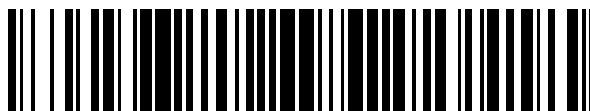


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 865**

51 Int. Cl.:

C12P 19/14	(2006.01)
C12M 1/00	(2006.01)
C12M 1/40	(2006.01)
C12M 1/26	(2006.01)
C13K 1/02	(2006.01)
C12P 19/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2011 PCT/JP2011/055903**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2011 WO11115040**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2011 E 11756225 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2548966**

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

30 Prioridad:

15.03.2010 JP 2010057402

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

16.11.2018

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 2 689 865 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de una solución que contiene azúcar

5 SECTOR TÉCNICO

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

10 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

Los procesos de producción por fermentación de productos químicos que utilizan azúcares como materias primas se han utilizado para producir diversos materiales industriales. En la actualidad, como azúcares para utilizar como materia prima de fermentación, los derivados de materiales alimenticios, tales como la caña de azúcar, el almidón y la remolacha azucarera se utilizan a nivel industrial. Sin embargo, en vista del hecho de que se espera un aumento en los precios de los materiales alimenticios debido al aumento futuro de la población mundial, o desde un punto de vista ético del hecho de que los azúcares para los materiales industriales pueden competir con los azúcares para alimentos, en el futuro es necesario construirse un proceso para producir de forma eficaz un líquido que contiene azúcar a partir de una fuente no alimenticia renovable, es decir, una biomasa que contenga celulosa, o un proceso para utilizar un líquido que contiene azúcar como materia prima de fermentación para convertir eficazmente el líquido que contiene azúcar en un material industrial.

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

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

Para resolver estos problemas técnicos, se han propuesto procedimientos mediante la recuperación y reutilización de las enzimas utilizadas en la hidrólisis. Entre los ejemplos de tales procedimientos que se han dado a conocer se incluyen un procedimiento en el que se lleva a cabo una separación continua sólido-líquido con un filtro de centrifugación y el líquido que contiene 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 enzimática y mejorar, de este modo, la eficacia de recuperación (documento de patente 7), un procedimiento en el que el residuo producido por la 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 por la sacarificación enzimática se alimenta nuevamente a otro lote de biomasa y, de ese modo, las enzimas se reutilizan (documento de patente 9). El documento de patente 10 da a conocer un procedimiento para la hidrólisis enzimática de la celulosa a azúcares solubles en el que la solución que contiene azúcar se extrae a partir de la mezcla de reactivo sin pérdida significativa de enzimas solubles mediante la inmovilización de la enzima sobre celulosa no hidrolizada en exceso en el sistema. La enzima se adsorbe fuertemente sobre la celulosa no hidrolizada en exceso a un pH de 4,0 a 5,0 y a temperaturas en el intervalo de 25°C a 50°C.

El documento de patente 11 da a conocer un procedimiento para reciclar y reutilizar componentes de celulasa en la sacarificación-fermentación simultáneas de materiales que contienen celulosa residual que implica la adsorción, como mínimo, de dos componentes del sistema enzimático de la celulasa sobre una parte recién preparada de material de celulosa residual y la utilización de la combinación de enzima-celulosa residual como una parte de la alimentación a una reacción adicional de sacarificación-fermentación simultáneas.

El documento de patente 12 da a conocer un procedimiento de convertir enzimáticamente celulosa a azúcares simples en el que celulosa seca dividida finamente, con un tamaño de partícula inferior a 150 micras, se combina con una solución de enzima celulasa concentrada obtenida de *Trichoderma viride* QM 9123 para formar una suspensión que tiene un contenido en sólidos de celulosa del 10 al 30 por ciento, y después de la hidrólisis, los componentes de azúcar solubles se eliminan mediante filtración a presión a través de la membrana de un tamiz

molecular sin que pase nada de enzima en el efluente.

El documento que no es de patente 2 da a conocer una hidrólisis de tres etapas para aumentar la sacarificación de restojo de maíz sometido a explosión de vapor.

5

DOCUMENTOS DE LA TÉCNICA ANTERIOR

[Documentos de patente]

- 10 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
15 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-3.764.475
20 Documento de patente 11: US-A-4.220.721
Documento de patente 12: US-A-3.642.580

Documentos no de patente

- 25 Documento no 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", informe técnico NREL (2002)
Documento no de patente 2: Yang y otros, Bioresource Technology 101, 4930-4935

30 CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

PROBLEMAS A RESOLVER POR LA INVENCIÓN

- 35 Se han desarrollado procedimientos de hidrólisis enzimática de celulosa, tal como se describió anteriormente, pero los efectos de estos procedimientos han sido insuficientes, desde el punto de vista de la reducción en la cantidad de la enzima utilizada. Por lo tanto, la presente invención tiene como objetivo desarrollar un proceso en el que el efecto de reducir la cantidad de la enzima utilizada sea mayor que en los procedimientos convencionales.

MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS

- 40 La presente invención tiene las realizaciones de [1] a [8], a continuación.
- 45 [1] Un procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar repitiendo un proceso de producción de líquido que contiene azúcar que comprende las etapas (1) a (3), según la reivindicación (1), que comprende en las etapas (1) y (2) añadir una celulasa de un hongo filamentoso, y en el que las hidrólisis primaria y secundaria se llevan a cabo en dos etapas separadas, la enzima recuperada obtenida en la etapa (3) se utiliza para la etapa (1) del siguiente y posterior procesos de producción de líquido que contiene azúcar, y dicha celulosa se trata previamente mediante un tratamiento alcalino, un tratamiento hidrotérmico o un tratamiento con ácido sulfúrico diluido.
- 50 [2] El procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según el punto [1], comprendiendo el procedimiento, adicionalmente, la etapa de concentrar el líquido que contiene azúcar utilizando una membrana de nanofiltración y/o de ósmosis inversa.
- 55 [3] El procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según los puntos [1] o [2], en el que como la celulasa derivada de un hongo filamentoso en la etapa (1) del proceso de producción de líquido que contiene azúcar, se utiliza un componente enzimático recuperado a partir de un hidrolizado de celulosa producido por una celulasa derivada de un hongo filamentoso.
- 60 [4] El procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según cualquiera de los puntos [1] a [3], en el que la celulasa obtenida a partir de un hongo filamentoso en la etapa (1) o (2) comprende un componente derivado de un líquido de cultivo de un microorganismo que pertenece al género *Trichoderma*.
- [5] El procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según cualquiera de los puntos [1] a [4], en el que la enzima recuperada comprende xilanasas y/o xilosidasas.
- 65 [6] El procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según cualquiera de los puntos [1] a [5], en el que

la enzima recuperada comprende una celulasa insoluble en agua derivada de un hongo filamentosos.

5 [7] El procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según cualquiera de los puntos [1] a [6], en el que las cantidades de la enzima añadida en la hidrólisis primaria y la hidrólisis secundaria satisfacen la siguiente relación: la cantidad de la enzima recuperada añadida en la etapa (1) es mayor que la cantidad de la enzima fresca añadida en la etapa (2).

10 [8] El procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según cualquiera de los puntos [1] a [7], en el que la recuperación de la celulasa a partir de un hongo filamentosos en la etapa (3) se lleva a cabo mediante la filtración del líquido que contiene azúcar a través de una membrana de ultrafiltración y la recuperación de la celulasa del lado de la alimentación.

EFECTO DE LA INVENCION

15 En un procedimiento de hidrólisis en el que la celulasa se recupera y se reutiliza, la cantidad de enzima utilizada para la hidrólisis se puede reducir en gran medida y la eficacia de la producción de azúcar de una biomasa que contiene celulosa se puede aumentar en gran medida añadiendo, antes de la adición de la enzima fresca, enzima recuperada para llevar a cabo la hidrólisis primaria y, a continuación, añadiendo adicionalmente enzima fresca para llevar a cabo la hidrólisis secundaria.

20 DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra el procedimiento del procedimiento de hidrólisis de la presente invención.

25 La figura 2 es un diagrama esquemático que muestra un aparato utilizado en la presente invención.

La figura 3 es un diagrama esquemático que muestra un aparato utilizado en la presente invención.

30 La figura 4 es un diagrama esquemático que muestra un aparato utilizado en la presente invención.

La figura 5 es un diagrama esquemático que muestra un aparato utilizado en la presente invención.

35 La figura 6 es un diagrama esquemático que muestra un aparato utilizado en la presente invención.

La figura 7 es un diagrama esquemático que muestra un aparato utilizado en la presente invención.

La figura 8 es un diagrama esquemático que muestra un aparato utilizado en la presente invención.

40 La figura 9 es un diagrama esquemático que muestra un aparato utilizado en la presente invención.

La figura 10 es un diagrama esquemático que muestra un aparato utilizado en la presente invención.

45 La figura 11 es un diagrama que muestra el resultado de SDS-PAGE del componente de celulasa insoluble en agua derivado de *Trichoderma*.

MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

50 En biomazas herbáceas, tales como bagazo, césped de pradera, espadaña, *Erianthus*, rastrojo de maíz, paja de arroz y paja de trigo; y biomazas leñosas, tales como árboles y residuos de materiales de construcción están contenidas grandes cantidades de celulosas. Estas biomazas que contienen celulosa se pueden utilizar, preferentemente, como materias primas en la presente invención.

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

65 Entre los ejemplos del tratamiento alcalino se incluyen procedimientos que utilizan un álcali, tal como hidróxido de sodio, hidróxido de calcio o amoníaco, y el amoníaco se puede utilizar de manera especialmente preferente. Dicho

tratamiento con amoníaco puede realizarse mediante los procedimientos descritos en 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 de 4 a 200°C, preferentemente de 90 a 150°C. El amoníaco que se va a añadir puede estar en estado de líquido o bien gas. Además, la forma del amoníaco que debe añadirse puede ser amoníaco puro o bien amoníaco acuoso. El número de veces del tratamiento no está limitado, y el tratamiento se puede llevar a cabo una o más veces. En particular, en los casos en los 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 a la eliminación de amoníaco para llevar a cabo una reacción de hidrólisis enzimática adicional. La neutralización del amoníaco puede llevarse a cabo después de la eliminación de los sólidos del hidrolizado por separación sólido-líquido o en el estado en el que están contenidos los sólidos. El reactivo ácido que se va a utilizar para la neutralización no está limitado. El amoníaco puede eliminarse manteniendo el producto tratado con amoníaco a presión reducida para permitir la evaporación del amoníaco en el estado de gas. El amoníaco eliminado puede recuperarse y reutilizarse.

En el caso del tratamiento hidrotérmico, se añade agua de tal manera que la concentración de la biomasa que contiene celulosa sea del 0,1 al 50% en peso, y la mezcla resultante se trata a una temperatura de 100 a 400°C durante de 1 segundo a 60 minutos. Mediante el tratamiento bajo tales condiciones de temperatura, tiene lugar la hidrólisis de la celulosa. El número de veces del tratamiento no está limitado, y el tratamiento se puede llevar a cabo una 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.

