líquido de azúcar secundario se calculó según la siguiente ecuación.

Producción de azúcar (mg) en el líquido de azúcar secundario = {concentración de azúcar (g/l) después de 1 hora de incubación - concentración de azúcar (g/l) después de 0 horas de incubación} x 6 (ml)

La tabla 3 muestra un resumen de los resultados. Se reveló que, a pesar de que no se añadió enzima adicional en la hidrólisis secundaria, una hora de incubación provocó un aumento en la concentración de azúcar. Es decir, se observó que la hidrólisis secundaria se producía sólo con el líquido de azúcar primario que permanecía en los sólidos y/o la enzima adsorbida a los sólidos.

[Tabla 3]

		Concentración de azúcar (g/l)		Producción de azúcar (mg) (1 h, 6 ml)
		0 h	1 h	
Celulosa pretratada 1	Glucosa	16	20	24
	Xilosa	6	8	12
Celulosa pretratada 2	Glucosa	12	16	24
	Xilosa	1	2	6
Celulosa pretratada 3	Glucosa	11	16	30
	Xilosa	1	2	6

(Etapa 3: Recuperación de la carbohidrasa)

Se mezclaron el líquido de azúcar primario (6 ml) obtenido en la hidrólisis primaria en la etapa 1 y el líquido de azúcar secundario (6 ml) obtenido en la hidrólisis secundaria en la etapa 2 y se recuperó la carbohidrasa de la solución resultante.

La solución anterior se filtró a través de una membrana de ultrafiltración que tenía un punto de corte de peso molecular de 10.000 (VIVASPIN 20, fabricada por Sartorius stedim biotech, material: PES) mediante centrifugación a 4.500 G hasta que la fracción de membrana se redujo a 1 ml. A la fracción de membrana, se añadieron 10 ml de agua destilada y la mezcla resultante se centrifugó de nuevo a 4.500 G hasta que la fracción de membrana se redujo a 1 ml. A continuación, la enzima se recuperó de la fracción de membrana. Se sometió a ensayo la concentración de proteína de la enzima recuperada con el kit de medición de BCA (kit de reactivos de análisis de proteína BCA, fabricado por PIERCE), utilizando albúmina bovina (2 mg/ml) como muestra estándar, mediante la medición de la absorbancia a 562 nm para realizar la colorimetría. La concentración de la enzima que pudo recuperarse (mg/ml) se multiplicó por 1 ml, que era la cantidad de la solución en la fracción de membrana, para calcular la cantidad de carbohidrasa que pudo recuperarse. Como resultado, tal como se muestra en la tabla 4, se reveló que la enzima pudo recuperarse en una cantidad de 1,6 a 2,6 mg.

[Tabla 4]

	Cantidad de enzima recuperada (mg) 50°C
Celulosa pretratada 1	1,6
Celulosa pretratada 2	2,6
Celulosa pretratada 3	2,0

(Ejemplo 2) Influencias de la temperatura de reacción sobre la producción de azúcar/cantidad de enzima recuperada en la hidrólisis secundaria

La hidrólisis secundaria se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 1, excepto que la temperatura de reacción se fijó dentro del intervalo de 25°C a 90°C. La producción de azúcar (glucosa, g) en el líquido de azúcar secundario (6 ml) fue tal como se muestra en la tabla 5. Se reveló que, en la hidrólisis secundaria de la presente invención, la producción de azúcar es más elevada dentro del intervalo de 40°C a 60°C, es decir, a la temperatura de reacción óptima de la celulasa de *Trichoderma*.

[Tabla 5]

	25°C	35°C	40°C	50°C	55°C	60°C	65°C	70°C	80°C	90°C
Celulosa pretratada 1	1	3	20	24	22	15	0	0	0	0
Celulosa pretratada 2	2	3	17	24	20	6	0	0	0	0
Celulosa pretratada 3	0	1	20	30	27	10	0	0	0	0

Además, la hidrólisis secundaria se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 1, excepto que la temperatura de reacción se fijó dentro del intervalo de 25°C a 90°C, y se llevó a cabo la recuperación de la carbohidrasa en la etapa 3, seguido del cálculo de la cantidad de carbohidrasa que pudo recuperarse. Como resultado, tal como se muestra en la tabla 6, se reveló que la cantidad recuperada de carbohidrasa aumenta a temperaturas de reacción dentro del intervalo de 40°C a 60°C durante la hidrólisis secundaria. Se pudo confirmar adicionalmente que una temperatura más preferente durante la hidrólisis secundaria es 50°C.

[Tabla 6]

	25°C	35°C	40°C	50°C	55°C	60°C	65°C	70°C	80°C	90°C
Celulosa pretratada 1	0	0	1,0	1,6	1,4	1,4	0	0	0	0
Celulosa pretratada 2	0	0	1,6	2,6	2,1	1,3	0	0	0	0
Celulosa pretratada 3	0	0	1,4	2,0	1,5	1,3	0	0	0	0

(Ejemplo 3) Análisis de la enzima recuperada

La enzima recuperada obtenida en la etapa 3 del ejemplo 1 (celulosa pretratada 2) se sometió a electroforesis por SDS-PAGE para analizar los componentes de enzima recuperada. En primer lugar, se mezcló una cantidad igual de un tampón de tratamiento de muestra (Ez Apply, fabricado por ATTO Corporation) con la enzima recuperada, y la mezcla resultante se trató a 100°C durante 10 minutos. A gel al 15% para electroforesis (e-PAGEL, fabricado por ATTO Corporation), se aplicaron 5 µl de la muestra tratada, y se llevó a cabo la electroforesis (40 mA, 30 minutos). El gel se extrajo y se tiñó con azul brillante de Coomassie (Bio-safe CBB, fabricado por Bio-Rad Laboratories), seguido de decoloración con agua destilada. El resultado obtenido mediante la tinción del gel después de la electroforesis se muestra en la figura 9. Se pudo confirmar que, dentro del intervalo de 40°C a 60°C, está contenido especialmente la celobiohidrolasa entre los componentes de celulasa de *Trichoderma* como un componente de la enzima recuperada.

(Ejemplo 4) Relación entre el tiempo de reacción y la producción de azúcar/cantidad de enzima recuperada en la hidrólisis secundaria

La hidrólisis secundaria se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 1, excepto que el tiempo de reacción se fijó dentro del intervalo de 0 a 720 minutos. La producción de azúcar (glucosa, g) en el líquido de azúcar secundario (6 ml) fue tal como se muestra en la tabla 7. Se reveló que se puede producir una cantidad suficiente de azúcar mediante la realización de la hidrólisis secundaria de la presente invención durante no menos de 5 minutos. Por otro lado, la cantidad de enzima recuperada no cambió en el intervalo superior a 180 minutos.

[Tabla 7]

	0	1	5	10	30	60	120	180	360	720
Celulosa pretratada 1	0	1	2	6	18	24	30	35	36	36
Celulosa pretratada 2	0	1	4	6	14	24	29	34	34	35
Celulosa pretratada 3	0	1	3	8	20	30	38	42	42	42

Posteriormente, la hidrólisis secundaria se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 1, excepto que el tiempo de reacción se fijó dentro del intervalo de 0 a 720 minutos, y se llevó a cabo la recuperación de la carbohidrasa en la etapa 3, seguido del cálculo de la cantidad de carbohidrasa que pudo recuperarse. Como resultado, tal como se muestra en la tabla 8, se reveló que se puede recuperar una cantidad suficiente de la enzima mediante la realización de la hidrólisis secundaria de la presente invención durante no menos de 5 minutos. Por otro lado, la cantidad de enzima recuperada no cambió en el intervalo superior a 180 minutos.

[Tabla 8]

	0	1	5	10	30	60	120	180	360	720
Celulosa pretratada 1	0	0,1	0,3	0,5	1,2	1,6	1,9	2,4	2,4	2,6
Celulosa pretratada 2	0	0,1	0,5	1,1	1,8	2,6	3,0	3,5	3,6	3,7
Celulosa pretratada 3	0	0	0,5	0,8	1,5	2,0	2,4	2,8	3,0	3,1

(Ejemplo 5) Relación entre el pH y la cantidad de enzima recuperada en la hidrólisis secundaria

La etapa 2 del ejemplo 1 se llevó a cabo a 50°C después de ajustar el pH a un valor dentro del intervalo de 4,5 a 5,3 con ácido sulfúrico diluido o sosa cáustica diluida. Sin embargo, en el presente ejemplo, el pH se ajustó con tampones de dilución a diferentes valores dentro del intervalo de 3 a 10, y se llevó a cabo la hidrólisis secundaria a 50°C. Como tampón, se utilizó tampón acetato de sodio 2 mM para valores de pH dentro del intervalo de 3 a 8, mientras que se utilizó tampón de glicina-hidróxido de sodio 2 mM para valores de pH dentro del intervalo de 9 a 10. El experimento se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto por el ajuste del pH. Como resultado, tal como se muestra en la tabla 9, se reveló que se puede incrementar la cantidad de enzima recuperada mediante la realización de la hidrólisis secundaria a un pH dentro del intervalo de 6,0 a 8,0.

[Tabla 9]

	3	4	5	6	7	8	9	10
Celulosa pretratada 1	0	1,2	1,6	3,0	3,4	3,4	2,0	2,0
Celulosa pretratada 2	0	1,8	2,6	3,5	3,8	4,0	2,1	2,1
Celulosa pretratada 3	0	1,5	2,0	3,2	3,5	3,2	1,0	1,0

(Ejemplo 6) Relación entre la cantidad de surfactante no iónico añadido y la cantidad de enzima recuperada en la hidrólisis secundaria

Como surfactante no iónico, se utilizó Pluronic F-68 (fabricado por BASF). La hidrólisis secundaria se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 1, excepto que se añadió Pluronic F-68, de manera que su concentración final estaba dentro del intervalo del 0,01% al 5%. El procedimiento fue el mismo que en el ejemplo 1, excepto por la adición de un surfactante no iónico. Como resultado, tal como se muestra en la tabla 10, pudo aumentarse la cantidad de enzima recuperada mediante la adición del surfactante no iónico a concentraciones dentro del intervalo del 0,05% al 2%.

[Tabla 10]

	0,01%	0,05%	0,1%	0,25%	0,5%	1%	2%	5%
Celulosa pretratada 1	1,6	1,8	2,1	2,3	2,5	2,9	3,3	3,3
Celulosa pretratada 2	2,7	3,0	3,2	3,6	3,8	4,1	4,2	4,2
Celulosa pretratada 3	2,0	2,1	2,4	2,6	2,9	3,4	3,7	3,8

(Ejemplo de referencia 5) Producción en masa de hidrolizado primario

Para la producción en masa del hidrolizado primario, se añadieron 20 g de celulasa de *Trichoderma* a la celulosa pretratada 3 (2 kg), y se añadió adicionalmente agua destilada, de manera que el peso total es de 20 kg. Además, el pH de la composición se ajustó a un valor dentro del intervalo de 4,5 a 5,3 con ácido sulfúrico diluido o sosa cáustica diluida. Mientras se incubaba el líquido, de manera que se mantenía una temperatura del líquido de 45°C a 50°C, y se añadió o añadieron ácido sulfúrico diluido y/o sosa cáustica diluida al líquido, de manera que el pH se mantuvo dentro del intervalo de 4,5 a 5,3, se dejó reaccionar la enzima con la celulosa pretratada 3 durante 24 horas (el líquido obtenido mediante la reacción se denomina en lo sucesivo el líquido de la suspensión de sacarificación enzimática).

(Ejemplo comparativo 1) Separación sólido-líquido mediante filtración con prensado (separación sólido-líquido después de la hidrólisis primaria)

Utilizando 10 l de líquido de suspensión de sacarificación enzimática obtenido en el ejemplo de referencia 4, se llevó a cabo una filtración con prensado mediante el siguiente procedimiento. Para la filtración con prensado, se utilizó un aparato de filtro prensa compacto (filtro prensa MO-4, fabricado por Yabuta Industries Co., Ltd.). Como tela filtrante, se utilizó una tela tejida de poliéster (T2731C, fabricada por Yabuta Industries Co., Ltd.). Después de alimentar 10 l del líquido de suspensión de sacarificación enzimática al tanque compacto, se abrió la entrada de líquido para alimentar lentamente el líquido de suspensión de sacarificación enzimática a la cámara de filtración utilizando una bomba de aire (66053-3EB, fabricada por Taiyo International Corporation) bajo aireación con aire comprimido desde la parte inferior. Dado que el filtrado obtenido después de 1 minuto de la operación permanecía turbio, el filtrado se devolvió al tanque compacto. La presión de accionamiento de la bomba de aire se incrementó gradualmente para aumentar la presión en la cámara de filtración y se continuó la etapa de inyección hasta que se obtuvo el filtrado. La presión máxima de inyección en este momento fue de 0,15 MPa. El tiempo requerido para la etapa de inyección anterior fue de 30 minutos.

Posteriormente, se llevó a cabo una etapa de compresión mediante el hinchamiento del diafragma unido a la cámara de filtración. La presión de compresión se aumentó gradualmente hasta 0,5 MPa y, a continuación, el aparato se dejó reposar durante aproximadamente 30 minutos para recuperar el filtrado. El tiempo requerido para la etapa de compresión anterior fue de 40 minutos.

Después de la terminación de la etapa de compresión, se liberó la presión en el diafragma y el tanque, y se recogieron los sólidos obtenidos. La cantidad total del filtrado obtenido fue de 9,0 l. El componente de líquido restante se perdió debido al volumen muerto del aparato. En base a los resultados de la medición de las concentraciones de azúcar en el filtrado obtenido, es decir, el líquido de azúcar primario del ejemplo comparativo 1, la concentración de glucosa fue de 35 g/l y la concentración de xilosa fue 7 g/l. Es decir, en el ejemplo comparativo 1, la producción de glucosa fue 315 g y la producción de xilosa fue de 63 g (tabla 11).