En el caso del tratamiento con ácido sulfúrico diluido, la concentración de ácido sulfúrico es, preferentemente, del 0,1 al 15% en peso, más preferentemente del 0,5 al 5% en peso. La temperatura de reacción puede ajustarse dentro del intervalo de 100 a 300°C, y se establece, preferentemente, dentro del intervalo de 120 a 250°C. El tiempo de reacción se puede establecer 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 una 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 para llevar a cabo adicionalmente la reacción de hidrólisis con celulosa o para utilizar el hidrolizado como materia prima de fermentación.

La presente invención se caracteriza por que la celulosa se hidroliza con una celulasa derivada de un hongo filamentoso. La hidrólisis de la celulosa significa que la celulosa se transforma en fragmentos de bajo peso molecular por la acción de la celulasa para producir monosacáridos y/u oligosacáridos. Las condiciones de reacción para la hidrólisis no están limitadas, siempre que la reacción se realice en las condiciones preferentes para la celulasa, y, en general, la temperatura de reacción, preferentemente, está en el intervalo de 15°C a 100°C, más preferentemente, de 40°C a 60°C, aún más preferentemente a 50°C. El pH para la hidrólisis, preferentemente, está en el intervalo de 3 a 9, más preferentemente de 4 a 5,5, aún más preferentemente 5. El pH puede ajustarse añadiendo un ácido o álcali de tal modo que se consiga un pH deseado. Además, se puede añadir un tampón según corresponda. En la hidrólisis, es preferente agitar la mezcla para promover el contacto de la celulosa con la enzima y para uniformizar la concentración de azúcar en el hidrolizado. Es preferente añadir agua de tal modo que la concentración de sólidos de la celulosa esté dentro del intervalo del 1 al 25% en peso, y la concentración de sólidos esté, más preferentemente, dentro del intervalo del 8 al 20% en peso.

Entre los ejemplos de la celulasa derivada de un hongo filamentoso se incluyen los derivados de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Humicola*, *Acremonium*, *Irpex*, *Mucor*, *Talaromyces*, *Phanerochaete*, hongos de la podredumbre blanca y hongos de la podredumbre marrón. Entre dichas celulosas derivadas de un hongo filamentoso, se utiliza preferentemente la celulasa derivada de *Trichoderma*, que tiene alta actividad de degradación de celulosa.

La celulasa derivada de *Trichoderma* es una composición enzimática que comprende celulasa derivada de un microorganismo que pertenece al género *Trichoderma*, como componente principal. El microorganismo que pertenece al género *Trichoderma* no está limitado, y es preferente *Trichoderma reesei*. Entre los ejemplos específicos de *Trichoderma reesei* se incluyen *Trichoderma reesei* QM9414, *Trichoderma reesei* QM9123, *Trichoderma reesei* Rut C-30, *Trichoderma reesei* ATCC68589, *Trichoderma reesei* PC3-7, *Trichoderma reesei* CL-847, *Trichoderma reesei* MCG77, *Trichoderma reesei* MCG80 y *Trichoderma viride* QM9123 (*Trichoderma viride* 9123). La celulasa también se puede derivar de una cepa mutante originada a partir del microorganismo que pertenece al género *Trichoderma*, cuya cepa mutante se preparó por mutagénesis utilizando un mutágeno, irradiación UV o similar para potenciar la productividad de la celulasa.

La celulasa derivada de un hongo filamentoso utilizada en la presente invención es una composición enzimática que comprende una pluralidad de componentes enzimáticos, tales como celobiohidrolasa, endoglucanasa, exoglucanasa, β -glucosidasa, xilanasas y xilosidasas, cuya composición enzimática tiene una actividad para hidrolizar y sacarificar celulosa. En los casos en los que la celulasa derivada de un hongo filamentoso se utiliza para la degradación de la celulosa, un efecto concertado o efecto complementario por la pluralidad de componentes

enzimáticos permite una hidrólisis eficaz de la celulosa.

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

La endoglucanasa es un término general para celulasas que hidrolizan cadenas moleculares de celulosa de sus partes centrales. El grupo de enzimas que pertenecen a la endoglucanasa se describen como números CE: CE 3.2.1.4, CE 3.2.1.6, CE 3.2.1.39 y CE 3.2.1.73.

La exoglucanasa es un término general para las celulasas que hidrolizan cadenas moleculares de celulosa de sus extremos. El grupo de enzimas que pertenecen a la exoglucanasa se describen como números CE: CE 3.2.1.74 y CE 3.2.1.58.

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

La xilanasa es un término general para celulasas que actúan sobre hemicelulosa o especialmente xilano. El grupo de enzimas que pertenecen a xilanasa se describe como número CE: CE 3.2.1.8.

La xilosidasa es un término general para celulasas que actúan sobre xilololosacáridos. El grupo de enzimas que pertenecen a xilosidasa se describe como número CE: CE 3.2.1.37.

Como la celulasa derivada de *Trichoderma* (también denominada "celulasa que se deriva de *Trichoderma*") preferentemente se utiliza una que comprende uno o varios componentes derivados de un líquido de cultivo de un microorganismo que pertenece al género *Trichoderma*. Entre los ejemplos del uno o varios componentes derivados de un líquido de cultivo derivado de *Trichoderma* se incluyen todos los componentes distintos de la celulasa contenidos en un líquido de cultivo obtenido cultivando un microorganismo que pertenece al género *Trichoderma* en un medio preparado de tal manera que el microorganismo produzca celulasa. Es decir, los ejemplos del uno o varios componentes incluyen los componentes enzimáticos distintos de la celulasa, las células del microorganismo que pertenece al género *Trichoderma* y los componentes del medio utilizados para el cultivo. Entre los ejemplos específicos de los componentes del medio utilizados para el cultivo se incluyen monosacáridos, tales como glucosa y xilosa; inductores de producción de celulasa, tales como licor de maceración de maíz, extracto de levadura y celulosa; minerales; y componentes de vitaminas. Las células de un microorganismo que pertenece al género *Trichoderma* pueden estar contenidas como un componente derivado de un líquido de cultivo de un microorganismo que pertenece al género *Trichoderma*. Esto se debe a que la inclusión de células de un microorganismo que pertenece al género *Trichoderma* como un componente de la celulasa derivada de *Trichoderma* de la presente invención puede aumentar la actividad de la enzima recuperada.

Las relaciones en peso de los componentes enzimáticos en la celulasa derivada de *Trichoderma* no están limitadas, y, por ejemplo, un 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, exo-1,4- β -D-glucosamidasa, xilanasa, xilosidasa, endo-1,4-manosidasa, 1,2- α -manosidasa, α -glucuronidasa, quitosanasa, quitinasa, 1,4- α -glucosidasa, α -galactosidasa, β -galactosidasa, arabinofuranosidasa, xilano esterasa, swolenina, hidrofobina y/o similares. Los microorganismos pertenecientes a *Trichoderma* producen componentes de celulasa fuertes en el líquido de cultivo, mientras que la actividad de β -glucosidasa en el líquido de cultivo es baja, dado que la β -glucosidasa es retenida en las células o en las superficies de las células. Por lo tanto, además de los componentes de celulasa derivados de *Trichoderma* inherentes, se puede añadir β -glucosidasa de una especie diferente o de la misma especie. Como β -glucosidasa de una especie diferente, se puede utilizar, preferentemente, β -glucosidasa derivada de *Aspergillus*. Entre los ejemplos de la β -glucosidasa derivada de *Aspergillus* se incluye Novozyme 188, que está disponible en el mercado de Novozyme. El procedimiento de adición de β -glucosidasa de una especie diferente o de la misma especie puede ser un procedimiento en el que un gen se introduce en un microorganismo que pertenece a *Trichoderma* para llevar a cabo la recombinación genética del microorganismo, de tal manera que se produzca β -glucosidasa en el líquido de cultivo, y el microorganismo que pertenece a *Trichoderma*, a continuación, se cultiva, seguido del aislamiento del líquido de cultivo.

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

La hidrólisis primaria en la presente invención significa que se añade una celulasa derivada de un hongo filamentoso a celulosa que no ha sido sometida a tratamiento enzimático, para llevar a cabo la hidrólisis. La enzima utilizada para la hidrólisis primaria puede ser la enzima fresca o enzima recuperada mencionada más adelante, y la enzima recuperada se utiliza, preferentemente, dado que la utilización de la enzima recuperada puede aumentar la eficacia de la producción de azúcar. Los mecanismos mediante los cuales se aumenta la eficacia de la producción de azúcar utilizando enzima recuperada en la hidrólisis primaria son los siguientes. En la enzima recuperada, los componentes

enzimáticos cuyas estructuras se desnaturalizaron parcialmente debido al calor durante la hidrólisis están contenidos, y tales componentes enzimáticos muestran una adsorción especialmente fuerte a los sitios de adsorción que existen en las superficies de la celulosa. Como resultado, los componentes de la enzima se adsorben de forma no específica a las partes de superficie adsorbente en la celulosa, tales como la lignina. Por lo tanto, puede suprimirse la adsorción inespecífica del componente enzimático fresco que se alimenta más tarde. En general, la actividad específica (actividad enzimática por peso de proteína) de la degradación por la celulosa es mayor en la enzima recuperada que en la enzima fresca. Es decir, como resultado de la supresión de la adsorción inespecífica del componente enzimático fresco, que tiene una actividad específica más alta, se puede aumentar la productividad del azúcar y la eficacia de recuperación de la enzima. Otra razón es que, a medida que aumenta el número de veces de recuperación de la enzima recuperada de la presente invención, se puede obtener una mayor actividad de degradación del xilano. La actividad de degradación del xilano contenida en la enzima recuperada puede medirse utilizando como sustrato para degradarse un xilano reactivo, tal como xilano de madera de abedul. Entre los ejemplos de componentes de celulosa derivada de un hongo filamentoso implicados en la actividad de degradación del xilano se incluyen xilanasa y xilosidasa. Entre los ejemplos de genes para xilanasa se incluyen xyn1(GH11), xyn2(GH11), xyn3(GH10), xyn4(GH5), xyn5b(GH5) y xyn11(GH11). Entre los ejemplos de genes para xilosidasa se incluyen bxl1/bxl3a(GH3), bxl3b(GH3) y bxl3c(GH3). Cada uno de los genes anteriores codifica xilanasa o xilosidasa, y está contenido como un componente de celulosa derivada de un hongo filamentoso. Entre los ejemplos de enzimas de degradación del xilano cuyas actividades en la enzima recuperada se pueden aumentar se incluyen xilanasa 3 (peso molecular, 38 kDa; xyn3), endo- β -1,4-xilanasa (peso molecular, 25 kDa; xyn1) y β -xilosidasa (peso molecular, 88 kDa; bxl1/bxl3a). Al añadir la enzima recuperada, cuya actividad de degradación del xilano se aumentó, tal como se describió anteriormente, para la hidrólisis primaria, los componentes de xilano que rodean a la celulosa se hidrolizan preferentemente y, por lo tanto, se puede aumentar la productividad de azúcar en la hidrólisis primaria y secundaria.

El tiempo de reacción en la hidrólisis primaria está, preferentemente, en el intervalo de 15 minutos a 6 horas. En los casos en los que el tiempo de reacción es inferior a 15 minutos, el grado de mejora de la eficacia de la producción de azúcar puede ser bajo, mientras que en los casos en los que el tiempo de reacción no es inferior a 6 horas, la eficacia de la producción de azúcar por unidad de tiempo puede ser baja. La concentración de celulosa, la temperatura de reacción y el pH no están limitados, y pueden ser los que se encuentran en las condiciones descritas anteriormente para la hidrólisis.