(Ejemplo comparativo 2) Separación sólido-líquido mediante filtración con prensado (separación sólido-líquido y lavado de sólidos después de la hidrólisis primaria)

Utilizando 10 l de líquido de suspensión de sacarificación enzimática obtenido en el ejemplo de referencia 4, se llevó a cabo una filtración con prensado mediante el siguiente procedimiento. La filtración con prensado se llevó a cabo utilizando el mismo aparato que en el ejemplo comparativo 1 y las condiciones de trabajo fueron las mismas que en el ejemplo de referencia 1 hasta la etapa de inyección. En la etapa de compresión, la presión de compresión se aumentó a 0,2 MPa y se recogió el filtrado durante aproximadamente 5 minutos. La cantidad de filtrado recogido en este momento fue de 8 l. En base a los resultados de la medición de las concentraciones de azúcar en el filtrado obtenido, es decir, el líquido de azúcar primario del ejemplo comparativo 2, la concentración de glucosa fue de 35 g/l y la concentración de xilosa fue de 7 g/l. Por lo tanto, en la hidrólisis primaria, la producción de glucosa (producción de azúcar en el líquido de azúcar primario) fue de 280 g y la producción de xilosa fue de 56 g (tabla 11).

Posteriormente, los sólidos restantes en la cámara de la filtración con prensado se lavaron con agua mediante el siguiente procedimiento. Cabe indicar que esta operación no es la hidrólisis secundaria.

Al tanque se añadieron 2,5 l de agua destilada a 18°C y se llevó a cabo la etapa de inyección a una presión de inyección de 0,2 MPa hasta que no se produce más filtrado. A continuación, se llevó a cabo una etapa de compresión mediante el hinchamiento del diafragma unido a la cámara de filtración. La presión de compresión se aumentó gradualmente hasta 0,5 MPa y, a continuación, el aparato se dejó reposar durante aproximadamente 30 minutos para recuperar el filtrado. El tiempo requerido para la etapa de compresión anterior fue de 35 minutos. Después de la terminación de la etapa de compresión, se liberó la presión en el diafragma y el tanque, y se recogieron los sólidos obtenidos. La cantidad total del filtrado obtenido fue de 35 l. El componente de líquido restante se perdió debido al volumen muerto del aparato. En base a los resultados de la medición de las concentraciones de azúcar en el filtrado obtenido, es decir, el líquido de azúcar secundario del ejemplo comparativo 2, la concentración de glucosa fue de 14 g/l y la concentración de xilosa fue de 3,1 g/l. Por lo tanto, la producción de glucosa fue de 49 g y la producción de xilosa fue de 11 g en este momento (tabla 11).

[Tabla 11]

		Hidrólisis primaria (g)	Líquido de lavado de sólidos (g)	Producción total de azúcar (g)
Ejemplo comparativo 1	Glucosa	315	0	315
	Xilosa	63	0	63
Ejemplo comparativo 2	Glucosa	280	49	329
	Xilosa	56	11	67

(Ejemplo 22) Hidrólisis secundaria en la cámara de filtración con prensado

Utilizando 10 l de líquido de suspensión de sacarificación enzimática obtenido en el ejemplo de referencia 5, se llevaron a cabo la separación sólido-líquido y la hidrólisis secundaria mediante el siguiente procedimiento.

Se llevó a cabo una filtración con prensado utilizando el mismo aparato que en el ejemplo comparativo 2 en las mismas condiciones de trabajo. Es decir, la cantidad de filtrado que se pudo recoger fue de 8 l. En base a los resultados de la medición de las concentraciones de azúcar en el filtrado obtenido, es decir, el líquido de azúcar primario del ejemplo 2, la concentración de glucosa fue de 35 g/l y la concentración de xilosa fue de 7 g/l. Por lo tanto, la producción de glucosa fue de 280 g y la producción de xilosa fue de 56 g en este momento. La tabla 12 muestra un resumen de los resultados como la producción de azúcar en el líquido de azúcar primario del ejemplo 22.

Posteriormente, se llevó a cabo la hidrólisis secundaria en la cámara de filtración con prensado mediante el siguiente procedimiento.

Durante la etapa de compresión, se inició la alimentación de 2,5 l de agua destilada al tanque. A continuación, el

tanque se calentó utilizando un calentador de caucho hasta que la temperatura del agua destilada llegó a 50°C. Después del calentamiento, se alimentó el agua caliente a 50°C a la cámara de filtración de la misma manera que el líquido de suspensión. Todo el filtrado obtenido se devolvió al tanque para permitir la circulación. Esta circulación continuó hasta 1 hora después del comienzo de la producción del filtrado. En base al resultado de la medición de la temperatura del filtrado, el filtrado estaba a 40°C después de 10 minutos y se mantuvo constante a 45°C después de 15 minutos y posterior. La presión de inyección se mantuvo constante a 0,15 MPa. Después de 120 minutos, la acción de la parte de filtrado se cambió a extracción, en lugar de circulación al tanque. La etapa de inyección continuó a una presión de inyección de 0,2 MPa hasta que no se produjo más filtrado. Posteriormente, se llevó a cabo una etapa de compresión mediante el hinchamiento del diafragma unido a la cámara de filtración. La presión de compresión se aumentó gradualmente hasta 0,5 MPa y, a continuación, el aparato se dejó reposar durante aproximadamente 30 minutos para recuperar el filtrado. El tiempo requerido para la etapa de compresión anterior fue de 35 minutos. Después de la terminación de la etapa de compresión, se liberó la presión en el diafragma y el tanque, y se recogieron los sólidos obtenidos. La cantidad total del filtrado obtenido fue de 3,5 l. El componente de líquido restante se perdió debido al volumen muerto del aparato. En base a los resultados de la medición de las concentraciones de azúcar en el filtrado obtenido, la concentración de glucosa fue de 28 g/l y la concentración de xilosa fue de 5 g/l. Por lo tanto, la producción de glucosa fue de 98 g y la producción de xilosa fue de 17,5 g en este momento. La tabla 12 muestra un resumen de los resultados como la producción de azúcar en el líquido de azúcar secundario obtenido mediante la hidrólisis secundaria y la separación sólido-líquido secundario en el ejemplo 22.

[Tabla 12]

		Hidrólisis primaria (g)	Hidrólisis secundaria (g)	Producción total de azúcar (g)
Ejemplo 22	Glucosa	280	98	378
	Xilosa	56	17,5	73,5

La comparación de los resultados del ejemplo comparativo 1 y el ejemplo comparativo 2, en el que la hidrólisis secundaria no se llevó a cabo, con los resultados del ejemplo 22 que se muestran en la tabla 12, reveló que la producción de azúcar se puede aumentar en gran medida llevando a cabo la hidrólisis secundaria de la presente invención.

(Ejemplo 7) Cantidad de recuperación de la carbohidrasa obtenida mediante hidrólisis secundaria en la cámara de filtración con prensado

Se mezclaron el líquido de azúcar primario (6 ml) y el líquido de azúcar secundario (6 ml) obtenidos en el ejemplo 22 y se recuperó la carbohidrasa del líquido de azúcar resultante. Para la comparación, se mezclaron el líquido de azúcar primario (6 ml) y el líquido de lavado de los sólidos (6 ml) obtenidos en el ejemplo comparativo 2, y también se recuperó la carbohidrasa del líquido de azúcar resultante. El líquido de azúcar se filtró a través de una membrana de ultrafiltración que tenía un punto de corte de peso molecular de 10.000 (VIVASPIN 20, fabricado por Sartorius stedim biotech, material: PES) mediante centrifugación a 4.500 G hasta que la fracción de membrana se redujo a 1 ml. A la fracción de membrana, se añadieron 10 ml de agua destilada y la mezcla resultante se centrifugó de nuevo a 4.500 G hasta que la fracción de membrana se redujo a 1 ml. A continuación, la enzima se recuperó de la fracción de membrana. La concentración de proteína de la enzima recuperada se midió con el kit de medición de BCA (kit de reactivos de ensayo de la proteína BCA, fabricado por PIERCE) utilizando albúmina bovina (2 mg/ml) como una muestra estándar, mediante la medición de la absorbancia a 562 nm para realizar una colorimetría. La concentración de la enzima que pudo recuperarse (mg/ml) se multiplicó por 1 ml, que era la cantidad de la solución en la fracción de membrana, para calcular la cantidad de carbohidrasa que pudo recuperarse. Como resultado, tal como se muestra en la tabla 13, se pudo confirmar que la cantidad de carbohidrasa recuperada se incrementa mediante el efecto producido por el paso de agua caliente en el ejemplo 22 con relación a la cantidad de la enzima recuperada del líquido de azúcar del ejemplo comparativo 2.

[Tabla 13]

	Cantidad de enzima recuperada (mg) 50°C
Ejemplo comparativo 2	1,6
Ejemplo 22	3,9

(Ejemplo 8) Recuperación y reutilización de carbohidrasa

Se mezclaron el líquido de azúcar primario (8 l) y el líquido de azúcar secundario (3,5 l) obtenidos en cada uno del ejemplo comparativo 2 y el ejemplo 22, y se recuperó la carbohidrasa de 11,5 l de cada una de estas mezclas resultantes. La recuperación de la carbohidrasa se llevó a cabo utilizando un dispositivo de filtración de membrana plana compacta (SEPA (marca registrada) CF II Med/High Foulant System, fabricado por GE) equipado con una membrana de ultrafiltración plana que tiene un punto de corte de peso molecular de 10.000 (SEPA serie PW, fabricada por GE, material de la superficie funcional: poliéter sulfona). Mientras se controlaba la presión de trabajo, de manera que el caudal en la parte de alimentación era constantemente de 2,5 l/minuto y el flujo de membrana era constantemente de 0,1 m/D., se filtraron 11 l de 11,5 l. Por lo tanto, se recuperaron 0,5 l de carbohidrasa de la parte de alimentación. Posteriormente, se añadió la enzima recuperada obtenida en una cantidad de 0,5 l a la celulosa

pretratada 3 (1 kg) y se añadió adicionalmente a la misma agua destilada, de manera que el peso total llegó a ser de 10 kg. Además, se añadió a la misma ácido sulfúrico diluido o sosa cáustica diluida para ajustar el pH de la composición a un valor dentro del intervalo de 4,5 a 5,3. Mientras se incubaba el líquido, de manera que se mantenía una temperatura del líquido de 45 a 50°C, y se añadió o añadieron ácido sulfúrico diluido y/o sosa cáustica diluida al líquido, de manera que el pH se mantuvo dentro del intervalo de 4,5 a 5,3, la enzima se dejó reaccionar con la celulosa pretratada 3 durante 24 horas. Como resultado, tal como se muestra en la tabla 14, se pudo confirmar que la producción de azúcar en el caso en que se utilizó la enzima recuperada de los líquidos de azúcar (primario y secundario) del ejemplo 22 era mayor que la producción de azúcar en el caso en que se utilizó enzima recuperada de los líquidos de azúcar (primario y secundario) del ejemplo comparativo 2.

[Tabla 14]

		Concentración de azúcar (g/l) 24 h	Producción de azúcar (mg) (24 h, 6 ml)
Ejemplo comparativo 2	Glucosa	10	60
	Xilosa	2	12
Ejemplo 22	Glucosa	27	162
	Xilosa	4	24

(Ejemplo 9) Concentración del líquido de azúcar primario y del líquido de azúcar secundario con membrana de ósmosis inversa (membrana de RO)

Se concentraron cada uno de los líquidos de azúcar primario y secundario en el ejemplo 22 en una cantidad de 1 l con una membrana de ósmosis inversa (membrana de RO). En primer lugar, cada uno de los líquidos de azúcar primario y secundario se prefiltró a través de una membrana de microfiltración que tenía un tamaño de poro de 0,45 µm. Cada uno de los líquidos procesados por la membrana obtenidos en una cantidad de 1 l se utilizó para realizar la concentración con una membrana de RO. Como membrana de RO, se utilizó una membrana de ósmosis inversa totalmente aromática reticulada "UTC80" (fabricada por Toray Industries, Inc.). La membrana de RO se montó sobre un dispositivo de filtración de membrana plana compacta (SEPA (marca registrada) CF II Med/High Foulant System, fabricado por GE) y el tratamiento de filtración se llevó a cabo a una temperatura del líquido en bruto de 25°C y a una presión de 3 MPa utilizando una bomba de alta presión. Mediante este tratamiento, se obtuvieron 0,7 l de permeado. Las concentraciones de glucosa y xilosa en este momento fueron tal como se muestra en la tabla 15 y se pudo confirmar que las concentraciones de azúcar en el líquido de azúcar primario y el líquido de azúcar secundario se pueden aumentar mediante la concentración con una membrana de RO.

[Tabla 15]

		No tratado (g/l)	Después de la concentración con una membrana de RO (g/l)	Índice (factor) de concentración
Líquido de azúcar primario	Glucosa	35	115	3,3
	Xilosa	7	23	3,3
Líquido de azúcar secundario	Glucosa	28	92	3,3
	Xilosa	5	16	3,2

(Ejemplo 10) Concentración del líquido de azúcar primario y del líquido de azúcar secundario con membrana de nanofiltración (membrana de NF)

Se concentraron cada uno de los líquidos de azúcar primario y secundario en el ejemplo 8 en una cantidad de 1 l con una membrana de nanofiltración (membrana de NF).

En primer lugar, cada uno de los líquidos de azúcar primario y secundario se prefiltró a través de una membrana de microfiltración que tenía un tamaño de poro de 0,45 µm. Cada uno de los líquidos procesados por la membrana obtenidos en una cantidad de 1 l se utilizó para realizar la concentración con una membrana de NF. Como membrana de NF, se utilizó una membrana de nanofiltración de piperazina poliamida reticulada "UTC60" (fabricada por Toray Industries, Inc.). La membrana de NF se montó sobre un dispositivo de filtración de membrana plana compacta (SEPA (marca registrada) CF II Med/High Foulant System, fabricado por GE) y el tratamiento de filtración se llevó a cabo a una temperatura del líquido en bruto de 25°C y a una presión de 3 MPa utilizando una bomba de alta presión. Mediante este tratamiento, se obtuvieron 0,7 l de permeado. Las concentraciones de glucosa y xilosa en este momento fueron tal como se muestra en la tabla 16 y se pudo confirmar que las concentraciones de azúcar en el líquido de azúcar primario y el líquido de azúcar secundario se pueden aumentar mediante la concentración con una membrana de NF.

[Tabla 16]

		No tratado (g/l)	Después de la concentración con una membrana de NF (g/l)	Índice (factor) de concentración
Líquido de azúcar primario	Glucosa	35	112	3,2
	Xilosa	7	20	2,8

		No tratado (g/l)	Después de la concentración con una membrana de NF (g/l)	Índice (factor) de concentración
Líquido de azúcar secundario	Glucosa	28	90	3,2
	Xilosa	5	14	2,8

(Ejemplo comparativo 3) Separación sólido-líquido mediante centrifugación (separación sólido-líquido después de la hidrólisis primaria)

5 Utilizando 10 l del líquido de suspensión de sacarificación enzimática obtenido en el ejemplo 7, se llevó a cabo una centrifugación mediante el siguiente procedimiento.

A cada uno de 25 tubos de centrífuga de 500 ml, se alimentaron 400 ml de la suspensión de sacarificación enzimática y la suspensión se sometió a centrifugación a 3.000 G durante 10 minutos. De cada tubo de centrífuga, se pudieron recoger 240 ml del sobrenadante y, por lo tanto, se pudieron recoger un total de 6 l del sobrenadante de los 25 tubos de centrífuga. Los 160 ml restantes (4 l en total) del contenido en cada tubo de centrífuga se consideraron como el sólido en el tubo de centrífuga y se recogieron. En base a los resultados de la medición de las concentraciones de azúcar en el filtrado obtenido, es decir, el líquido de azúcar primario del ejemplo 8, la concentración de glucosa fue de 35 g/l y la concentración de xilosa fue de 7 g/l. Por lo tanto, en el caso en que el azúcar se obtuvo mediante centrifugación para la separación sólido-líquido, la producción de glucosa (producción de azúcar en el líquido de azúcar primario) fue de 210 g y la producción de xilosa fue de 42 g (tabla 17).

(Ejemplo comparativo 4) Separación sólido-líquido mediante centrifugación (separación sólido-líquido y lavado de sólidos después de la hidrólisis primaria)

20 Utilizando 10 l del líquido de suspensión de sacarificación enzimática obtenido en el ejemplo 7, se llevó a cabo una centrifugación mediante el siguiente procedimiento.

25 A cada uno de 25 tubos de centrífuga de 500 ml, se alimentaron 400 ml de la suspensión de sacarificación enzimática y la suspensión se sometió a centrifugación de la misma manera que en el ejemplo comparativo 3. Se pudieron recoger un total de 6 l del sobrenadante.

30 Los 160 ml restantes (4 l en total) del contenido en cada tubo de centrífuga se consideraron como el sólido en el tubo de centrífuga y se recogieron. En base a los resultados de la medición de las concentraciones de azúcar en el filtrado obtenido, es decir, el líquido de azúcar primario del ejemplo 8, la concentración de glucosa fue de 35 g/l y la concentración de xilosa fue de 7 g/l. Por lo tanto, en el caso en que el azúcar se obtuvo mediante centrifugación para la separación sólido-líquido, la producción de glucosa (producción de azúcar en el líquido de azúcar primario) fue de 210 g y la producción de xilosa fue de 42 g (tabla 17).

35 Posteriormente, los sólidos restantes se lavaron con agua mediante el siguiente procedimiento. Cabe indicar que esta operación no es la hidrólisis secundaria.

40 A los sólidos recogidos mediante centrifugación, se añadió agua y se llevó a cabo de nuevo una centrifugación para realizar una separación sólido-líquido, recogiendo, de este modo, el líquido de azúcar. Al componente precipitado en una cantidad de 160 ml restante en cada uno de los 25 tubos de centrifugación, se añadieron 100 ml de agua destilada. La temperatura del agua destilada en este momento fue de 18°C. Después de la adición de agua, los tubos de centrífuga se hicieron girar suavemente para mezclar su contenido y se centrifugaron de nuevo a 3.000 G durante 10 minutos. A continuación, se pudieron recoger 150 ml del sobrenadante de cada tubo de centrífuga. Es decir, se pudo recoger un total de 3,75 l del sobrenadante de los 25 tubos de centrífuga. En base a los resultados de la medición de las concentraciones de azúcar en el sobrenadante obtenido, es decir, el líquido de azúcar secundario del ejemplo comparativo 4, la concentración de glucosa fue de 21 g/l y la concentración de xilosa fue de 4 g/l. Por lo tanto, la producción de glucosa fue de 79 g y la producción de xilosa fue de 15 g en este momento (tabla 17).

[Tabla 17]

		Hidrólisis primaria (g)	Líquido de lavado de sólidos (g)	Producción total de azúcar (g)
Ejemplo comparativo 3	Glucosa	210	0	210
	Xilosa	42	0	42
Ejemplo comparativo 4	Glucosa	210	79	289
	Xilosa	42	15	57

50 (Ejemplo 11) Separación sólido-líquido mediante centrifugación (hidrólisis primaria e hidrólisis secundaria)

55 Utilizando 10 l del líquido de suspensión de sacarificación enzimática obtenido en el ejemplo de referencia 5, se llevó a cabo una centrifugación mediante el siguiente procedimiento.

A cada uno de 25 tubos de centrífuga de 500 ml, se alimentaron 400 ml de la suspensión de sacarificación enzimática y la suspensión se sometió a centrifugación de la misma manera que en el ejemplo comparativo 3. Se pudieron recoger un total de 6 l del sobrenadante.

5 Posteriormente, se llevó a cabo la hidrólisis secundaria de los sólidos restantes mediante el siguiente procedimiento. A cada uno de 25 tubos de centrífuga de 500 ml, se alimentaron 400 ml de la suspensión de sacarificación enzimática y la suspensión se sometió a centrifugación a 3.000 G durante 10 minutos. Después de la centrifugación, se pudieron recoger 240 ml del sobrenadante de cada tubo de centrífuga. Es decir, se pudo recoger un total de 6 l del sobrenadante de los 25 tubos de centrífuga. Los 160 ml restantes (4 l en total) del contenido en cada tubo de centrífuga se consideraron como el componente precipitado en el tubo de centrífuga y se recogieron. En base a los resultados de la medición de las concentraciones de azúcar en el filtrado obtenido, es decir, el líquido de azúcar primario del ejemplo 11, la concentración de glucosa fue de 35 g/l y la concentración de xilosa fue de 7 g/l. Por lo tanto, en el caso en que el azúcar se obtuvo mediante centrifugación para la separación sólido-líquido, la producción de glucosa (producción de azúcar en el líquido de azúcar primario) fue de 210 g y la producción de xilosa fue de 42 g. Estos resultados se resumen en la tabla 17 como la producción de azúcar en el caso de la hidrólisis primaria (producción de azúcar en el líquido de azúcar primario).

Al componente precipitado recogido mediante centrifugación, se añadió agua y se llevó a cabo de nuevo una centrifugación para realizar una separación sólido-líquido, recogiendo, de este modo, el líquido de azúcar. Al componente precipitado en una cantidad de 160 ml restante en cada uno de los 25 tubos de centrifugación, se añadieron 100 ml de agua destilada precalentada a 50°C. A continuación, los tubos de centrífuga se hicieron girar suavemente para mezclar su contenido y se dejaron reposar en una incubadora mantenida a 50°C durante 1 hora. Posteriormente, los tubos de centrífuga se hicieron girar suavemente para mezclar su contenido y se centrifugaron de nuevo a 3.000 G durante 10 minutos. De este modo, se pudieron recoger 150 ml del sobrenadante de cada tubo de centrífuga. Es decir, se pudo recoger un total de 3,75 l del sobrenadante de los 25 tubos de centrífuga. En base a los resultados de la medición de las concentraciones de azúcar en el sobrenadante obtenido, es decir, el líquido de azúcar secundario del ejemplo 11, la concentración de glucosa fue de 29 g/l y la concentración de xilosa fue de 5 g/l. Por lo tanto, la producción de glucosa fue de 109 g y la producción de xilosa fue de 19 g en este momento (tabla 18).

[Tabla 18]

		Hidrólisis primaria (g)	Hidrólisis secundaria (g)	Producción total de azúcar (g)
Ejemplo 11	Glucosa	210	109	319
	Xilosa	42	19	61

En base a la comparación de los resultados del ejemplo comparativo 3 y el ejemplo comparativo 4 que se muestran en la tabla 17, en los que no se llevó a cabo la hidrólisis secundaria, con los resultados del ejemplo 11 que se muestran en la tabla 18, se reveló que la producción de azúcar puede aumentarse en gran medida llevando a cabo la hidrólisis secundaria de la presente invención. Sin embargo, en base a la comparación de los resultados del ejemplo 11 con los resultados del ejemplo 22, en el que la separación sólido-líquido se llevó a cabo mediante filtración con prensado, se reveló que la producción en azúcar es más baja en los casos en que la separación de líquidos se lleva a cabo mediante centrifugación, tal como puede observarse mediante la comparación entre la tabla 12 y la tabla 18. Esto es principalmente porque se puede conseguir una eficacia de recuperación de azúcar más elevada mediante separación sólido-líquido mediante filtración con prensado que mediante centrifugación.

(Ejemplo 12) Actividad de degradación de celulosa de la enzima recuperada en la hidrólisis secundaria

45 La hidrólisis secundaria se llevó a cabo en las condiciones del ejemplo 1 (celulosa pretratada 3, 50°C), el ejemplo 2 (celulosa pretratada 3, 25°C) y el ejemplo 6 (celulosa pretratada 3, Pluronic F68: 0,1%, 0,25%, 0,5%, 1%, 2%) y se midió la actividad de la celulasa de cada enzima recuperada mediante el procedimiento del ejemplo de referencia 4. La tabla 19 muestra un resumen de los valores de actividad representados como valores relativos calculados utilizando como patrón la actividad de la enzima recuperada después de la hidrólisis secundaria en las condiciones del ejemplo 1 (50°C) (actividad = 1). La actividad de degradación de xilano no se pudo detectar para algunas condiciones y se representó como ND (no detectada) en dichos casos. Dado que la actividad de degradación de xilano era ND también para el ejemplo 1, que se iba a utilizar como patrón, la actividad de degradación de xilano observada con Pluronic F68: 0,5% para el ejemplo 6 se definió como 1 para describir las actividades relativas.

[Tabla 19]

Condiciones \ Actividad	pH	Actividad de degradación de Avicel	Actividad de degradación de CMC	Actividad de degradación de celobiosa	Actividad de degradación de xilano	
Ejemplo 1 (50°C)	5,0	1	1	1	ND	
Ejemplo 2 (25°C)	5,0	ND	ND	ND	ND	
Ejemplo 6 (50°C, Pluronic F-68)	0,1%	5,0	1,8	1,2	1,2	ND
	0,25%	5,0	1,9	1,4	1,5	ND
	0,5%	5,0	2,3	1,4	1,5	1
	1%	5,0	3,0	1,4	1,7	1,3
	2%	5,0	3,2	1,5	1,9	1,5

No se observó actividad de celulasa para la enzima recuperada para las condiciones a 25°C (ejemplo 2). Por otro lado, todas las actividades de celulasa fueron mayores en las enzimas recuperadas para las condiciones a 50°C, especialmente a 50°C en presencia del surfactante no iónico (Pluronic F-68) (ejemplo 6).

(Ejemplo comparativo 5) Efecto de la adición de surfactantes catiónicos o aniónicos

Como compuesto que se añade para la hidrólisis secundaria, se utilizó lauril sulfato de sodio (SDS), que es un surfactante aniónico, o cloruro de benzalconio al 1%, que es un surfactante catiónico. La hidrólisis secundaria se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 (celulosa pretratada 3), excepto que el surfactante se añadió de manera que su concentración final fue de 1%. La enzima recuperada se obtuvo mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 1 y se midió la actividad de celulasa de la enzima recuperada, pero la actividad no se pudo detectar para ninguna de las condiciones. Por lo tanto, se pudo confirmar que, a efectos de recuperar la enzima manteniendo al mismo tiempo su actividad, no se puede utilizar ni un surfactante catiónico ni un surfactante aniónico.

(Ejemplo 13) Relación entre el tipo de sal inorgánica en la hidrólisis secundaria y la actividad de la enzima recuperada

Como compuestos que se añaden para la hidrólisis secundaria, se utilizaron diversas sales inorgánicas (cloruro de sodio, acetato de sodio, sulfato de sodio, hidrogenosulfato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de sodio, cloruro de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio, cloruro de amonio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio y cloruro de calcio). La hidrólisis secundaria se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 (celulosa pretratada 3), excepto que cada una de las sales inorgánicas se añadió de manera que su concentración final fue del 1%. El pH después de la adición se ajustó con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico hasta un valor dentro del intervalo de 5,5 a 6,0. El experimento se llevó a cabo en las mismas condiciones que en el ejemplo 1 (a 50°C, durante 1 hora), excepto por la adición de una sal inorgánica. La tabla 20 muestra un resumen de los valores de actividad representados como valores relativos calculados utilizando como patrón la actividad de la enzima recuperada después de la hidrólisis secundaria en las condiciones del ejemplo 1 (celulosa pretratada 3, 50°C) (actividad = 1). La actividad de degradación de xilano no se pudo detectar para algunas condiciones y se representó como ND (no detectada) en dichos casos. Dado que la actividad de degradación de xilano era ND también para el ejemplo 1, que se iba a utilizar como patrón, la actividad de degradación de xilano observada en el caso de hidrogenofosfato de dipotasio en el ejemplo 5 se definió como 1 para la descripción de las actividades relativas.

[Tabla 20]

Condiciones \ Actividad	pH	Actividad de degradación de Avicel	Actividad de degradación de CMC	Actividad de degradación de celobiosa	Actividad de degradación de xilano
Ejemplo 1	5,0	1 (Patrón)	1 (Patrón)	1 (Patrón)	ND
Cloruro de sodio	5,8	15	3,3	2,5	3
Acetato de sodio	5,9	3,7	2,8	1,5	1,5
Sulfato de sodio	6,0	12	3,3	1,8	1,5
Hidrogenosulfato de sodio	6,0	11	3,0	1,4	1,1
Dihidrogenofosfato de sodio	5,9	4,5	3,0	1,4	1,1
Hidrogenofosfato de sodio	6,0	5	3,3	1,9	2,5
Cloruro de potasio	6,1	5	3,3	1,9	2,5
Hidrogenofosfato de dipotasio	6,0	3	2	1,4	1 (Patrón)
Cloruro de amonio	6,0	7	3,3	2,2	3,3
Cloruro de magnesio	5,8	30	3,3	4,3	5,5

Actividad Condiciones	pH	Actividad de degradación de Avicel	Actividad de degradación de CMC	Actividad de degradación de celobiosa	Actividad de degradación de xilano
Sulfato de magnesio	5,7	15	3,3	2,4	5,5
Cloruro de calcio	5,6	ND	ND	ND	ND
Sulfato de calcio	-	No realizable	No realizable	No realizable	No realizable
Hidrogenocarbonato de calcio	-	No realizable	No realizable	No realizable	No realizable

Como resultado, tal como se muestra en la tabla 20, se reveló que la cantidad de enzima recuperada tiende a ser mayor en los casos en que se añadió una sal inorgánica que en los casos en que no se añadió sal inorgánica. Sin embargo, se reveló que la enzima recuperada casi no muestra las actividades en el caso de cloruro de calcio, que es una sal inorgánica de calcio. También se estudiaron el sulfato de calcio y el hidrogenocarbonato de calcio, que también son sales de calcio, pero el experimento no pudo llevarse a cabo ya que estas sales no se podían disolver a la concentración predeterminada (1%, concentración final) a causa de su baja solubilidad en agua. Por lo tanto, se reveló que las sales inorgánicas de calcio, entre las sales inorgánicas, no son adecuadas como compuesto que se añada para la hidrólisis secundaria de la presente invención.