La enzima para la hidrólisis primaria se añade, preferentemente, a una relación en peso de 1/1.000 a 1/50 con respecto al peso de la celulosa pretratada. El peso de la celulosa pretratada puede calcularse midiendo el peso del contenido sólido contenido en la celulosa pretratada. El peso de los sólidos puede calcularse sometiendo el producto pretratado a separación sólido-líquido mediante centrifugación, separación de membrana o similar y lavando el resultante con agua para separar y eliminar los compuestos solubles en agua, seguido de secado de los sólidos que contienen agua hasta que el peso alcanza un valor constante y midiendo el peso de los sólidos. La cantidad de enzima añadida se puede calcular midiendo la concentración de proteína en la solución que contiene la enzima fresca y multiplicando la concentración de proteína por la cantidad de la solución de la enzima fresca añadida.

En el hidrolizado primario obtenido por la hidrólisis primaria, se acumulan los componentes monosacáridos producidos por la hidrólisis. La actividad de degradación del xilano tiende a ser alta, especialmente en los casos en los que se utiliza la enzima recuperada para la hidrólisis primaria. Es decir, en el hidrolizado primario obtenido utilizando enzima recuperada en la hidrólisis primaria, se produce una gran cantidad de xilosa. El hidrolizado primario obtenido por la hidrólisis primaria de la presente invención se puede someter a la hidrólisis secundaria mencionada posteriormente tal como está o después de realizar una operación, tal como separación sólido-líquido para mejorar la concentración de sólidos no degradados. Además, en los casos en que se realiza la separación sólido-líquido después de la hidrólisis primaria, el componente de solución obtenido por la separación puede utilizarse como un líquido que contiene azúcar.

La hidrólisis secundaria en la presente invención significa que la enzima fresca se añade adicionalmente al hidrolizado obtenido mediante la hidrólisis primaria descrita anteriormente, para llevar a cabo la hidrólisis. La operación de separación sólido-líquido no necesita llevarse a cabo para el hidrolizado primario. Además, según se requiera, se puede añadir agua, pero la adición de agua no es indispensable.

En la presente invención, la enzima fresca se alimenta y se utiliza para la hidrólisis secundaria. Esto se lleva a cabo porque 1) dado que no se puede obtener una eficacia suficiente de degradación de celulosa con la cantidad de enzima alimentada en la hidrólisis primaria (enzima fresca o enzima recuperada), la enzima fresca necesita alimentarse adicionalmente para obtener una eficacia suficiente de degradación de celulosa; y 2) la eficacia de producción de azúcar y la eficacia de recuperación de la enzima se pueden aumentar mediante la alimentación de enzima fresca en dos etapas separadas, es decir, en la hidrólisis primaria y en la hidrólisis secundaria. Además, especialmente en los casos en los que solo se lleva a cabo la hidrólisis primaria utilizando enzima recuperada, el rendimiento de azúcar en el segundo y posteriores procesos disminuye, lo que no es preferente. Por lo tanto, al alimentar enzima fresca, además de la enzima recuperada, para la hidrólisis secundaria, el rendimiento de azúcar puede ser equivalente al del primer proceso o del proceso anterior. Es decir, en el presente procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, es posible repetir la producción de azúcar a una concentración no inferior a

un valor predeterminado.

La adición de enzima fresca para la hidrólisis secundaria puede llevarse a cabo, de forma dividida, una pluralidad de veces (alimentación dividida). Por ejemplo, después de la hidrólisis primaria, la mitad de la enzima fresca que se va a añadir para la hidrólisis secundaria se puede alimentar para llevar a cabo la hidrólisis durante varias horas, seguido de la alimentación de la mitad restante de la enzima fresca. En la presente invención, incluso en los casos en los que la enzima fresca se alimenta dividida varias veces en la hidrólisis secundaria, estas operaciones también se incluyen en la hidrólisis secundaria.

El tiempo de reacción de la hidrólisis secundaria es, preferentemente, más largo que el de la hidrólisis primaria. Más específicamente, el tiempo de reacción de la hidrólisis secundaria está, preferentemente, en el intervalo de 1 a 200 horas, más preferentemente, en el intervalo de 6 a 72 horas, aún más preferentemente, en el intervalo de 12 a 24 horas. Aunque el tiempo de reacción debe controlarse dependiendo de la cantidad de enzima utilizada, la temperatura de reacción, la concentración de azúcar de interés y similares, un tiempo de reacción superior a 200 horas puede provocar la inactivación térmica de la celulasa, lo que no es preferente en vista de la recuperación y reutilización de la celulasa. Por otro lado, en los casos en los que el tiempo de reacción es inferior a 1 hora, la concentración de azúcar del hidrolizado obtenido puede ser insuficiente.

La enzima para la hidrólisis secundaria se añade, preferentemente, a una relación en peso de 1/1.000 a 1/50 con respecto al peso de la celulosa pretratada. El peso de la celulosa pretratada se puede calcular a partir del peso del contenido sólido de la celulosa pretratada antes de la hidrólisis primaria.

Las cantidades de enzima añadidas en la hidrólisis primaria y la hidrólisis secundaria satisfacen, preferentemente, la siguiente relación: la cantidad de enzima añadida para la hidrólisis primaria es mayor que la cantidad de enzima añadida para la hidrólisis secundaria. La cantidad de adición en este documento puede calcularse multiplicando la concentración de proteína de la enzima fresca o la enzima recuperada por la cantidad de la solución enzimática a alimentar. En términos de medición de la concentración de proteína, la concentración de proteína de la enzima recuperada y la enzima fresca se puede calcular mediante el procedimiento conocido descrito anteriormente. La concentración de proteína en el presente documento simplemente significa la concentración de proteína, de forma independiente de si la proteína es un componente derivado de celulosa u otro componente. En la presente invención, cuando la cantidad de adición satisface esta relación, se puede lograr una mayor producción de azúcar y también se puede aumentar la eficacia de recuperación de la enzima.

La presente invención tiene la etapa de someter el hidrolizado secundario a separación sólido-líquido para obtener un líquido que contiene azúcar, a partir del cual se recupera una celulasa derivada de un hongo filamentoso; y la etapa de reutilizar la celulasa derivada de un hongo filamentoso recuperada en la hidrólisis primaria. Las etapas se describen, a continuación, en orden.

La separación sólido-líquido del hidrolizado secundario se lleva a cabo con el fin de separar el líquido que contiene azúcar y el residuo de hidrólisis obtenido por la hidrólisis secundaria. El líquido que contiene azúcar significa la solución que contiene azúcar obtenida por la hidrólisis de celulosa descrita anteriormente. Los azúcares, generalmente, se clasifican basándose en el grado de polimerización de los monosacáridos, en monosacáridos, tales como glucosa y xilosa; oligosacáridos producidos por condensación por deshidratación de 2 a 9 monosacáridos; y polisacáridos producidos por condensación por deshidratación de no menos de 10 monosacáridos. El líquido que contiene azúcar obtenido mediante la presente invención comprende glucosa y xilosa como componentes principales, y, aunque en pequeñas cantidades, oligosacáridos tales como celobiosa; y monosacáridos tales como arabinosa y manosa. Más específicamente, el procedimiento de análisis de monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos disueltos en agua puede ser HPLC, por lo que la cuantificación puede llevarse a cabo basándose en la comparación con una muestra patrón. El procedimiento de separación sólido-líquido no está limitado, y entre los ejemplos del procedimiento de separación sólido-líquido se incluyen centrifugación utilizando un decantador de tornillo o similar, filtración utilizando un filtro de presión o similar, y separación de membrana utilizando una membrana de microfiltración o similar.

En el hidrolizado secundario, la celulasa derivada de un hongo filamentoso existe en el estado en el que se disuelve en un líquido que contiene azúcar o se adsorbe al residuo sólido como un material no degradado. Dicha celulasa derivada de un hongo filamentoso puede recuperarse mediante la separación sólido-líquido del lado del líquido que contiene azúcar. Entre los ejemplos preferentes del procedimiento para recuperar la celulasa derivada de un hongo filamentoso del líquido que contiene azúcar se incluyen un procedimiento en el que el líquido que contiene azúcar se filtra a través de una membrana de ultrafiltración y la celulasa se recupera del lado de alimentación. Entre los ejemplos de la membrana de ultrafiltración que puede utilizarse se incluyen membranas hechas de materiales, tales como polietersulfona (PES), fluoruro de polivinilideno (PVDF) y celulosa regenerada, pero dado que la celulosa regenerada es degradada por la celulasa, se utiliza, preferentemente, una membrana de ultrafiltración hecha de un material de polímero sintético, tal como PES o PVDF. El límite de peso molecular de la membrana de ultrafiltración no está limitado siempre que la celulasa que va a utilizarse pueda recuperarse de manera eficaz, y la membrana de ultrafiltración tenga, preferentemente, un límite de peso molecular dentro del intervalo de 1.000 a 50.000. La cantidad de enzima recuperada varía según la cantidad de enzima fresca añadida para la hidrólisis secundaria y, por

lo tanto, no está limitada.

En la operación de repetir la recuperación y reutilización en la presente invención, y especialmente en el proceso de separación de la enzima recuperada utilizando una membrana de ultrafiltración, se puede obtener un componente de celulasa insoluble en agua derivado de un hongo filamentoso como componente enzimático recuperado en algunos casos. Dicho componente de celulasa insoluble en agua derivado de un hongo filamentoso es un componente enzimático producido durante el proceso de hidrólisis o durante la recuperación de la enzima utilizando una membrana de ultrafiltración o similar. Dicho componente de celulasa insoluble en agua derivado de un hongo filamentoso se utiliza, preferentemente, tal cual, sin eliminarse por separación sólido-líquido, filtración o similar, como un componente enzimático recuperado. El componente de celulasa insoluble en agua derivado de un hongo filamentoso está constituido principalmente por celobiohidrolasa. La insolubilidad en agua significa que el componente existe en el líquido enzimático recuperado en forma de precipitado, flóculos o micropartículas, que pueden separarse colocando la enzima recuperada en un tubo y centrifugando el tubo para obtener el componente de celulasa insoluble en agua derivado de un hongo filamentoso en forma de precipitado. El componente de celulasa insoluble en agua derivado de un hongo filamentoso recuperado como precipitado se puede identificar en función de su color, que puede ser blanco, amarillo pálido, marrón o similar. Al separar el componente de celulasa insoluble en agua derivado de un hongo filamentoso y resuspenderlo en agua, se puede disolver una parte del componente. Sin embargo, para la disolución completa del componente, es necesaria la adición de urea o un surfactante (dodecilsulfato de sodio, Tween 80, Triton X o similares). Reutilizando la enzima recuperada que contiene dicho componente de celulasa insoluble en agua derivado de un hongo filamentoso para la hidrólisis primaria, se puede conseguir una productividad de azúcar aún mayor.

La celulasa derivada de un hongo filamentoso recuperada del hidrolizado secundario (en lo sucesivo denominada enzima recuperada) se reutiliza para la hidrólisis primaria. Las ventajas de la utilización de la enzima recuperada en la hidrólisis primaria son las descritas anteriormente. El número de veces de reutilización de la enzima recuperada no está limitado.

En la presente invención, la cantidad de enzima añadida después de la reutilización de la enzima recuperada del hidrolizado secundario para la hidrólisis primaria es, preferentemente, mayor que la cantidad de enzima fresca añadida para la hidrólisis secundaria. La cantidad de adición de enzima se mide en términos de la cantidad de proteína, tal como se describió anteriormente. En general, la actividad de celulasa de la enzima recuperada (actividad enzimática por cantidad de proteína) es menor que la actividad de celulasa de la enzima fresca, pero en la presente invención, en los casos en los que se cumple la relación: la cantidad de adición de la enzima recuperada que se va a reutilizar para la hidrólisis primaria es mayor que la cantidad de adición de enzima fresca en la hidrólisis secundaria, la eficacia de la producción de azúcar con respecto a la cantidad de enzima fresca aumenta.

El líquido que contiene azúcar obtenido mediante la presente invención contiene monosacáridos, tales como glucosa, xilosa, arabinosa y manosa derivados de celulosa y hemicelulosa (xilano y arabinano). Las proporciones de los monosacáridos en el líquido que contiene azúcar no están limitadas, y los principales componentes monosacáridos son glucosa y xilosa. El líquido que contiene azúcar obtenido mediante la presente invención también puede contener oligosacáridos, tales como celobiosa y similares, aunque sus cantidades pueden ser muy pequeñas en comparación con las cantidades de monosacáridos. La concentración de monosacáridos contenida en el líquido que contiene azúcar no está limitada, y es, preferentemente, del 0,1 al 20% en peso, más preferentemente, del 5 al 20% en peso. En los casos en los que la concentración en el líquido que contiene azúcar está dentro del intervalo del 5 al 20% en peso, el líquido que contiene azúcar puede utilizarse como materia prima de fermentación para microorganismos, sin concentrarse.

El líquido que contiene azúcar obtenido mediante la presente invención se puede concentrar utilizando una membrana de nanofiltración y/o una membrana de ósmosis inversa. Entre los ejemplos del material de la membrana de nanofiltración o la membrana de ósmosis inversa que puede utilizarse en la presente invención se incluyen materiales poliméricos, tales como polímeros de acetato de celulosa, poliamidas, poliésteres, poliimidas, polímeros vinílicos y polisulfonas. La membrana no está limitada a una membrana constituida por solo uno de los materiales, y puede ser una membrana que comprende una pluralidad de materiales de membrana.

Como la membrana de nanofiltración a 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 con funcionalidad de poliamida de piperazina reticulada; y elementos de membrana de nanofiltración SU-210, SU-220, SU-600 y SU-610, fabricados por Toray Industries, Inc., que comprenden una membrana de nanofiltración UTC60, fabricada por el mismo fabricante, que comprende una poliamida de piperazina reticulada como componente principal. El elemento de membrana de nanofiltración es, más preferentemente, 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, aún más preferentemente, SU-210, SU-220, SU-600 o SU-610.

Como la membrana de ósmosis inversa a utilizar en la presente invención, es preferente un elemento de membrana enrollado en espiral, tal 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 de tipo de baja presión, así como SU-810, SU-820, SU-820L y SU-820FA que contienen 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, fabricados por Nitto Denko Corporation; RO98pHt, RO99, HR98PP y CE4040C-30D, fabricados por Alfa-Laval; GE Sepa, fabricado por GE; y BW30-4040, TW30-4040, XLE-4040, LP-4040, LE-4040, SW30-4040 y SW30HRLE-4040, fabricados por FilmTec Corporation.

A continuación, se describe más específicamente un aparato para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención para producir un líquido que contiene azúcar por hidrólisis enzimática de celulosa con referencia a los dibujos adjuntos.

Como un mecanismo de un aparato para llevar a cabo el procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, el aparato de la presente invención tiene una constitución de aparato que comprende: 1. un depósito de hidrólisis al que están conectados una tubería de alimentación de enzima recuperada y una tubería de alimentación de enzima fresca; 2. un dispositivo para la separación sólido-líquido de un hidrolizado; 3. un depósito de retención de líquido que contiene azúcar que tiene una tubería de suministro de agua para lavar una membrana de ultrafiltración y/o para retirar la enzima recuperada retenida en una tubería de circulación; y 4. un dispositivo de membrana de ultrafiltración para la separación de la enzima y un líquido que contiene azúcar; que están funcionalmente conectados entre sí. Es decir, en el procedimiento de la presente invención para producir un líquido que contiene azúcar, la hidrólisis primaria se lleva a cabo utilizando enzima recuperada. Para llevar a cabo esto, se proporcionaron 1. el depósito de hidrólisis al que están conectados una tubería de alimentación de enzima recuperada y una tubería de alimentación de carbohidrasa fresca. Además, para retirar la enzima recuperada contenida en el hidrolizado, se proporcionaron, 2. el dispositivo para la separación sólido-líquido de un hidrolizado; y 4. el dispositivo de membrana de ultrafiltración para la separación de la enzima y un líquido que contiene azúcar. Además, para eliminar el líquido de enzima recuperada y lavar la membrana de ultrafiltración al mismo tiempo, se proporcionó, 3. el depósito de retención de líquido que contiene azúcar que tiene una tubería de suministro de agua para lavar una membrana de ultrafiltración y/o para retirar enzima recuperada retenida en una tubería de circulación. Los ejemplos específicos del aparato se describen a continuación con referencia a la figura 2 hasta la figura 10.

La figura 2 muestra un ejemplo del aparato para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención. Es decir, el aparato de la figura 2 comprende, como constituyentes:

un depósito de hidrólisis -1- que tiene: una tubería de alimentación de enzima recuperada -4- que puede alimentar, de forma independiente, la enzima recuperada al depósito de hidrólisis y puede controlar adicionalmente la alimentación, según se requiera; y una tubería de alimentación de enzima fresca -6- que puede alimentar, de forma independiente, enzima fresca al depósito de hidrólisis y puede controlar, adicionalmente, la alimentación, según se requiera; que están conectados de forma independiente, al depósito de hidrólisis -1-;

un dispositivo de filtración a presión -9- para la separación sólido-líquido del hidrolizado;

un depósito de retención de líquido que contiene azúcar -12- que tiene una tubería de suministro de agua -11- para lavar una membrana de ultrafiltración y/o para retirar la enzima recuperada retenida en una tubería de circulación -15-; y

un dispositivo de membrana de ultrafiltración -14- para la separación de la enzima y el líquido que contiene azúcar.

Además, para el depósito de hidrólisis -1-, se proporcionaron un termostato -2- para mantener la temperatura durante la hidrólisis; una cuchilla de agitación -3- para mezclar lignocelulosa por agitación; y una entrada de celulosa -7-. La tubería de alimentación de enzima recuperada -4- y la tubería de alimentación de enzima fresca -6- están conectadas a un depósito de retención de enzima recuperada -5- y a un depósito de retención de enzima fresca -8-, respectivamente, a través de válvulas. Preferentemente, las válvulas se controlan electrónicamente por separado con válvulas de manguito.

El depósito de hidrólisis -1- está conectado al dispositivo de filtración a presión -9-, en el que se separa el hidrolizado, a través de una válvula y una bomba de aire o similar, para permitir la transferencia del hidrolizado al dispositivo de filtración a presión -9-. Al dispositivo de filtración a presión -9-, está conectado un compresor -10- para suministrar presión de filtración.

El líquido que contiene azúcar obtenido por filtración a presión se retiene en el depósito de retención de líquido que contiene azúcar -12-. El depósito de retención de líquido que contiene azúcar -12- está conectado a un dispositivo de membrana de ultrafiltración -14- a través de una bomba de circulación -13-. La enzima recuperada que ha pasado a través del lado de la membrana (lado de alimentación) de la membrana de ultrafiltración se devuelve al depósito de retención de líquido que contiene azúcar -12- a través de una tubería de circulación -15-. La solución que contiene azúcar después de la eliminación de la enzima se recoge en el lado secundario (lado del permeado) como un filtrado. La enzima recuperada recogida en el depósito de retención de líquido que contiene azúcar -12- se envía al

depósito de retención de enzima recuperada -5- a través de una tubería de enzima recuperada -16- y una bomba. El agua se suministra al depósito de retención de líquido que contiene azúcar -12- a través de la tubería de suministro de agua -11-, y el agua se hace circular a través del dispositivo de membrana de ultrafiltración -14- y la tubería de circulación -15- con la bomba de circulación -13-. Mediante esto, el componente enzimático recuperado retenido en la superficie de la membrana de ultrafiltración y en la tubería de circulación -15- puede recuperarse, adicionalmente, como una solución, lo que hace que el proceso sea eficiente. Además, también se puede recuperar el componente de celulosa insoluble en agua derivado de un hongo filamentosos adherido a la superficie de la membrana de ultrafiltración y similar. Además, esta circulación de agua permite el lavado de la superficie de la membrana de ultrafiltración proporcionada en el dispositivo de membrana de ultrafiltración -14-, y es útil para la supresión del ensuciamiento de la membrana. Mediante esta operación, el agua retenida en el depósito de retención de líquido que contiene azúcar -12- se envía al depósito de retención de enzima recuperada -5- a través de la tubería de enzima recuperada -16-. Por lo tanto, el agua suministrada a través de la tubería de suministro de agua -11- se utiliza para la hidrólisis de lignocelulosa en el depósito de hidrólisis -1-.

La figura 3 muestra otro ejemplo del aparato para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención. Es decir, el aparato que se muestra en la figura 3 comprende, como constituyentes:
 un dispositivo de mezcla de celulosa/enzima recuperada -18- para mezclar la enzima recuperada con celulosa para realizar la hidrólisis primaria;
 un depósito de hidrólisis -1- que tiene una tubería de alimentación de mezcla de celulosa/enzima recuperada -17- y una tubería de alimentación de enzima fresca -6-, que están conectados de forma independiente al depósito de hidrólisis -1-;
 un dispositivo de filtración a presión -9- para la separación sólido-líquido del hidrolizado;
 un depósito de retención de líquido que contiene azúcar -12- que tiene una tubería de suministro de agua -11- para lavar una membrana de ultrafiltración y/o para retirar la enzima recuperada retenida en una tubería de circulación -15-; y
 un dispositivo de membrana de ultrafiltración -14- para la separación de la enzima y el líquido que contiene azúcar.