(Ejemplo 14) Influencia de la concentración de sal inorgánica añadida en la hidrólisis secundaria

La influencia de la concentración de la sal inorgánica añadida fue confirmada utilizando cloruro de sodio, que es una sal de sodio. Mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 13, se llevó a cabo la hidrólisis secundaria a concentraciones de cloruro de sodio del 0%, 0,1%, 0,5%, 1% y 5%, y se midió la actividad de degradación de celulosa de la enzima recuperada de forma similar al ejemplo de referencia 5. La tabla 21 muestra un resumen de los valores de actividad representados como valores relativos calculados utilizando como patrón la actividad de la enzima recuperada después de la hidrólisis secundaria en las condiciones del ejemplo 1 (50°C) (actividad = 1). La actividad de degradación de xilano no se pudo detectar para algunas condiciones y se representó como ND (no detectada) en dichos casos. Dado que la actividad de degradación de xilano era ND también para el ejemplo 1, que se iba a utilizar como patrón, la actividad de degradación de xilano observada con cloruro de sodio al 0,5% se definió como 1 para la descripción de las actividades relativas.

[Tabla 21]

Actividad Condiciones	Actividad de degradación de Avicel	Actividad de degradación de CMC	Actividad de degradación de celobiosa	Actividad de degradación de xilano
Ejemplo 1	1 (Patrón)	1 (Patrón)	1 (Patrón)	ND
0,1%	2,8	1,3	1,5	ND
0,5%	7,8	2,4	1,8	1 (Patrón)
1% (Ejemplo 13)	15	3,3	2,5	3
5%	20	4,2	2,5	8

Tal como se muestra en la tabla 21, se reveló que la adición de cloruro de sodio como sal inorgánica a una concentración, aún tan baja como el 0,1% aumenta la actividad de degradación de Avicel de la enzima recuperada, y la adición de cloruro de sodio a una concentración no inferior al 0,5% aumenta en gran medida todas las actividades de degradación en comparación con el caso en que no se añadió cloruro de sodio.

(Ejemplo 15) Relación entre la adición de sal inorgánica y la temperatura de la hidrólisis secundaria

La hidrólisis secundaria se llevó a cabo en presencia de cloruro de sodio al 1% a temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C y 60°C, y se midió la actividad de la enzima recuperada. La tabla 22 muestra un resumen de los valores de actividad representados como valores relativos calculados utilizando como patrón la actividad de la enzima recuperada después de la hidrólisis secundaria en las condiciones del ejemplo 1 (celulosa pretratada 3, 50°C) (actividad = 1). La actividad de degradación de xilano no se pudo detectar para algunas condiciones y se representó como ND (no detectada) en dichos casos. Dado que la actividad de degradación de xilano era ND también para el ejemplo 1, que se iba a utilizar como patrón, la actividad de degradación de xilano observada con cloruro de sodio al 1% a 60°C se definió como 1 para la descripción de las actividades relativas.

[Tabla 22]

Actividad Condiciones	Actividad de degradación de Avicel	Actividad de degradación de CMC	Actividad de degradación de celobiosa	Actividad de degradación de xilano
Ejemplo 1	1 (Patrón)	1 (Patrón)	1 (Patrón)	ND
30°C	4,4	3,0	2,0	3
40°C	7,4	3,3	2,1	3,2

Actividad Condiciones	Actividad de degradación de Avicel	Actividad de degradación de CMC	Actividad de degradación de celobiosa	Actividad de degradación de xilano
50°C (Ejemplo 13)	15	3,3	2,5	3
60x:	2,8	3,0	2,1	1 (Patrón)

Tal como se muestra en la tabla 22, se reveló que, en presencia de cloruro de sodio, especialmente la actividad de degradación de Avicel tiende a aumentar a medida que la temperatura se aproxima a 50°C, pero la actividad, en cambio, disminuye a 60°C. Con respecto a la actividad de degradación de CMC y la actividad de degradación de celobiosa, no se pudo observar un aumento dependiente de la temperatura en la cantidad de recuperación, y las actividades de degradación no disminuyeron incluso a una temperatura superior a 60°C. Con respecto a la actividad de degradación de xilano, se reveló que la actividad de degradación de la enzima recuperada es mayor a temperaturas dentro del intervalo de 30°C a 50°C, pero la actividad disminuye drásticamente a 60°C.

10 (Ejemplo 16) Utilización de agua de mar como sal inorgánica en la hidrólisis secundaria

En los ejemplos 13 a 15, se pudo confirmar que la adición de una sal inorgánica puede aumentar la cantidad y la actividad de la enzima recuperada. En vista de esto, se realizó un estudio a efectos de observar si el "agua de mar", que es una solución acuosa que contiene sales inorgánicas, se puede utilizar como una alternativa. Como agua de mar, se utilizó agua de mar recogida cerca del puerto pesquero Misaki en la prefectura de Kanagawa; (pH 8,3; cantidad de sólido disuelto, 3,2%). El pH del agua de mar se ajustó con ácido sulfúrico a pH 6,5 (adición de 24 mg de ácido sulfúrico por 1 l de agua de mar), pH 5,0 (adición de 50 mg de ácido sulfúrico por 1 l de agua de mar) o pH 3,8 (adición de 100 mg de ácido sulfúrico por 1 l de agua de mar). Con respecto a la cantidad del agua de mar para la hidrólisis secundaria, se añadió el agua de mar a los sólidos, de manera que su concentración final fue del 50% (tasa de dilución, 1/2). La hidrólisis secundaria se llevó a cabo a 50°C durante 1 hora. La tabla 23 muestra las actividades de la enzima que podría recuperarse. La tabla resume los valores de actividad representados como valores relativos calculados utilizando como patrón la actividad de la enzima recuperada después de la hidrólisis secundaria en las condiciones del ejemplo 1 (celulosa, producto pretratado 3, 50°C) (actividad = 1). La actividad de degradación de xilano no se pudo detectar para algunas condiciones y se representó como ND (no detectada) en dichos casos. Dado que la actividad de degradación de xilano era ND también para el ejemplo 1 (celulosa, producto pretratado 3, 50°C), que se iba a utilizar como patrón, la actividad de degradación de xilano observada en el caso del agua de mar a pH 3,8 se definió como 1 para la descripción de las actividades relativas.

[Tabla 23]

Actividad Condiciones	Actividad de degradación de Avicel	Actividad de degradación de CMC	Actividad de degradación de celobiosa	Actividad de degradación de xilano
Ejemplo 1	1 (Patrón)	1 (Patrón)	1 (Patrón)	ND
Agua de mar	pH 8,3	12	3,0	2,3
	pH 6,5	15	3,3	2,3
	pH 5,0	18	3,3	2,5
	pH 3,8	2,2	2,0	2,2
				1 (Patrón)

Tal como se muestra en la tabla 23, se pudo confirmar que también en los casos en que se utilizó agua de mar como sal inorgánica, aumenta la actividad de celulosa en la enzima recuperada. Además, se reveló que las actividades de degradación muestran tendencias similares a las de los casos en que se utilizó una sal inorgánica reactiva, tal cloruro de sodio. Sin embargo, se demostró que la actividad de degradación de Avicel es inferior a pH 3,8 que a otros pH.

(Ejemplo 17) Relación entre la adición de agua de mar y la temperatura de la hidrólisis secundaria

La hidrólisis secundaria se llevó a cabo a temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C y 60°C en presencia de agua de mar a pH 5,0, que mostró el mayor efecto de adición entre las aguas de mar, y se midió la actividad de la enzima recuperada. La tabla 24 muestra un resumen de los valores de actividad representados como valores relativos calculados utilizando como patrón la actividad de la enzima recuperada después de la hidrólisis secundaria en las condiciones del ejemplo 1 (celulosa pretratada 3, 50°C) (actividad = 1). La actividad de degradación de xilano no se pudo detectar para algunas condiciones y se representó como ND (no detectada) en dichos casos. Dado que la actividad de degradación de xilano era ND también para el ejemplo 1 (celulosa, producto pretratado 3, 50°C), que se iba a utilizar como patrón, la actividad de degradación de xilano observada en el caso del agua de mar a 60°C se definió como 1 para la descripción de las actividades relativas.

[Tabla 24]

Actividad Condiciones	Actividad de degradación de Avicel	Actividad de degradación de CMC	Actividad de degradación de celobiosa	Actividad de degradación de xilano
Ejemplo 1	1 (Patrón)	1 (Patrón)	1 (Patrón)	ND
30°C	4,4	3,0	2,0	3
40°C	7,4	3,3	2,1	3,2
50°C (Ejemplo 16)	18	3,3	3,0	3
60°C	2,8	3,0	2,1	1 (Patrón)

Tal como se muestra en la tabla 24, se reveló que, en presencia de agua de mar, especialmente la actividad de degradación de Avicel tiende a aumentar a medida que la temperatura se aproxima a 50°C, pero la actividad, en cambio, disminuye a 60°C. Con respecto a la actividad de degradación de CMC y la actividad de degradación de celobiosa, no se pudo observar un aumento dependiente de la temperatura en la cantidad de recuperación, y las actividades de degradación no disminuyeron incluso a una temperatura superior a 60°C. Con respecto a la actividad de degradación de xilano, se reveló que la actividad de degradación de la enzima recuperada es mayor a temperaturas dentro del intervalo de 30°C a 50°C, pero la actividad disminuye drásticamente a 60°C. Dichas tendencias fueron similares a las observadas en el ejemplo 15 en el que se utilizó cloruro de sodio.

(Ejemplo 18) Relación entre la cantidad de adición de aminoácido en la hidrólisis secundaria y la cantidad de enzima recuperada

Como compuestos que se añaden para la hidrólisis secundaria, se utilizaron diversos aminoácidos (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina). La hidrólisis secundaria se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 (celulosa pretratada 3, 50°C), excepto que cada uno de los aminoácidos se añadió a una concentración final del 1%. El ácido aspártico y la tirosina no se pudieron disolver a la concentración predeterminada y, por lo tanto, no se pudo conseguir la concentración final del 1%. El pH después de la adición se ajustó con ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio hasta un valor dentro del intervalo de 5,5 a 6,5. El experimento se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto por la adición del aminoácido. La tabla 25 muestra un resumen de los valores de actividad representados como valores relativos calculados utilizando como patrón la actividad de la enzima recuperada después de la hidrólisis secundaria en las condiciones del ejemplo 1 (celulosa, producto pretratado 3, 50°C) (actividad = 1). La actividad de degradación de xilano no se pudo detectar para algunas condiciones y se representó como ND (no detectada) en dichos casos. Dado que la actividad de degradación de xilano era ND también para el ejemplo 1 (celulosa, producto pretratado 3, 50°C), que se iba a utilizar como patrón, la actividad de degradación de xilano detectable observada tras la utilización de lisina se definió como 1 para la descripción de las actividades relativas.

[Tabla 25]

Actividad Condiciones	pH	Actividad de degradación de Avicel	Actividad de degradación de CMC	Actividad de degradación de celobiosa	Actividad de degradación de xilano
Ejemplo 1	5,0	1 (Patrón)	1 (Patrón)	1 (Patrón)	ND
Alanina	6,2	1,2	1,1	1,1	ND
Arginina	5,6	3,7	1,3	1,3	ND
Asparagina	5,5	1,3	1,1	1,1	ND
Ácido aspártico	-	No realizable	No realizable	No realizable	No realizable
Cisteína	6,5	7,4	1,4	1,4	ND
Glutamina	5,4	1,2	1,1	1,1	ND
Ácido glutámico	6,0	1,7	1,1	1,1	ND
Glicina	6,0	1,2	1,1	1,1	ND
Isoleucina	6,0	3,1	1,2	1,2	1
Isoleucina	6,0	1,2	1,1	1,1	ND
Leucina	6,0	1,2	1,1	1,1	ND
Lisina	5,6	3,8	1,3	1,3	1 (Patrón)
Metionina	5,8	1,2	1,1	1,1	ND
Fenilalanina	5,8	1,2	1,1	1,1	ND
Prolina	6,1	1,2	1,1	1,1	ND
Serina	5,8	1,2	1,1	1,1	ND
Treonina	5,7	1,2	1,1	1,1	ND
Triptófano	5,7	1,2	1,1	1,1	ND
Tirosina	-	No realizable	No realizable	No realizable	No realizable
Valina	5,7	1,2	1,1	1,1	ND

Como resultado, tal como se muestra en la tabla 25, se reveló que la adición de los aminoácidos tiende a aumentar la cantidad de la enzima recuperada en comparación con el caso en que no se añadió aminoácido. Además, se reveló que, mediante la adición de, especialmente, ácido glutámico, lisina, histidina, arginina o cisteína, entre los aminoácidos, se puede aumentar la actividad de la enzima recuperada. Se pudo confirmar que el efecto de la adición de cisteína es especialmente elevado con respecto a la actividad de degradación de Avicel. Además, se pudo confirmar que la actividad de degradación de xilano se puede aumentar especialmente mediante la adición de lisina o histidina.

(Ejemplo 19) Relación entre la adición de aminoácido y la temperatura de la hidrólisis secundaria

La hidrólisis secundaria se llevó a cabo a temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C y 60°C en presencia del 1% de cisteína, que mostró el mayor efecto de adición entre los aminoácidos, y se midió la actividad de la enzima recuperada. La tabla 26 muestra un resumen de los valores de actividad representados como valores relativos calculados utilizando como patrón la actividad de la enzima recuperada después de la hidrólisis secundaria en las condiciones del ejemplo 1 (celulosa pretratada 3, 50°C) (actividad = 1). La actividad de degradación de xilano no se pudo detectar para ninguna de las condiciones y se representó como ND (no detectada).