Este aparato es diferente del aparato que se muestra en la figura 2 en términos del dispositivo de mezcla de celulosa/enzima recuperada -18- y la entrada -17- proporcionados para el dispositivo. El dispositivo de mezcla de celulosa/enzima recuperada -18- es un dispositivo para mezclar celulosa con la enzima recuperada, y la enzima recuperada se mezcla con la celulosa utilizando un tornillo interno. En el dispositivo de mezcla de celulosa/enzima recuperada -18- , se lleva a cabo la hidrólisis primaria de la etapa (1). El dispositivo de mezcla de celulosa/enzima recuperada -18- puede mantenerse a una temperatura adecuada para la hidrólisis primaria. Además, la enzima recuperada puede incubarse de forma preliminar, seguido de mezclarse con celulosa en el dispositivo de mezcla de celulosa/enzima recuperada -18- para realizar la hidrólisis primaria. Mezclando de forma preliminar la enzima recuperada con celulosa en el dispositivo de mezcla de celulosa/enzima recuperada -18-, puede reducirse el coste de la energía requerida para agitar la mezcla en el depósito de hidrólisis -1-. Además, mezclando de forma preliminar la enzima recuperada con celulosa en el dispositivo de mezcla de celulosa/enzima recuperada -18-, se puede acortar el tiempo requerido para dispersar uniformemente la celulosa en el depósito de hidrólisis -1-, lo que da como resultado un acortamiento del tiempo requerido para la hidrólisis. El hidrolizado primario obtenido en el dispositivo de mezcla de celulosa/enzima recuperada -18- se alimenta al dispositivo de hidrólisis -1- a través de la tubería de suministro de mezcla de celulosa/enzima recuperada -17-. A continuación, la enzima fresca que contiene la celulosa derivada de un hongo filamentosos de la etapa (2) se añade desde la tubería de alimentación de enzima fresca -6- para realizar la hidrólisis secundaria. La posterior separación sólido-líquido y la operación de recuperación de la enzima son las mismas que para el aparato que se muestra en la figura 2.

La figura 4 muestra otro ejemplo del aparato para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención. El aparato que se muestra en la figura 4 corresponde al caso en el que se utiliza un dispositivo de separación sólido-líquido -19- que comprende un filtro de presión para el aparato descrito anteriormente en la figura 2. El depósito de retención de la enzima recuperada -5-, el depósito de retención de la enzima fresca -8- y la cuchilla de agitación -3- que se describen en la figura 2 no se muestran en la figura 4, dado que estos pueden proporcionarse según se requiera. Los sólidos separados por el dispositivo de separación sólido-líquido -19- se eliminan a través de una tubería de descarga de sólidos -20-. El dispositivo de separación sólido-líquido -19- puede ser un filtro de presión, tal como se muestra en la figura 2 y la figura 3 anteriores, y entre los ejemplos de otros dispositivos de separación sólido-líquido se incluyen una centrífuga continua, un decantador de tornillo, una centrífuga De Laval, una prensa de tornillo, filtro de correa y filtro de tambor. En términos de las características básicas del aparato, el depósito de hidrólisis tiene una tubería de alimentación de enzima recuperada -4- y una tubería de alimentación de enzima fresca -6- que están conectadas de forma independiente al mismo y permiten un control independiente de la adición de enzima recuperada y la adición de enzima fresca, y el depósito de retención de líquido que contiene azúcar -12- tiene una tubería de suministro de agua -11- conectada de manera que el agua suministrada desde la tubería de suministro de agua -11- pueda circular a un dispositivo de membrana de ultrafiltración -14- y también pueda suministrarse a través de una tubería de enzima recuperada -16- al depósito de hidrólisis -1-. Estas características son las mismas que las de los aparatos que se muestran en la figura 2 y la figura 3 .

La figura 5 muestra otro ejemplo del aparato para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención. El aparato que se muestra en la figura 5 es básicamente el mismo que el aparato descrito anteriormente en la figura 4, pero el

lado del líquido no permeado de la membrana de ultrafiltración -14- está conectado al depósito de retención de la enzima recuperada -5-. Este aparato utiliza particularmente, como membrana de ultrafiltración, elementos en espiral que están conectados linealmente o en forma de árbol. En este aparato, de manera similar a los aparatos que se muestran en las figuras 2 a 4, una tubería de suministro de agua -11- está conectada a un depósito de retención de líquido que contiene azúcar -12-. El agua suministrada a través de la tubería de suministro de agua -11- puede circular en el dispositivo de membrana de ultrafiltración -14- mediante el cambio de tuberías utilizando una válvula de tres vías -21-, y la conmutación adicional utilizando la válvula de tres vías -21- permite que el agua se suministre en un depósito de retención de enzima recuperada -5-. Además, una tubería de enzima recuperada -16- está conectada al depósito de retención de enzima recuperada -5-, y, a través de esta tubería, el agua puede suministrarse al depósito de hidrólisis -1-. De manera similar a los aparatos que se muestran en las figuras 2 a 4, una tubería de alimentación de enzima recuperada -4- y una tubería de alimentación de enzima fresca -6- están conectados de forma independiente al depósito de hidrólisis, permitiendo el control independiente de la adición de la enzima recuperada y la adición de enzima fresca.

La figura 6 muestra otro ejemplo del aparato para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención. En el aparato que se muestra en la figura 6, un dispositivo de membrana de microfiltración -22- se coloca aguas abajo de un dispositivo de separación sólido-líquido -19-. En los casos en que los sólidos no pueden eliminarse suficientemente en el dispositivo de separación sólido-líquido -19-, el procesamiento adicional con el dispositivo de membrana de microfiltración -22- permite la producción de un líquido que está casi completamente libre de sólidos. Con esto, el ensuciamiento de la membrana del dispositivo de membrana de ultrafiltración -14- se puede reducir en una etapa posterior.

La figura 7 es un dibujo detallado del dispositivo de membrana de microfiltración -22- que se muestra en la figura 6, y muestra una constitución del dispositivo para realizar la filtración de flujo transversal. En este dispositivo, el filtrado separado por el dispositivo de separación sólido-líquido -19- se retiene en un depósito de filtrado de separación sólido-líquido -23-, y la filtración de flujo transversal se realiza en una membrana de microfiltración -25- conectada a través de una bomba -24-. La membrana de microfiltración -25- puede estar en forma de una membrana plana o una membrana de fibras huecas. La membrana de fibras huecas puede ser una membrana del tipo de presión interna o una membrana del tipo de presión externa.

La figura 8 es un dibujo detallado del dispositivo de membrana de microfiltración -22- que se muestra en la figura 6, y muestra una constitución del dispositivo para realizar una filtración sin salida en el dispositivo de membrana de microfiltración -22-. El filtrado separado por el dispositivo de separación sólido-líquido -19- se retiene en un depósito de retención de filtrado de separación sólido-líquido -23-, y se filtra a través de una membrana de microfiltración -25-. En casos de filtración sin salida, puede proporcionarse un dispositivo de suministro de aire comprimido -26- para realizar el lavado con burbujas de aire de la superficie de la membrana, y puede colocarse una bomba de lavado inverso -27- para el lavado inverso. El lavado inverso se puede llevar a cabo con el filtrado recuperado en el depósito de retención de líquido que contiene azúcar -12- o con un líquido de lavado de membrana común o agente líquido. La membrana de microfiltración -25- puede estar en forma de una membrana plana o una membrana de fibras huecas. La membrana de fibras huecas puede ser una membrana del tipo de presión interna o una membrana del tipo de presión externa.

La figura 9 muestra otro ejemplo del aparato para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención. El aparato para llevar a cabo la presente invención para producir un líquido que contiene azúcar puede tener, adicionalmente, una membrana de ósmosis inversa y/o una membrana de nanofiltración para concentrar el líquido que contiene azúcar. La figura 9 muestra un aparato correspondiente al aparato que se muestra en la figura 4 al que está conectado, adicionalmente, un dispositivo de membrana de nanofiltración o de membrana de ósmosis inversa -30-. Al lado del filtrado del dispositivo de membrana de ultrafiltración -14-, se conecta, adicionalmente, un depósito de concentración de líquido que contiene azúcar -28-, y la filtración se realiza con una membrana de ósmosis inversa y/o una membrana de nanofiltración -30- a través de una bomba de alta presión -29-. El líquido que contiene azúcar se bloquea mediante la membrana de ósmosis inversa y/o la membrana de nanofiltración y, por lo tanto, se concentra en el depósito de concentración de líquido que contiene azúcar -28-. Por otro lado, el exceso de agua puede eliminarse como el filtrado. El dispositivo de membrana de ósmosis inversa y/o de membrana de nanofiltración -30- pueden colocarse conectándose al lado del filtrado del dispositivo de membrana de ultrafiltración -14- en cualquiera de los aparatos que se muestran en las figuras 2 a 6.

La figura 10 muestra otro ejemplo del aparato para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención. La tubería de alimentación de enzima recuperada -4- y la tubería de alimentación de enzima fresca están preferentemente conectadas, de forma independiente, al depósito de hidrólisis -1-, pero la tubería -4- y la tubería -6- se pueden unir entre sí en una válvula de tres vías -31- o similar para formar una sola tubería (tubería de alimentación de enzima fresca o de enzima recuperada) conectada al depósito de hidrólisis -1-, siempre que se pueda controlar la alimentación de cada uno de los componentes de la enzima.

El agua suministrada desde la tubería de suministro de agua -11- puede ser agua caliente. La temperatura del agua caliente, preferentemente, no es superior a 60°C a la vista de la prevención de la inactivación de la enzima. Suministrando agua caliente desde la tubería de suministro de agua, y permitiendo que el agua caliente circule

dentro del dispositivo de membrana de ultrafiltración -14-, se puede obtener un alto efecto de lavado para la membrana de ultrafiltración. Para un mayor efecto de lavado, la temperatura del agua tibia es, preferentemente, de 30°C a 60°C.

5 EJEMPLOS

La presente invención se describe, a continuación, más específicamente por medio de ejemplos. Sin embargo, la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

10 (Ejemplo de referencia 1) Preparación de celulosa (composición enzimática de celulosa derivada de *Trichoderma*)

Se preparó una composición enzimática derivada de un líquido de cultivo de *Trichoderma* mediante el siguiente procedimiento.

15 [Precultivo]

Se preparó la mezcla del 5% (p/v) de licor de maceración del maíz, el 2% (p/vol) de glucosa, el 0,37% (p/vol) de tartrato de amonio, el 0,14% (p/vol) de sulfato de amonio, el 0,2% (p/vol) de dihidrogenofosfato de potasio, el 0,03% (p/vol) de cloruro cálcico dihidratado, el 0,03% (p/vol) de sulfato de magnesio heptahidratado, el 0,02% (p/vol) de cloruro de zinc, el 0,01% (p/vol) de cloruro de hierro (III) hexahidratado, el 0,004% (p/vol) de sulfato de cobre (II) pentahidratado, el 0,0008% (p/vol) de cloruro de manganeso tetrahidratado, el 0,0006% (p/vol) de ácido bórico y el 0,0026% (p/vol) de heptamolibdato de hexaamonio tetrahidratado en agua destilada, y 100 ml de esta mezcla se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con deflectores, seguido de esterilización en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Después de dejar enfriar la mezcla, se añadieron PE-M y Tween 80, cada uno de los cuales se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos por separado de la mezcla, al 0,01% (p/vol) cada uno. A este medio de precultivo, se le inoculó *Trichoderma reesei* ATCC68589 a 1×10^5 células/ml, y las células se cultivaron a 28°C durante 72 horas con agitación a 180 rpm, para realizar el precultivo (agitador: BIO-SHAKER BR-40LF, fabricado por TAITEC CORPORATION).

30 [Cultivo principal]

Se preparó la mezcla del 5% (p/vol) de licor de maceración del maíz, el 2% (p/vol) de glucosa, el 10% (p/vol) de celulosa (Avicel), el 0,37% (p/vol) de tartrato de amonio, el 0,14% (p/vol) de sulfato de amonio, el 0,2% (p/vol) de dihidrogenofosfato de potasio, el 0,03% (p/vol) de cloruro cálcico dihidratado, el 0,03% (p/vol) de sulfato de magnesio heptahidratado, el 0,02% (p/vol) de cloruro de zinc, el 0,01% (p/vol) de cloruro de hierro (III) hexahidratado, el 0,004% (p/vol) de sulfato de cobre (II) pentahidratado, el 0,0008% (p/vol) de cloruro de manganeso tetrahidratado, el 0,0006% (p/vol) de ácido bórico y el 0,0026% (p/vol) de heptamolibdato de hexaamonio tetrahidratado en agua destilada, y 2,5 l de esta mezcla se colocaron en una jarra de agitación de 5 l (fabricada por ABLE, DPC-2A), seguido de esterilización en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Después de dejar enfriar la mezcla, se añadieron PE-M y Tween 80, cada uno de los cuales se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos por separado de la mezcla, al 0,1% cada uno. A la mezcla resultante, se le inocularon 250 ml de precultivo de *Trichoderma reesei* ATCC68589 previamente preparado con un medio líquido por el procedimiento descrito anteriormente. Las células se cultivaron a 28°C durante 87 horas a 300 rpm a una tasa de aireación de 1 vvm. Después de la centrifugación, el sobrenadante se sometió a filtración por membrana (Stericup-GV, fabricada por Millipore, material: PVDF). Al líquido de cultivo preparado en las condiciones descritas anteriormente, se le añadió β -glucosidasa (Novozyme 188) a una relación en peso de proteína de 1/100, y la mezcla resultante se utilizó como celulosa derivada de *Trichoderma* en los ejemplos, a continuación.

50 (Ejemplo de referencia 2) Preparación de celulosa pretratada

[Preparación de celulosa pretratada 1]

Se utilizó Avicell (fabricado por Merck), que está disponible en el mercado, como la celulosa 1 pretratada en los ejemplos, a continuación, sin realizar ningún tratamiento.

55 [Preparación de celulosa pretratada 2]

Como biomasa que contenía celulosa, se utilizó paja de arroz. La biomasa que contenía celulosa se empapó 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. A continuación, se llevó a cabo la separación sólido-líquido para separar la celulosa tratada con ácido sulfúrico de la solución acuosa de ácido sulfúrico (en lo sucesivo denominado "líquido de tratamiento con ácido sulfúrico diluido"). Posteriormente, la celulosa tratada con ácido sulfúrico se mezcló con el líquido de tratamiento de ácido sulfúrico diluido con agitación, de manera que la concentración de los contenidos sólidos fue del 10% en peso, y el pH se ajustó a aproximadamente 5 con hidróxido sódico. La mezcla resultante se utilizó en los ejemplos, a continuación, como celulosa pretratada 2.

[Preparación de celulosa pretratada 3]

Como celulosa, se utilizó paja de arroz. La biomasa que contenía 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 amoníaco gaseoso, y la muestra se empapó 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 procesó en un baño de aceite a 150°C durante 1 hora. A continuación, el reactor se retiró del baño de aceite, y el amoníaco gaseoso se filtró en una campana extractora, seguido de aspiración del interior del reactor a 10 Pa con una bomba de vacío, secando de este modo la celulosa. El resultante se utilizó en los ejemplos, a continuación, como celulosa pretratada 3.

[Preparación de celulosa pretratada 4]

Como biomasa que contenía celulosa, se utilizó paja de arroz. La biomasa que contenía celulosa se empapó 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, la separación sólido-líquido se llevó a cabo mediante centrifugación (3000 G) para separar el componente de biomasa procesada del componente de solución (en lo sucesivo denominado "líquido tratado hidrotérmicamente"). Esto se utilizó en los ejemplos, a continuación, como celulosa pretratada 4.

(Ejemplo de referencia 3) Medición de la concentración de azúcar

Las concentraciones de glucosa y xilosa contenidas en la solución acuosa de azúcar se midieron bajo las condiciones de HPLC descritas a continuación, basándose en la comparación con muestras patrón.

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

(Ejemplo de referencia 4) Medición de la actividad enzimática de la celulasa derivada de *Trichoderma*

La actividad enzimática de la celulasa derivada de *Trichoderma* se midió mediante el siguiente procedimiento.

1) Actividad de degradación de celulosa cristalina

Para una enzima líquida (preparada en condiciones predeterminadas), se añadió Avicel (fabricado por Merck ... esto necesita confirmación) a 1 g/l y se añadió tampón de acetato de sodio (pH 5,0) a 100 mM, seguido por la dejar la mezcla resultante reaccionar a 50°C durante 24 horas. Este líquido de reacción se preparó en un tubo de 1 ml, y la reacción se dejó avanzar mezclando 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 sobrenadante. La medición de la concentración de glucosa se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el ejemplo de referencia 3. La concentración de la glucosa producida (g/l) se utilizó como valor de actividad de la actividad de degradación de Avicel.

2) Actividad de degradación de celobiosa

A una enzima líquida, se le añadió celobiosa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a 500 mg/l y se le añadió tampón de acetato de sodio (pH 5,0) a 100 mM, seguido de dejar la mezcla resultante reaccionar a 50°C durante 0,5 horas. Este líquido de reacción se preparó en un tubo de 1 ml, y la reacción se dejó avanzar mezclando 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 sobrenadante. La medición de la concentración de glucosa se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el ejemplo de referencia 3. La concentración de la glucosa producida (g/l) se utilizó como valor de actividad de la actividad de degradación de la celobiosa.

3) Actividad de degradación de xilano

A una enzima líquida, se le añadió xilano (xilano de madera de abedul, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a 10 g/l y se le añadió tampón de acetato de sodio (pH 5,0) a 100 mM, seguido de dejar mezcla resultante reaccionar a 50°C durante 4 horas. Este líquido de reacción se preparó en un tubo de 1 ml, y la reacción se dejó avanzar mezclando 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 sobrenadante. La medición de la concentración de xilosa se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el ejemplo de referencia 3. La concentración de xilosa producida (g/l) se utilizó como el valor de actividad de la actividad de degradación de xilosa.

(Ejemplo comparativo 1)

Como ejemplo comparativo, se produjo un líquido que contiene azúcar a partir de celulosa, tal como se describe a continuación, sin realizar ni la hidrólisis primaria ni la hidrólisis secundaria.

[Etapa 1: Hidrólisis]

A cada una de las celulosas pretratadas 1 a 4 (1 g cada una), se le añadieron 0,2 ml (cantidad de proteína, 10 mg) de la enzima fresca descrita en el ejemplo de referencia 1 (concentración de proteína, 50 mg/ml), y se le añadió adicionalmente la solución de la enzima recuperada mediante el procedimiento que se describe más adelante en la etapa 2. Se añadió, adicionalmente, agua destilada de manera que el peso de la solución resultante se convirtió en 10 g. La composición se transfirió a un reactor de brazo lateral (φ30 NS14/23, fabricado por Tokyo Rikakikai Co., Ltd.), seguido de hidrólisis a 50°C durante 19 horas con incubación y agitación (agitador mecánico compacto CPS-1000, fabricado por Tokyo Rikakikai Co., Ltd., adaptador de conversión, entrada de alimentación con llave de paso de tres vías, incubadora MG-2200).

[Etapa 2: Separación sólido-líquido y recuperación de la enzima (enzima recuperada) del líquido que contiene azúcar]

El hidrolizado en la etapa 1 se sometió a separación sólido-líquido por centrifugación (4.500 G, 10 minutos) y se separó en un líquido que contiene azúcar y el residuo. Las concentraciones de glucosa y xilosa en el líquido que contiene azúcar se midieron por el procedimiento descrito en el ejemplo de referencia 3, y se calcularon como azúcares producidos.

El líquido que contiene azúcar se sometió adicionalmente a filtración por membrana (Steriflip-GP, fabricado por Millipore, material: PES). El sobrenadante obtenido se aplicó a una membrana de ultrafiltración que tenía un límite de peso molecular de 10.000 (VIVASPIN 20, fabricado por Sartorius stedim biotech, material: PES) y se centrifugó a 4.500 G hasta que la fracción de membrana se redujo a 1 ml. A la fracción de membrana, se le añadieron 10 ml de agua destilada y la mezcla resultante se centrifugó nuevamente a 4.500 G hasta que la fracción de la membrana se redujo a 1 ml. Después de eso, la enzima se recuperó de la fracción de membrana para proporcionar una enzima recuperada. La enzima recuperada se reutilizó para la hidrólisis en la etapa 1, tal como se describió anteriormente.

En el presente ejemplo comparativo, la etapa 1 y la etapa 2 se llevaron a cabo con rotación para recuperar y reutilizar la celulosa. El ciclo constituido por la etapa 1 y la etapa 2 se repitió un total de 6 veces, para llevar a cabo la recuperación y la reutilización. La 0ª reacción, en la que la recuperación y la reutilización no se llevaron a cabo, se realizó mediante el siguiente procedimiento.

[Etapa 0: 0ª hidrólisis]

A cada una de las celulosas pretratadas 1 a 4 (1 g cada una), se le añadieron 0,3 ml (cantidad de proteína, 15 mg) de enzima fresca (concentración de proteína, 50 mg/ml) (la enzima recuperada no se añadió ya que esta era la 0ª hidrólisis). Se añadió, adicionalmente, agua destilada de manera que el peso de la solución resultante se convirtió en 10 g. La composición se transfirió a un reactor de brazo lateral (φ30 NS 14/23, fabricado por Tokyo Rikakikai Co., Ltd.), seguido de hidrólisis a 50°C durante 19 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). Mediante la separación del hidrolizado obtenido por el procedimiento descrito en la etapa 2 anterior, se obtuvo una enzima recuperada. Se midieron las concentraciones de glucosa y xilosa en el líquido que contiene azúcar en este momento.

La tabla 1 resume las concentraciones de glucosa (Glc, g/l) y xilosa (Xyl, g/l) en los líquidos que contienen azúcar obtenidos por las reacciones en las que las etapas 0 y 2 se llevaron a cabo una vez y las etapas 1 y 2 se llevaron a cabo en orden un total de 6 veces. A medida que aumentó el número de veces de recuperación y reutilización, disminuyeron la glucosa (Glc) y la xilosa (Xyl). Además, se reveló que la eficiencia de producción de azúcar disminuye gradualmente a medida que aumenta el número de veces de reutilización (N).

[Tabla 1]

		0ª hidrólisis	1ª hidrólisis	2ª hidrólisis	3ª hidrólisis	4ª hidrólisis	5ª hidrólisis	6ª hidrólisis
Celulosa pretratada 1	Glc	42	39	37	35	31	30	27
	Xyl	1	0,8	0,7	0,6	0,4	0,4	0,3
Celulosa pretratada 2	Glc	32	30	28	27	25	23	20
	Xyl	7	4	3	2	0,9	0,6	0,3
Celulosa pretratada 3	Glc	40	35	31	28	25	24	22
	Xyl	12	10	9	7	6	4	4
Celulosa pretratada 4	Glc	25	23	22	20	18	18	15
	Xyl	4	2	2	1	0,4	0,2	0,1

(Ejemplo 1)

5 Como ejemplo, la celulosa se sometió a la hidrólisis primaria y a la hidrólisis secundaria, tal como se describe a continuación, para producir un líquido que contiene azúcar.