[Tabla 26]

Condiciones \ Actividad	Actividad de degradación de Avicel	Actividad de degradación de CMC	Actividad de degradación de celobiosa	Actividad de degradación de xilano
Ejemplo 1	1 (Patrón)	1 (Patrón)	1 (Patrón)	ND
30°C	3,4	1,2	1,2	ND
40°C	6,8	1,2	1,4	ND
50°C (Ejemplo 18)	7,4	1,4	1,4	ND
60°C	1,5	1	1	ND

Tal como se muestra en la tabla 26, se reveló que, en presencia de cisteína, especialmente la actividad de degradación de Avicel tiende a aumentar a medida que la temperatura se aproxima a 50°C, pero la actividad, en cambio, disminuye a 60°C. Con respecto a la actividad de degradación de CMC y la actividad de degradación de celobiosa, no se pudo observar un aumento dependiente de la temperatura en la cantidad de recuperación, y las actividades de degradación no disminuyeron incluso a una temperatura superior a 60°C. Con respecto a la actividad de degradación de xilano, no se pudo detectar la actividad para ninguna de las temperaturas.

(Ejemplo 20) Relación entre la cantidad de adición de disolventes orgánicos hidrófilos en la hidrólisis secundaria y la actividad de la enzima recuperada

Como compuestos que se añaden para la hidrólisis secundaria, se utilizaron disolventes orgánicos hidrófilos (metanol, etanol, 1-propanol, isopropanol, dimetilsulfóxido, N,N-dimetilformamida, acetona, acetonitrilo, etilenglicol y glicerina). La hidrólisis secundaria se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 (celulosa pretratada 3, 50°C), excepto que cada uno de los disolventes orgánicos hidrófilos se añadió a una concentración final del 1%. El experimento se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto por la adición del disolvente orgánico hidrófilo. La tabla 27 muestra un resumen de los valores de actividad representados como valores relativos calculados utilizando como patrón la actividad de la enzima recuperada después de la hidrólisis secundaria en las condiciones del ejemplo 1 (celulosa pretratada 3, 50°C) (actividad = 1). La actividad de degradación de xilano no se pudo detectar para ninguna de las condiciones y se representó como ND (no detectada).

[Tabla 27]

Condiciones \ Actividad	pH	Actividad de degradación de Avicel	Actividad de degradación de CMC	Actividad de degradación de celobiosa	Actividad de degradación de xilano
Ejemplo 1	5,0	1 (Patrón)	1 (Patrón)	1 (Patrón)	ND
Metanol	5,0	1,9	1,1	1,1	ND
Etanol	5,0	1,9	1,1	1,1	ND
1-Propanol	5,0	1,9	1,1	1,1	ND
Isopropanol	5,0	1,9	1,1	1,1	ND
Dimetilsulfóxido	5,0	1,9	1,1	1,1	ND
N,N-dimetilformamida	5,0	1,9	1,1	1,1	ND
Acetona	5,0	1,9	1,1	1,1	ND
Acetonitrilo	5,0	1,9	1,1	1,1	ND
Etilenglicol	5,0	1,9	1,1	1,1	ND
Glicerina	5,0	1,9	1,1	1,1	ND

Como resultado, tal como se muestra en la tabla 27, se reveló que la actividad de la enzima recuperada,

especialmente la actividad de degradación de Avicel, se puede aumentar mediante la adición de un disolvente orgánico hidrófilo.

(Ejemplo comparativo 6) Efecto de la adición de disolvente orgánico hidrófobo en la hidrólisis secundaria

Como compuestos que se añaden para la hidrólisis secundaria, se utilizaron n-hexano, 1-butanol y 1-pentanol, y la hidrólisis secundaria se llevó a cabo mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 19. Sin embargo, los disolventes orgánicos hidrófobos se separaron de la fase acuosa y la recuperación con la membrana de ultrafiltración fue difícil. Independientemente de si la enzima se puede recuperar o no, se reveló que los disolventes orgánicos hidrófobos eran inadecuados como compuestos que se añaden para la hidrólisis secundaria ya que son difíciles de manipular.

(Ejemplo 21) Relación entre la adición de disolventes orgánicos hidrófilos y la temperatura de la hidrólisis secundaria

La hidrólisis secundaria se llevó a cabo a temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C (igual que en el ejemplo 20) y 60°C en presencia del 1% de etanol, que es uno de los disolventes orgánicos hidrófilos utilizados en el ejemplo 20, y se midió la actividad de la enzima recuperada. La tabla 28 muestra un resumen de los valores de actividad representados como valores relativos calculados utilizando como patrón la actividad de la enzima recuperada después de la hidrólisis secundaria en las condiciones del ejemplo 1 (celulosa pretratada 3, 50°C) (actividad = 1). La actividad de degradación de xilano no se pudo detectar para ninguna de las condiciones y se representó como ND (no detectada).

[Tabla 28]

Actividad Condiciones	Actividad de degradación de Avicel	Actividad de degradación de CMC	Actividad de degradación de celobiosa	Actividad de degradación de xilano
Ejemplo 1	1 (Patrón)	1 (Patrón)	1 (Patrón)	ND
30°C	1,2	1,1	1,1	ND
40°C	1,7	1,1	1,1	ND
50r:(Ejemplo 20)	1,9	1,1	1,1	ND
60°C	0,6	1	1	ND

Se reveló que, en presencia de etanol, especialmente la actividad de degradación de Avicel tiende a aumentar a medida que la temperatura se aproxima a 50°C, pero la actividad, en cambio, disminuye a 60°C. Con respecto a la actividad de degradación de CMC y la actividad de degradación de celobiosa, no se pudo observar un aumento dependiente de la temperatura en la cantidad de recuperación, y las actividades de degradación no disminuyeron incluso a una temperatura superior a 60°C. Con respecto a la actividad de degradación de xilano, no se pudo detectar la actividad para ninguna de las temperaturas.

(Ejemplo comparativo 7) Efecto de la adición de polímero soluble en agua en la hidrólisis secundaria

Como compuestos que se añaden para la hidrólisis secundaria, se utilizaron diversos polímeros solubles en agua. Como polímeros solubles en agua, se utilizaron polialilamina-HCl-3S (PAA-3S, Nitto Boseki Co., Ltd.), polialilamina-HCl-10S (PAA-10S, Nitto Boseki Co., Ltd.), polietilenglicol #4.000 (PEG #4.000, Nakalai Tesque), polietilenglicol #6.000 (PEG #6.000, Nakalai Tesque), polietilenglicol #20.000 (PEG #20.000, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), alcohol de polivinilo 500 (PVA, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y polivinilpirrolidona (PVP, Sigma-Aldrich). La hidrólisis secundaria se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 (celulosa, producto pretratado 3, 50°C), excepto que cada uno de los polímeros solubles en agua se añadió a una concentración final del 1%. El pH después de la adición se ajustó con ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio hasta un valor dentro del intervalo de 5,5 a 6,5. El experimento se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto por la adición del polímero soluble en agua. La tabla 29 muestra un resumen de los valores de actividad representados como valores relativos calculados utilizando como patrón la actividad de la enzima recuperada después de la hidrólisis secundaria en las condiciones del ejemplo 1 (celulosa, producto pretratado 3, 50°C) (50°C) (actividad = 1). La actividad de degradación de xilano no se pudo detectar para algunas condiciones y se representó como ND (no detectada) en dichos casos.

[Tabla 29]

Actividad Condiciones	Actividad de degradación de Avicel	Actividad de degradación de CMC	Actividad de degradación de celobiosa	Actividad de degradación de xilano
Ejemplo 1	1 (Patrón)	1 (Patrón)	1 (Patrón)	ND
PAA-3S	ND	ND	ND	ND
PAA-10S	ND	ND	ND	ND
PEG#4000	0,4	1	1	ND

Actividad Condiciones	Actividad de degradación de Avicel	Actividad de degradación de CMC	Actividad de degradación de celobiosa	Actividad de degradación de xilano
PEG#6000	0,6	1	1	ND
PEG#20.000	0,2	0,5	1	ND
PVA	0,6	1	1	ND
PVP	0,5	1	1	ND

En presencia de los polímeros solubles en agua, no se pudo observar un aumento en la actividad de la enzima recuperada debido a su adición para ninguna de las actividades de degradación.

5 APLICABILIDAD INDUSTRIAL

El líquido de azúcar obtenido mediante la presente invención se puede utilizar como un material de azúcar para diversos productos de fermentación.

10 DESCRIPCIÓN DE LOS SÍMBOLOS

- 1- Termostato
- 2- Tanque de agitación
- 3- Entrada de celulosa
- 15 -4- Dispositivo de agitación
- 5- Conducto de suministro de agua
- 6- Tanque de suministro de agua caliente
- 7- Termostato del tanque de suministro de agua caliente
- 8- Dispositivo de filtración con prensado
- 20 -9- Compresor
- 10- Conducto de circulación
- 11- Tanque de recuperación de filtrado
- 12- Dispositivo de membrana de ultrafiltración
- 13- Conducto de recuperación de carbohidrasa
- 25 -14- Entrada de hidrolizado
- 15- Entrada de agua caliente
- 16- Marco externo
- 17- Tela filtrante
- 18- Sólidos (hidrolizado primario)
- 30 -19- Placa de presión
- 20- Interior de la cámara de filtración con prensado
- 21- Entrada de hidrolizado que es a la vez entrada de agua caliente
- 22- Tanque de solución de azúcar
- 23- Dispositivo de membrana de nanofiltración o dispositivo de membrana de ósmosis inversa
- 35 -24- Conducto de filtrado
- 25- Dispositivo de separación sólido-líquido
- 26- Medio de transferencia de sólidos
- 27- Termostato 2 (tanque de hidrólisis secundaria)
- 28- Tanque de hidrólisis secundaria
- 40 -29- Dispositivo de agitación 2 (tanque de hidrólisis secundaria)
- 30- Dispositivo de separación sólido-líquido 2 (hidrolizado secundario)
- 31- Tanque de líquido de azúcar secundario
- 32- Tanque de recuperación del líquido de azúcar secundario
- 33- Dispositivo de membrana de ultrafiltración del líquido de azúcar secundario
- 45 -34- Conducto de transferencia del líquido de azúcar secundario
- 35- Conducto de transferencia
- 36- Dispositivo de membrana de microfiltración
- 37- Tanque de líquido en bruto de membrana de microfiltración
- 38- Membrana de microfiltración
- 50 -39- Dispositivo de suministro de aire comprimido
- 40- Bomba de lavado inverso
- 41- Tanque de recuperación del microfiltrado

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de un líquido de azúcar mediante la utilización de celulasa de un hongo filamentoso, que comprende las etapas de:
- 5 (a) añadir celulasa de un hongo filamentoso a celulosa y formar un hidrolizado primario, y
 (b) a continuación, someter el hidrolizado primario de la etapa (a) a una separación sólido-líquido para dar líquido de azúcar primario y sólidos;
 (c) añadir agua a dichos sólidos de la etapa (b) sin adición adicional de enzima y realizar una hidrólisis secundaria sobre dichos sólidos para formar un hidrolizado secundario,
 10 (d) seguido de someter el hidrolizado secundario de la etapa (c) a una separación sólido-líquido para dar un líquido de azúcar secundario y un residuo; y
 (e) filtrar dicho líquido de azúcar primario de la etapa (b) y/o el líquido de azúcar secundario de la etapa (d) a través de una membrana de ultrafiltración, y
 15 (f) recuperar dicha celulasa de la parte de alimentación y recuperar un líquido de azúcar de la parte de permeado, en el que la celulasa de un hongo filamentoso es una composición enzimática que comprende celobiohidrolasa, endoglucanasa, exoglucanasa, β -glucosidasa, xilanasas y xilosidasas.
2. Procedimiento para la producción de un líquido de azúcar, según la reivindicación 1, en el que dicha celulasa de un hongo filamentoso es celulasa de *Trichoderma*.
- 20 3. Procedimiento para la producción de un líquido de azúcar, según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha celulosa deriva de una celulosa pretratada preparada mediante un tratamiento con amoníaco, un tratamiento hidrotérmico o un tratamiento con ácido sulfúrico diluido de la biomasa.
- 25 4. Procedimiento para la producción de un líquido de azúcar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha hidrólisis secundaria es una hidrólisis en presencia de uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en sales inorgánicas, con exclusión de las sales de calcio, disolventes orgánicos hidrófilos, aminoácidos y surfactantes no iónicos, y líquidos de azúcar que comprenden estas sustancias.
- 30 5. Procedimiento para la producción de un líquido de azúcar, según la reivindicación 4, en el que dicha sal o sales inorgánicas son una o más seleccionadas del grupo que consiste en sales de sodio, sales de potasio, sales de magnesio, sales de ácido sulfúrico, sales de amonio, sales de ácido clorhídrico, sales de ácido fosfórico, sales de ácido acético y sales de ácido nítrico, con exclusión de las sales de calcio.
- 35 6. Procedimiento para la producción de un líquido de azúcar, según la reivindicación 5, en el que dicha sal o sales inorgánicas son una o más seleccionadas del grupo que consiste en cloruro de sodio, acetato de sodio, sulfato de sodio, hidrogenosulfato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de amonio, hidrogenofosfato de dipotasio, sulfato de amonio, cloruro de magnesio y sulfato de magnesio.
- 40 7. Procedimiento para la producción de un líquido de azúcar, según la reivindicación 4, en el que dicho disolvente o disolventes orgánicos hidrófilos son uno o más seleccionados del grupo que consiste en metanol, etanol, 1-propanol, isopropanol, N,N-dimetilformamida, butanol, acetona, acetonitrilo, etilenglicol y glicerina.
- 45 8. Procedimiento para la producción de un líquido de azúcar, según la reivindicación 4, en el que dicho aminoácido o aminoácidos son uno o más seleccionados del grupo que consiste en arginina, cisteína, ácido glutámico, histidina y lisina.
9. Procedimiento para la producción de un líquido de azúcar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha separación sólido-líquido de un hidrolizado primario y/o un hidrolizado secundario es la filtración con prensado.
- 50 10. Procedimiento para la producción de un líquido de azúcar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende, además, la etapa de
 (g) filtrar dicho líquido de azúcar de la etapa (f) a través de una membrana de ósmosis inversa y/o una membrana de nanofiltración para concentrar dicho líquido de azúcar.
- 55

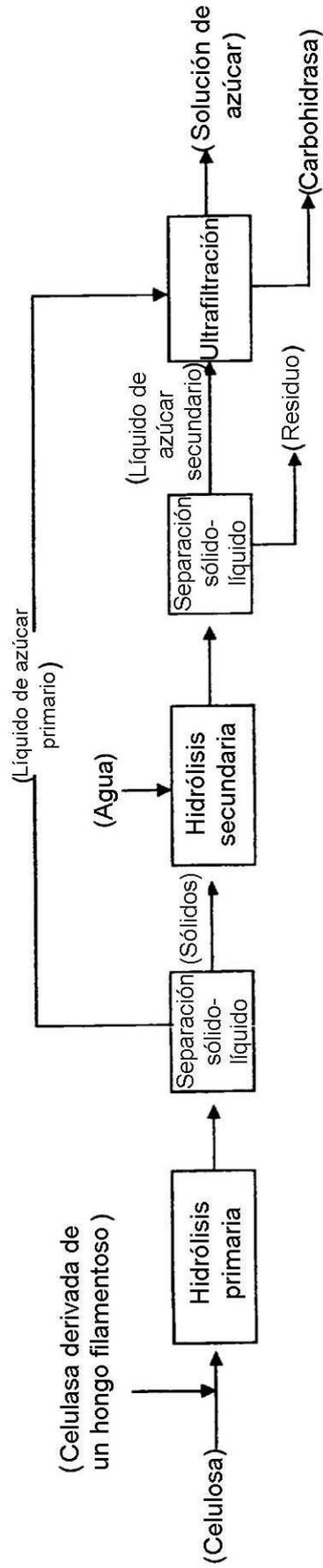


Fig.1

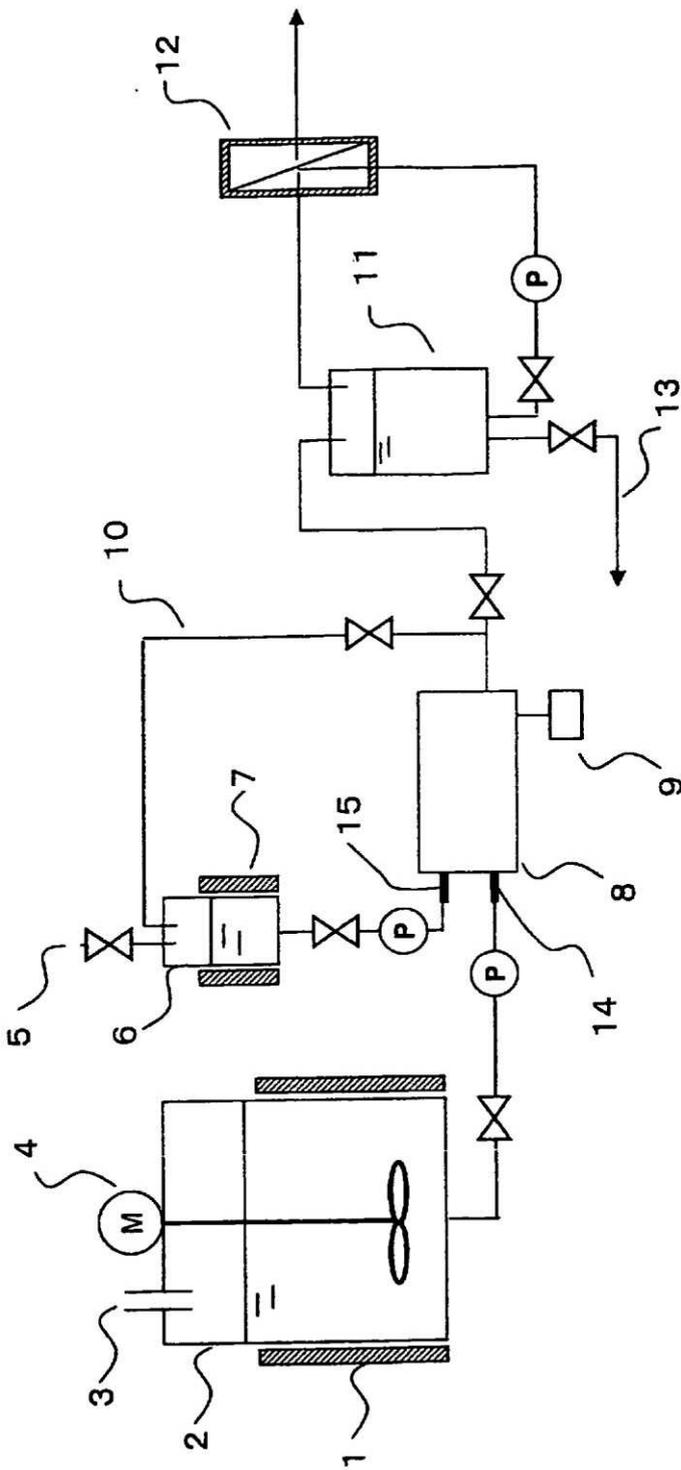


Fig.2

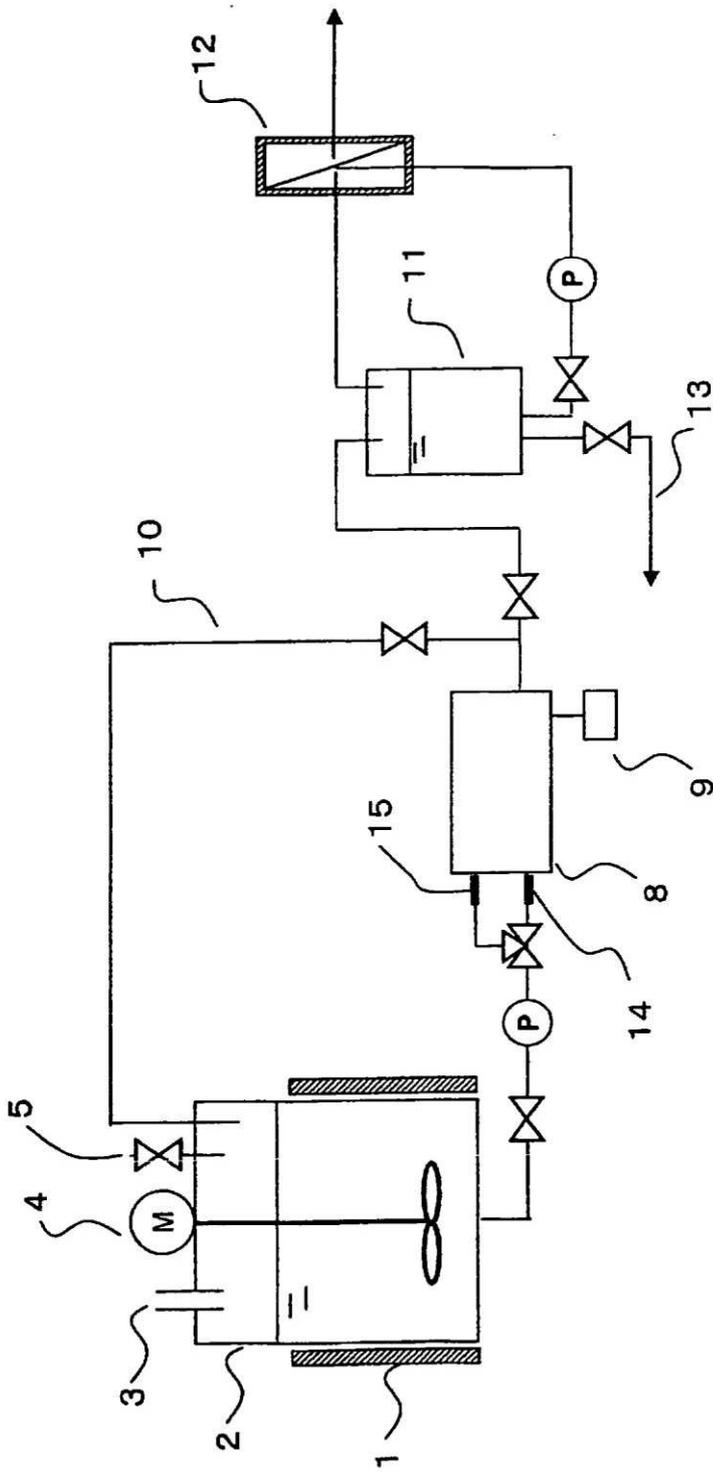


Fig.3

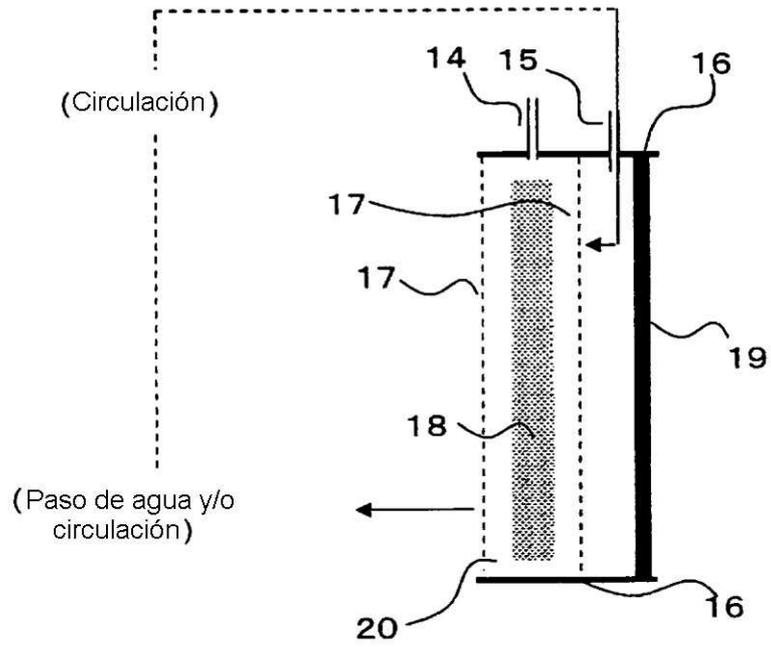


Fig.4

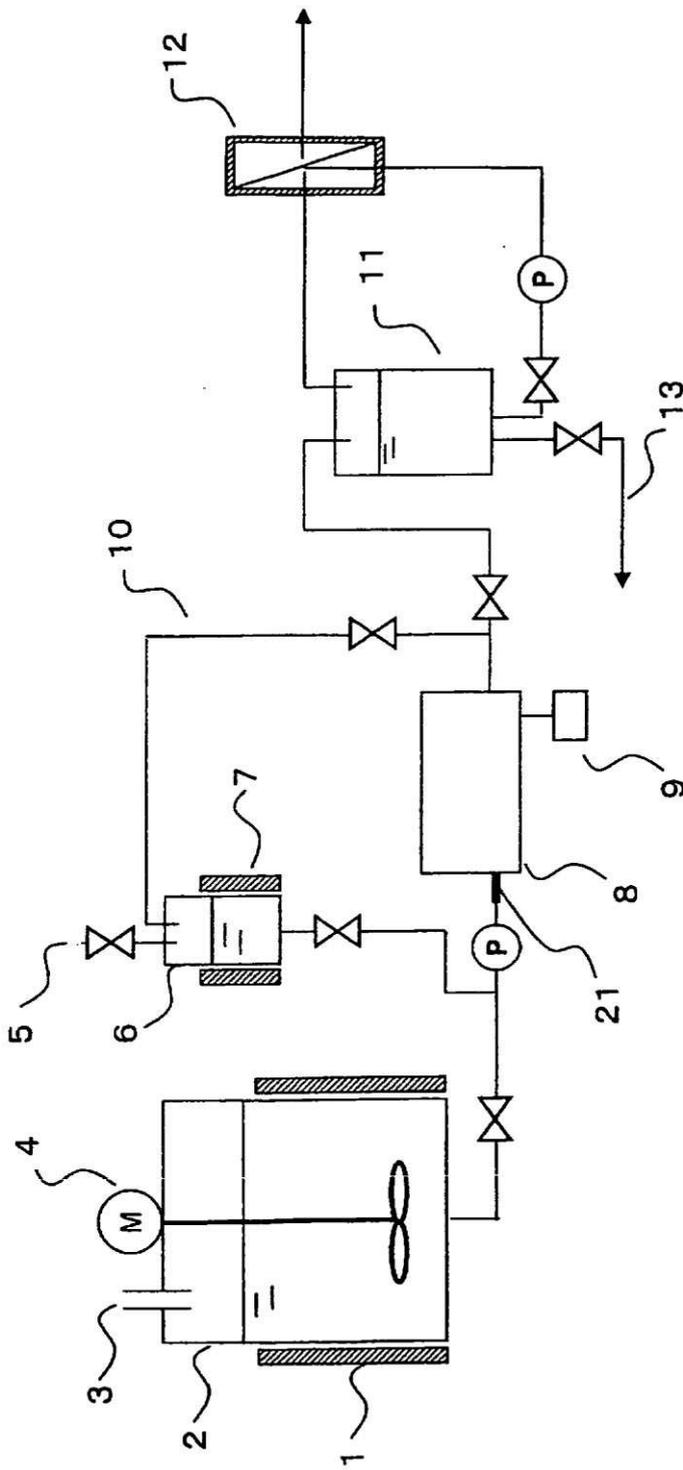


Fig.5