[Etapa 1: Hidrólisis primaria]

10 A cada una de las celulosas pretratadas 1 a 4 (1 g de cada una), se le añadió agua destilada, y se le añadió una enzima recuperada que se recuperó mediante el procedimiento mencionado a continuación, en la etapa 3, seguido de la adición posterior de agua destilada de manera que el peso total se convirtió en 10 g. La composición se transfirió a un reactor de brazo lateral (φ 30 NS14/23, fabricado por Tokyo Rikakikai Co., Ltd.), seguido de hidrólisis 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 llave de paso de tres vías, incubadora MG-2200).

[Etapa 2: Hidrólisis secundaria]

20 Al hidrolizado primario en la etapa 1, se le añadieron 0,2 ml (cantidad de proteína, 10 mg) de la enzima fresca descrita en el ejemplo de referencia 1 (concentración de proteína, 50 mg/ml), y la reacción se dejó avanzar a 50°C durante 18 horas

[Etapa 3: Separación sólido-líquido y recuperación de la enzima (enzima recuperada) de líquido que contiene azúcar]

25 El hidrolizado secundario en la etapa 3 se sometió a separación sólido-líquido por centrifugación (4.500 G, 10 minutos), y se separó en un líquido que contiene azúcar y el residuo. Las concentraciones de glucosa y xilosa en el líquido que contiene azúcar se midieron por el procedimiento descrito en el ejemplo de referencia 3, y se calcularon como los N-ésimos azúcares producidos. El líquido que contiene azúcar se sometió, adicionalmente, a filtración por membrana (Steriflip-GP, fabricada por Millipore, material: PES), y el sobrenadante obtenido se aplicó a una membrana de ultrafiltración con un límite de peso molecular de 10.000 (VIVASPIN 20, fabricado por Sartorius stedim biotech, material: PES) y se centrifugó a 4.500 G hasta que la fracción de la membrana se redujo a 1 ml. A la fracción de membrana, se le añadieron 10 ml de agua destilada y la mezcla resultante se centrifugó nuevamente a 4.500 G hasta que la fracción de la membrana se redujo a 1 ml. A continuación, se recuperó la enzima de la fracción de membrana para proporcionar una enzima recuperada. La enzima recuperada se reutilizó para la hidrólisis en la etapa 1, tal como se describió anteriormente.

40 En el presente ejemplo, las etapas 1 a 3 se llevaron a cabo con rotación para recuperar y reutilizar la celulosa. El ciclo constituido por las etapas 1 a 3 se repitió un total de 6 veces, para llevar a cabo la recuperación y la reutilización. La 0ª reacción, en la que no se llevaron a cabo la recuperación y la reutilización, se realizó mediante el siguiente procedimiento.

[Etapa 0: 0ª hidrólisis]

45 A cada una de las celulosas pretratadas 1 a 4 (1 g de cada una), se le añadieron 0,3 ml (cantidad de proteína, 15 mg) de enzima fresca (concentración de proteína, 50 mg/ml) (la enzima recuperada no se añadió ya que este era la 0ª hidrólisis). Se añadió, adicionalmente, agua destilada de manera que el peso de la solución resultante se convirtió en 10 g. La composición se transfirió a un reactor de brazo lateral (φ 30 NS 14/23, fabricado por Tokyo Rikakikai Co., Ltd.), seguido de hidrólisis a 50°C durante 19 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). Mediante la separación del hidrolizado obtenido por el procedimiento descrito en la etapa 3 anterior, se obtuvo una enzima recuperada. Se midieron las concentraciones de glucosa y xilosa en el líquido que contiene azúcar en este momento.

55 La tabla 2 resume las concentraciones de glucosa (Glc) (g/l) y xilosa (Xly) (g/l) en los líquidos que contienen azúcar obtenidos por las reacciones en las que las etapas 0 y 3 se llevaron a cabo una vez y las etapas 1 a 3 se llevaron a cabo en orden un total de 6 veces. A medida que aumentó el número de veces de recuperación y reutilización, disminuyeron la glucosa (Glc) y la xilosa (Xyl). Sin embargo, podría confirmarse que la cantidad de producción de azúcar aumenta gradualmente al contrario que los casos en el ejemplo de referencia 1 (tabla 1).

60

[Tabla 2]

		0ª hidrólisis	1ª hidrólisis	2ª hidrólisis	3ª hidrólisis	4ª hidrólisis	5ª hidrólisis	6ª hidrólisis
Concentración de azúcar (g/l) en la celulosa pretratada 1	Glc	42	42	43	45	47	48	49
	Xyl	1	1	1	1	1,1	1,1	1,2
Concentración de azúcar (g/l) en la celulosa pretratada 2	Glc	32	32	33	33	34	36	39
	Xyl	7	6	6	7	8	9	10
Concentración de azúcar (g/l) en la celulosa pretratada 3	Glc	32	30	33	34	35	38	40
	Xyl	7	6	6	7	8	10	11
Concentración de azúcar (g/l) en la celulosa pretratada 4	Glc	25	24	24	25	25	26	26
	Xyl	4	3	3	3	3	5	5

En el presente ejemplo, la hidrólisis primaria con la enzima recuperada se realizó durante 1 hora, y la hidrólisis secundaria después de la adición de enzima fresca se realizó durante 18 horas, por lo que la reacción de hidrólisis se llevó a cabo durante 19 horas, tal como en el ejemplo comparativo 1. Además, la cantidad de adición de enzima fresca fue la misma que en el ejemplo comparativo 1. Por lo tanto, en el presente ejemplo, se demostró que, llevando a cabo con rotación las etapas de: 1. añadir la enzima recuperada a la celulosa pretratada para realizar la hidrólisis primaria; 2. añadir enzima fresca al hidrolizado para realizar la hidrólisis secundaria; y 3. someter el hidrolizado a separación sólido-líquido para obtener la enzima recuperada del líquido que contiene azúcar obtenido; la concentración del azúcar obtenida por la recuperación y reutilización, es decir, la eficacia de producción de azúcar, puede ser mayor que en el ejemplo comparativo.

(Ejemplo 2) Medición de la cantidad de adición de enzima recuperada en la hidrólisis primaria

La concentración de proteína de la enzima recuperada a añadir para la hidrólisis primaria en el ejemplo 1 se ensayó con el kit de medición BCA (kit de reactivo de ensayo de proteína BCA, fabricado por PIERCE), utilizando albúmina bovina (2 mg/ml) como muestra patrón, midiendo la absorbancia a 562 nm para realizar colorimetría. La tabla 3 resume, en términos de la recuperación/reutilización de la enzima para la celulosa pretratada 2, la relación entre la cantidad de enzima recuperada obtenida por la Nª recuperación y la cantidad de adición de enzima fresca. Teniendo en cuenta la cantidad de producción de glucosa resumida en la tabla 2 del ejemplo 1, con el presente ejemplo podría confirmarse que la cantidad de producción de glucosa puede aumentarse aún más si se satisface la relación: la cantidad de adición de enzima en la hidrólisis primaria es mayor que la cantidad de adición de enzima en la hidrólisis secundaria; y además, la relación: la cantidad de enzima recuperada reutilizada para la hidrólisis primaria es mayor que la cantidad de enzima fresca añadida para la hidrólisis secundaria; tal como en los casos de la 4ª y posterior recuperación/reutilización.

[Tabla 3]

	0ª hidrólisis	1ª hidrólisis	2ª hidrólisis	3ª hidrólisis	4ª hidrólisis	5ª hidrólisis	6ª hidrólisis
Cantidad de proteína en la enzima recuperada (mg)	-	7	8,4	9,3	11	12	14
Cantidad de proteína en la enzima fresca (mg)	15	10	10	10	10	10	10
Concentración de glucosa en la celulosa pretratada 2 (g/l)	32	32	33	33	34	36	39

(Ejemplo 3) Actividad enzimática de la enzima recuperada

La actividad de la enzima recuperada se midió para los casos de celulosa pretratada 3 (ejemplo comparativo 1: el caso en el que la enzima recuperada se alimentó al mismo tiempo con enzima fresca; ejemplo 1: el caso en el que se añadió la enzima recuperada para llevar a cabo la hidrólisis primaria, después de lo cual se alimentó la enzima

5 fresca). La actividad enzimática se midió según el ejemplo de referencia 3 para 3 tipos de actividades de degradación, es decir, 1) actividad de degradación de celulosa cristalina, 2) actividad de degradación de celobiosa y 3) actividad de degradación de xilano. Cada actividad de degradación se expresó como un valor relativo (%) de la actividad enzimática en la enzima recuperada, tomando la actividad enzimática de la enzima fresca (10 mg) como el 100(%). Las actividades de las enzimas recuperadas después de la 2ª recuperación y la 4ª recuperación se muestran en la tabla 4 (ejemplo 1) y la tabla 5 (ejemplo comparativo 1).

[Tabla 4]

	Enzima fresca (10 mg)	Enzima recuperada	
		2ª hidrólisis	4ª hidrólisis
Actividad de degradación de celulosa cristalina	100	84	110
Actividad de degradación de celobiosa	100	94	114
Actividad de degradación de xilano	100	154	250

10

[Tabla 5]

	Enzima fresca (10 mg)	Enzima recuperada	
		2ª hidrólisis	4ª hidrólisis
Actividad de degradación de celulosa cristalina	100	74	80
Actividad de degradación de celobiosa	100	80	84
Actividad de degradación de xilano	100	114	106

15

Se reveló que, a medida que aumenta el número de veces de la hidrólisis primaria, toda la actividad de degradación de celulosa cristalina, la actividad de degradación de celobiosa y la actividad de degradación de xilano tienden a aumentar, y tal tendencia es especialmente notable en la actividad de degradación de xilano. Dado que especialmente la xilanasa y xilosidasa derivadas de *Trichoderma* están implicadas en la actividad de degradación de xilano, se cree que la eficacia de recuperación de estas enzimas se ha incrementado a medida que aumentaba el número de veces de la hidrólisis primaria.

20

(Ejemplo 4) Componente de celulasa derivado de *Trichoderma* agregado contenido en la enzima recuperada

Se descubrió que, en la 4ª y posterior recuperación, se produce un componente insoluble en agua en el componente enzimático recuperado que se recupera como un líquido no permeado de la membrana de ultrafiltración. Este componente de celulasa insoluble en agua derivado de *Trichoderma* se analizó mediante el siguiente procedimiento.

25

Utilizando la celulosa pretratada 3, la hidrólisis primaria y la hidrólisis secundaria se llevaron a cabo mediante el procedimiento en el ejemplo 1, y se analizó el componente enzimático recuperado obtenido por la 4ª recuperación. La enzima recuperada (100 µl) se colocó en un tubo de centrífuga de 1,5 ml y se centrifugó a 15.000 rpm durante 5 minutos. A continuación, se eliminó el sobrenadante para obtener un sedimento en el fondo del tubo. El sedimento se lavó mediante la adición de 100 µl puros, y se introdujo en el tubo un tampón de preparación de muestras (EZ Apply, ATTO Corporation), seguido de la realización de SDS-PAGE (e-PAGEL, concentración de gel, 15%; ATTO Corporation). La tinción se realizó con azul brillante Coomassie (BioSafecoomassie Stain, Bio-Rad Laboratories). Para medir el peso molecular, se utilizó un marcador de peso molecular (PrecisionPlus Protein Standard, Kaleidoscope, Bio-Rad Laboratories).