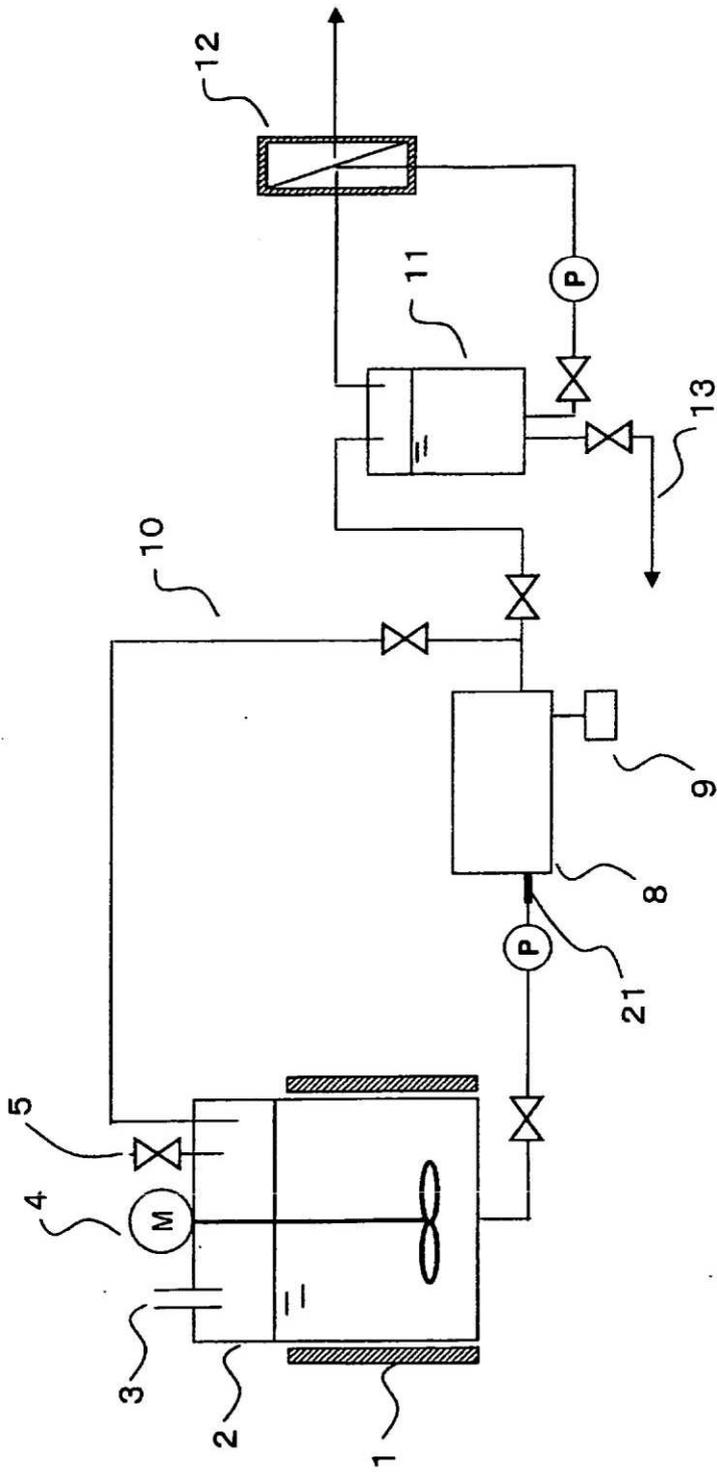


Fig.6

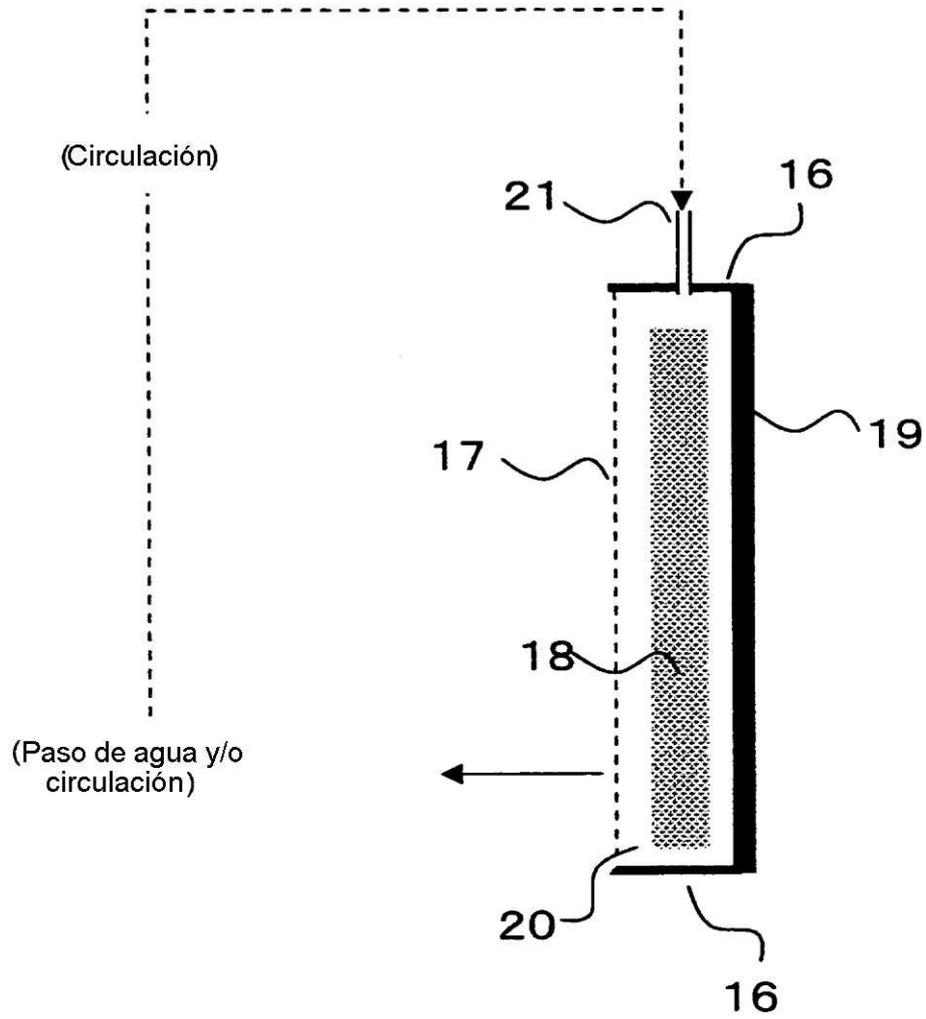


Fig.7

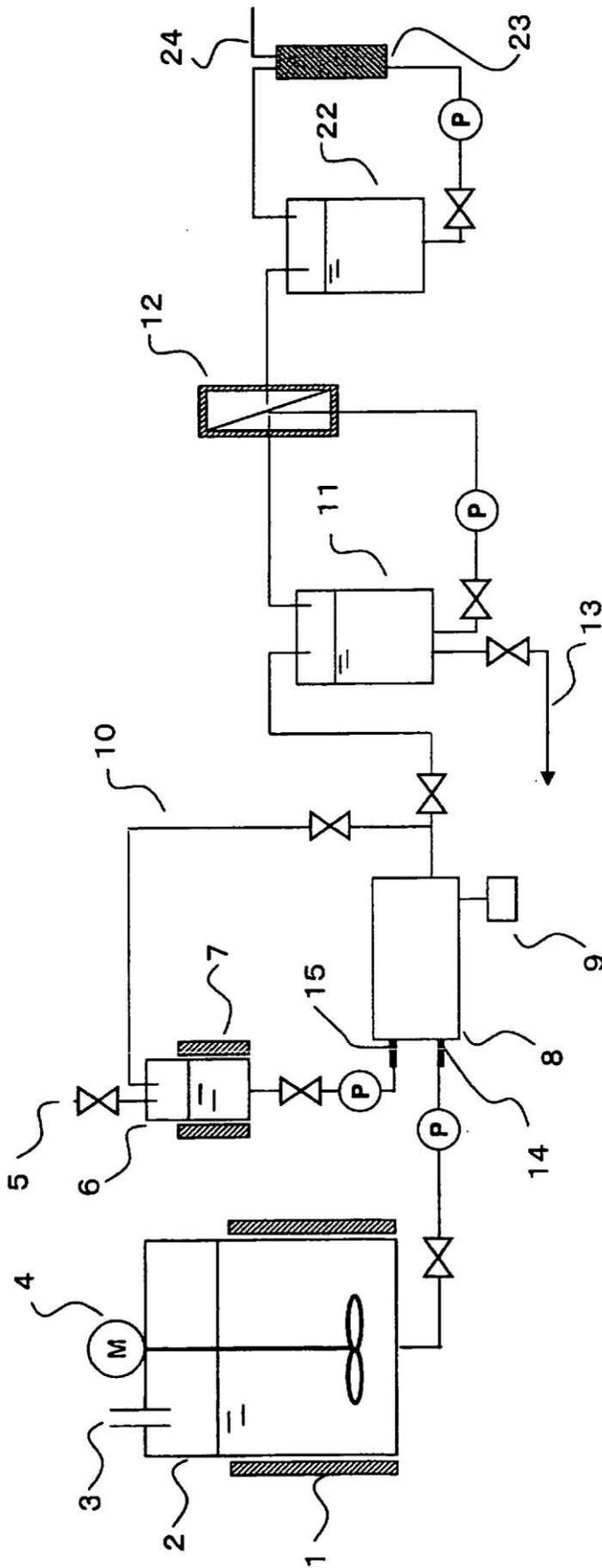


Fig.8

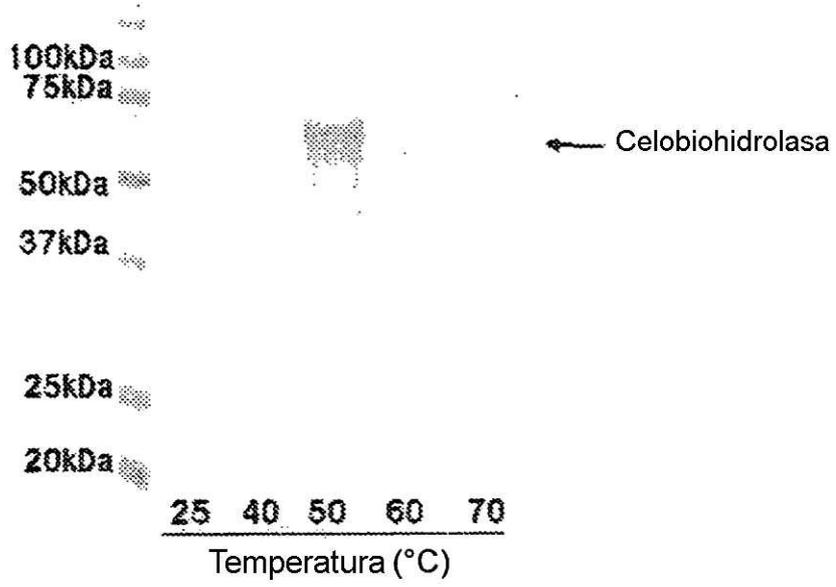


Fig.9

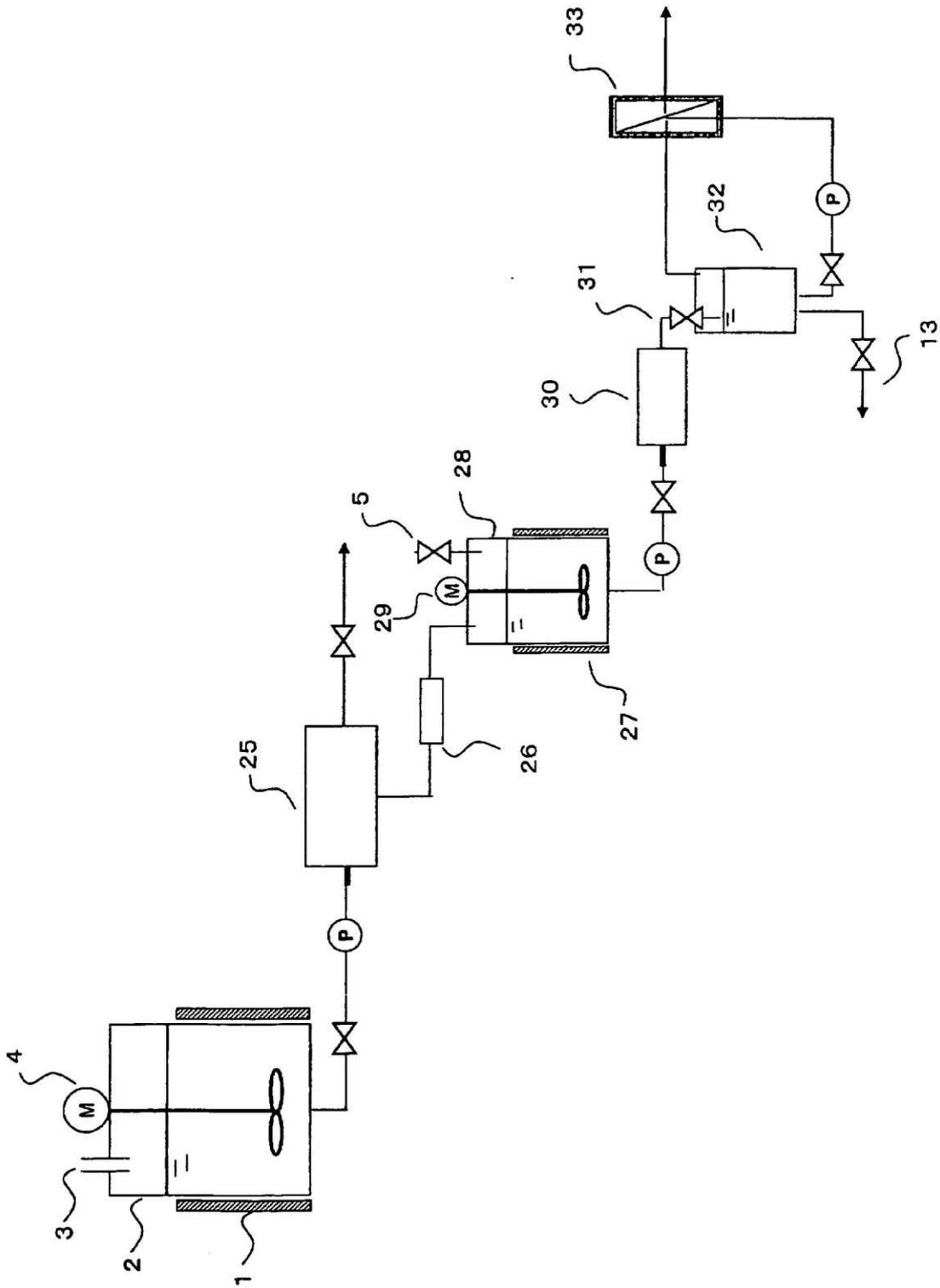


Fig.10

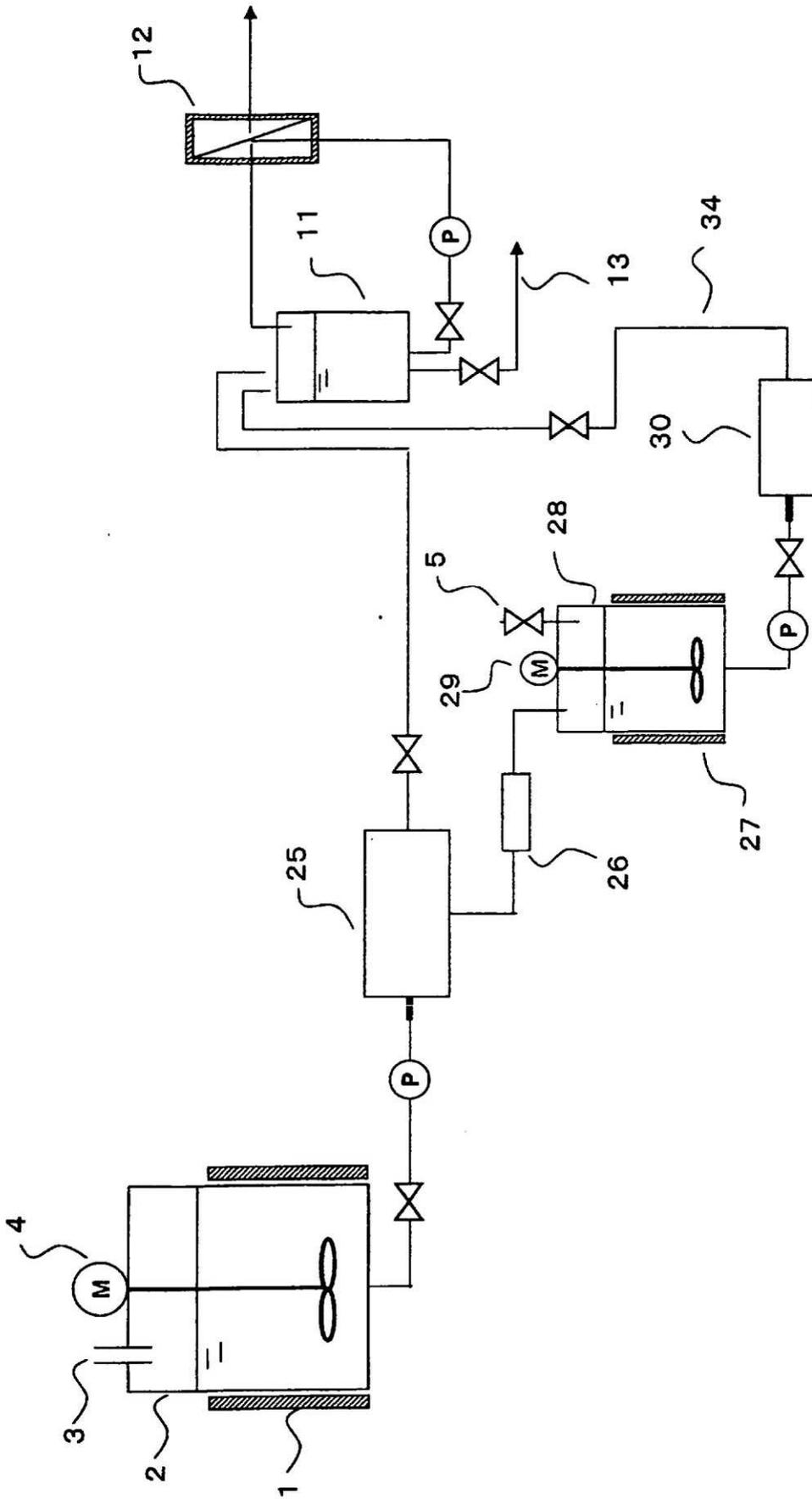


Fig.11

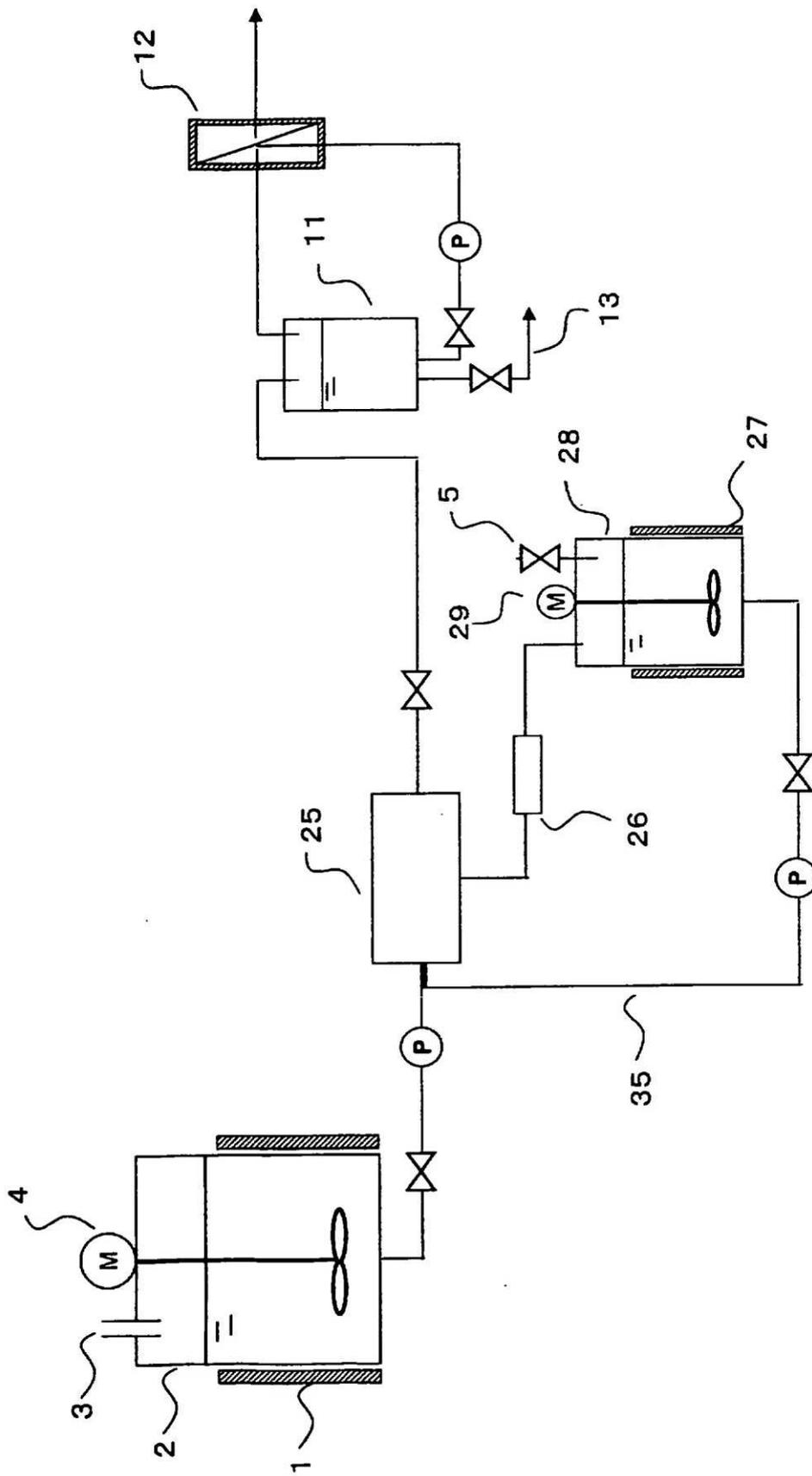


Fig.12

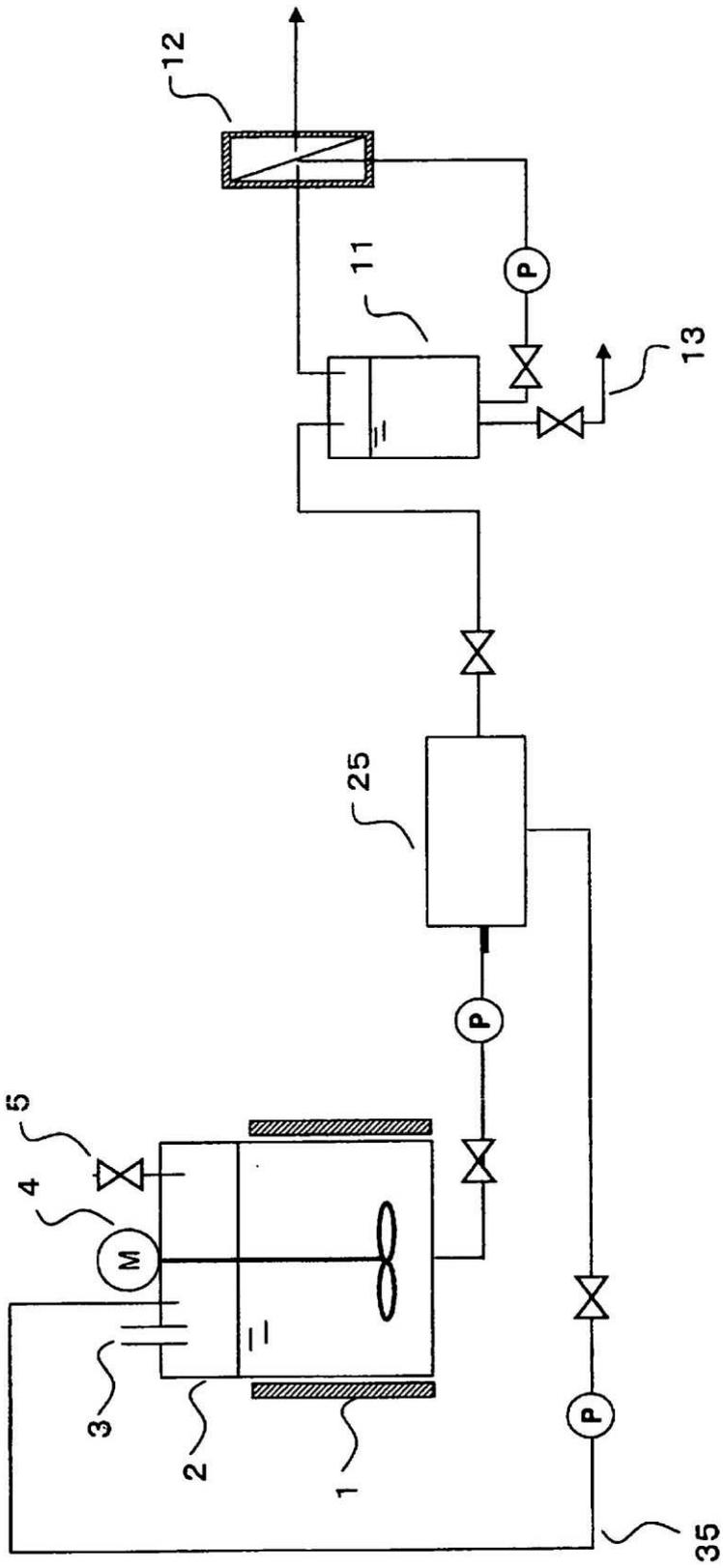


Fig.13

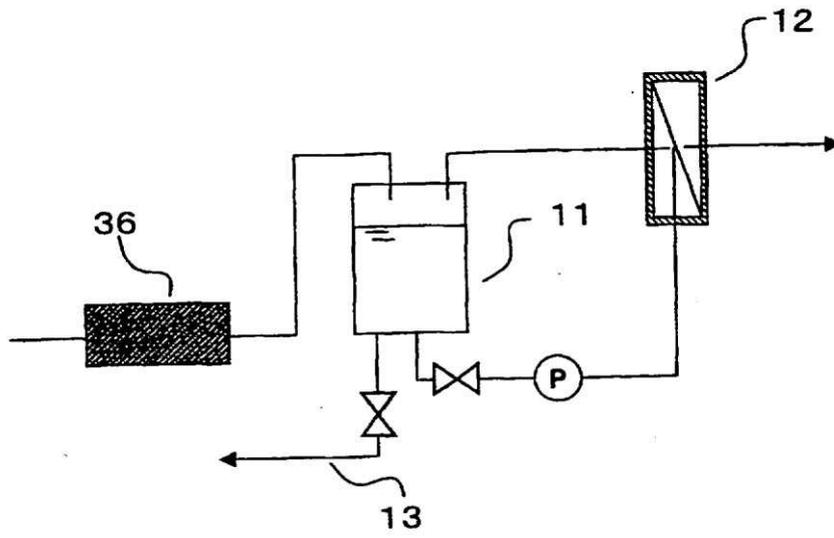


Fig.14

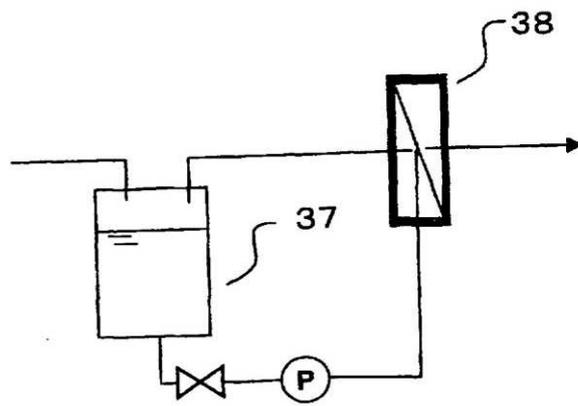


Fig.15

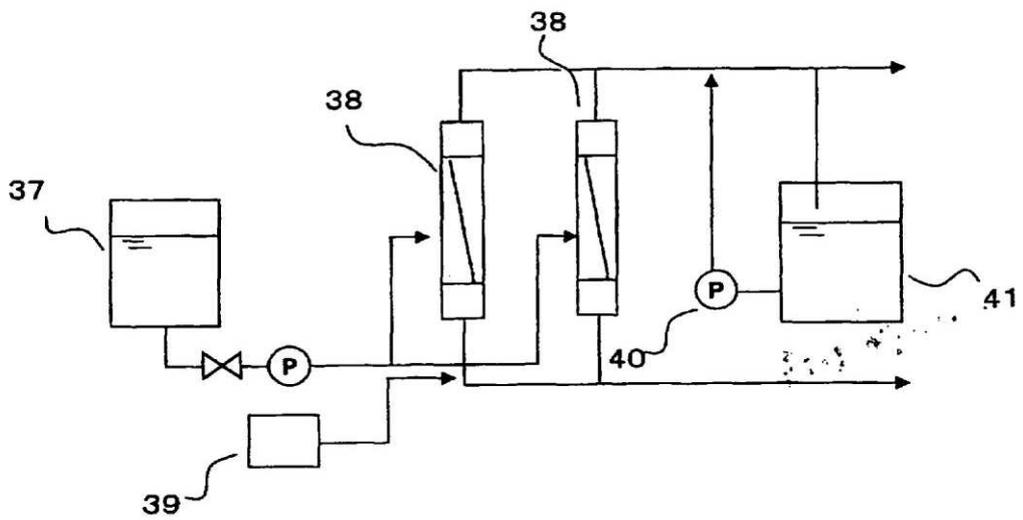


Fig.16