30

35

El resultado obtenido del análisis por SDS-PAGE se muestra en la figura 11. Dado que el componente tenía un peso molecular de aproximadamente 50 a 60 kDa, se reveló que la celobiohidrolasa derivada de *Trichoderma* estaba contenida como un componente principal (figura 11).

40

(Ejemplo 5) Efecto del componente de celulasa insoluble en agua derivado de *Trichoderma* como componente de enzima recuperada

45

La enzima se recuperó de la fracción de membrana en la etapa 3 del ejemplo 1 (celulosa 3 pretratada) para obtener una enzima recuperada que, a continuación, se centrifugó a 15.000 rpm durante 5 minutos. Solamente el sobrenadante obtenido se reutilizó como la enzima recuperada, y el rendimiento de azúcar observado como resultado se comparó con los resultados en el ejemplo 1. Es decir, el ejemplo 5 describe la reutilización de la enzima recuperada a partir de la cual se eliminó el componente de celulasa insoluble en agua derivado de *Trichoderma*.

[Tabla 6]

		0ª hidrólisis	1ª hidrólisis	2ª hidrólisis	3ª hidrólisis	4ª hidrólisis	5ª hidrólisis	6ª hidrólisis
Celulosa pretratada 3 (ejemplo 1)	Glc	32	30	33	34	35	38	40
	Xyl	7	6	6	7	8	10	11
Celulosa pretratada 3	Glc	32	32	32	31	31	30	30
	Xyl	7	6	6	7	6	6	6

Es decir, se reveló que, en los casos en los que el componente de celulasa insoluble en agua derivado de *Trichoderma* contenido como una enzima recuperada no se elimina, se puede obtener una mayor tasa de producción de azúcar en la siguiente reutilización de la enzima.

5

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Mediante la presente invención, se puede producir un líquido que contiene azúcar de manera eficaz a partir de celulosa, y la celulosa obtenida se puede utilizar como un material que contiene azúcar para diversos productos de fermentación.

10

DESCRIPCIÓN DE LOS SÍMBOLOS

- 1 Depósito de hidrólisis
- 15 2 Termostato
- 3 Cuchilla de agitación
- 4 Tubería de alimentación de enzima recuperada
- 5 Depósito de retención de enzima recuperada
- 6 Tubería de alimentación de enzima fresca
- 20 7 Entrada de celulosa
- 8 Depósito de retención de enzima fresca
- 9 Dispositivo de filtración a presión
- 10 Compresor
- 11 Tubería de suministro de agua
- 25 12 Depósito de retención de líquido que contiene azúcar
- 13 Bomba de circulación
- 14 Dispositivo de membrana de ultrafiltración
- 15 Tubería de circulación
- 16 Tubería de enzima recuperada
- 30 17 Tubería de suministro de mezcla de celulosa/enzima recuperada
- 18 Dispositivo de mezcla de celulosa/enzima recuperada
- 19 Dispositivo de separación de sólido-líquido
- 20 Tubería de descarga de sólidos
- 21 Válvula de tres vías
- 35 22 Dispositivo de membrana de microfiltración
- 23 Depósito de filtrado de separación de sólido-líquido
- 24 Bomba
- 25 Membrana de microfiltración
- 26 Dispositivo de suministro de aire comprimido
- 40 27 Bomba de lavado inverso
- 28 Depósito de concentración de líquido que contiene azúcar
- 29 Bomba de alta presión
- 30 Membrana de ósmosis inversa y/o dispositivo de membrana de nanofiltración
- 31 Válvula de tres vías
- 45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para proporcionar un líquido que contiene azúcar repitiendo un proceso de producción de líquido que contiene azúcar, comprendiendo el proceso de producción de líquido que contiene azúcar las etapas (1) a (3), a continuación:
- (1) añadir celulosa a una celulosa derivada de un hongo filamentoso para llevar a cabo una hidrólisis primaria;
- 10 (2) añadir una celulosa fresca derivada de un hongo filamentoso al hidrolizado formado en la etapa (1) para llevar a cabo una hidrólisis secundaria; y
- (3) someter el hidrolizado formado en la etapa (2) a separación sólido-líquido para obtener un líquido que contiene azúcar, y recuperar la enzima del líquido que contiene azúcar;
- 15 por lo cual la hidrólisis primaria y secundaria se llevan a cabo en dos etapas separadas, y en el que dicha enzima recuperada obtenida en la etapa (3) se utiliza para la etapa (1) del siguiente y posteriores procesos de producción de líquido que contiene azúcar;
- en el que dicha celulosa se pretrata mediante tratamiento alcalino, tratamiento hidrotérmico o tratamiento con ácido sulfúrico diluido.
- 20 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento, adicionalmente, la etapa de concentrar el líquido que contiene azúcar utilizando una membrana de nanofiltración y/o de ósmosis inversa.
3. Procedimiento para la producción de un líquido que contiene azúcar, según la reivindicación 1 ó 2, en el que, como dicha celulosa derivada de un hongo filamentoso en la etapa (1) del proceso de producción de líquido que contiene azúcar, se utiliza un componente enzimático recuperado de un hidrolizado de celulosa producido por una celulosa derivada de un hongo filamentoso.
- 25 4. Procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha celulosa derivada de un hongo filamentoso en la etapa (1) o (2) comprende un componente derivado de un líquido de cultivo de un microorganismo que pertenece al género *Trichoderma*.
- 30 5. Procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha enzima recuperada comprende xilanasas y/o xilosidasas.
- 35 6. Procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha enzima recuperada comprende una celulasa insoluble en agua derivada de un hongo filamentoso.
7. Procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las cantidades de enzima añadida en dicha hidrólisis primaria y dicha hidrólisis secundaria satisfacen la siguiente relación; la cantidad de dicha enzima recubierta añadida en la etapa (1) es mayor que la cantidad de dicha enzima fresca añadida en la etapa (2).
- 40 8. Procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la recuperación de dicha celulosa derivada de un hongo filamentoso en la etapa (3) se lleva a cabo filtrando dicho líquido que contiene azúcar a través de una membrana de ultrafiltración y recuperando dicha celulosa del lado de la alimentación.
- 45

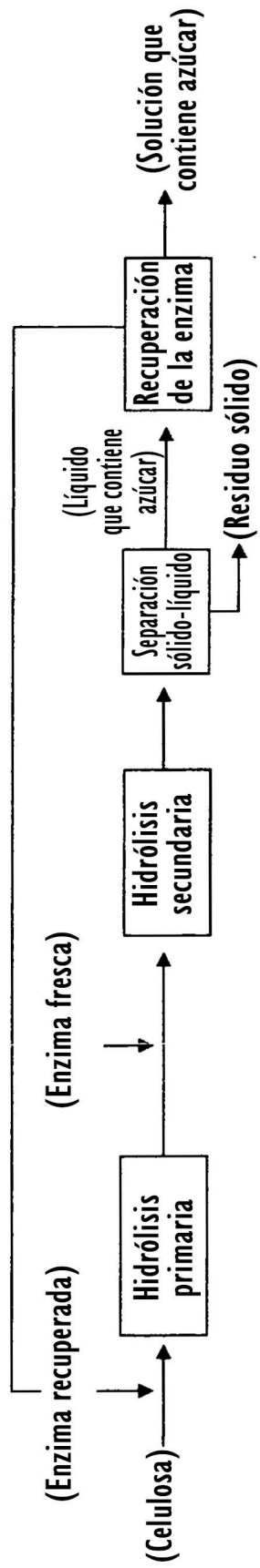


Fig.1

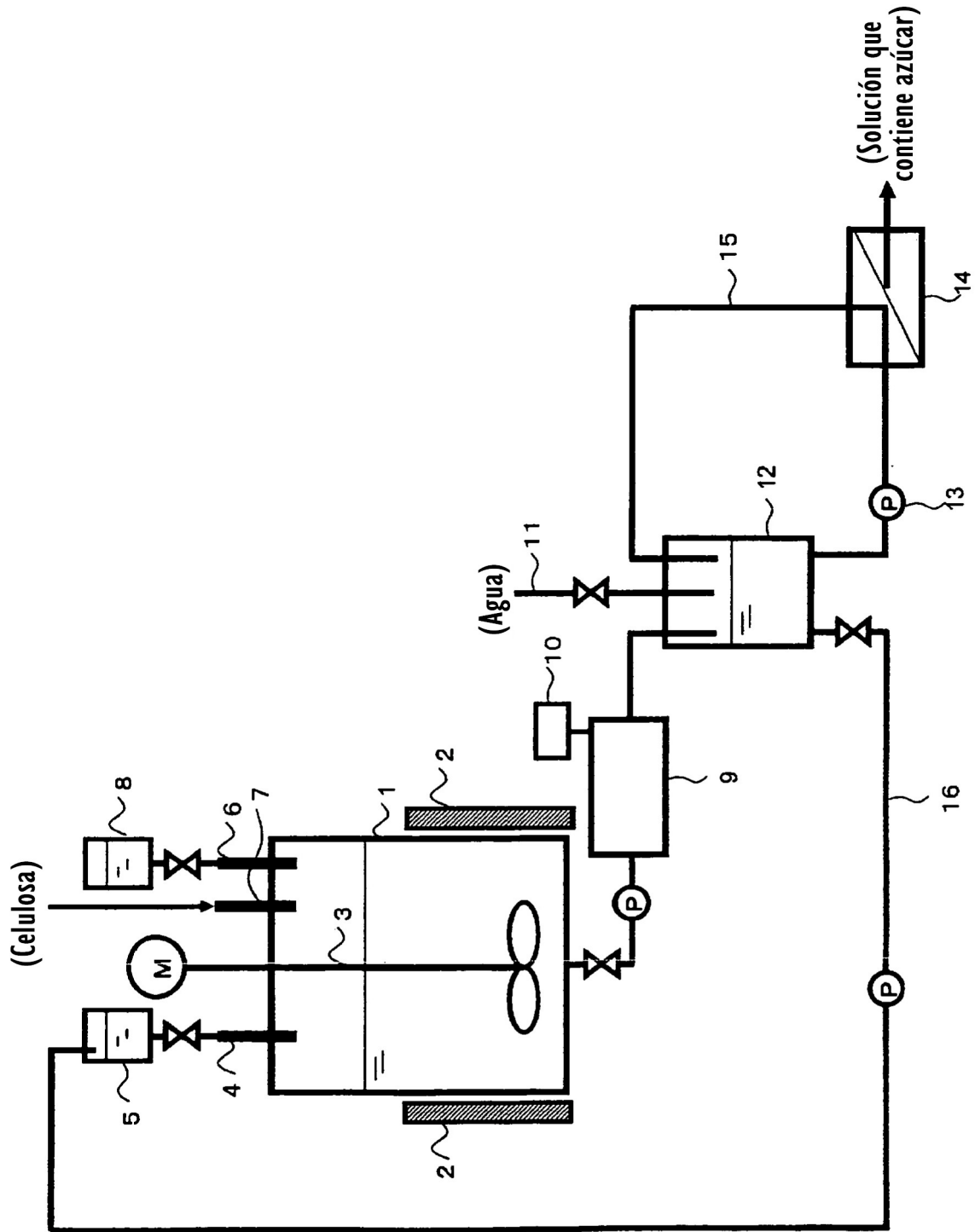


Fig.2

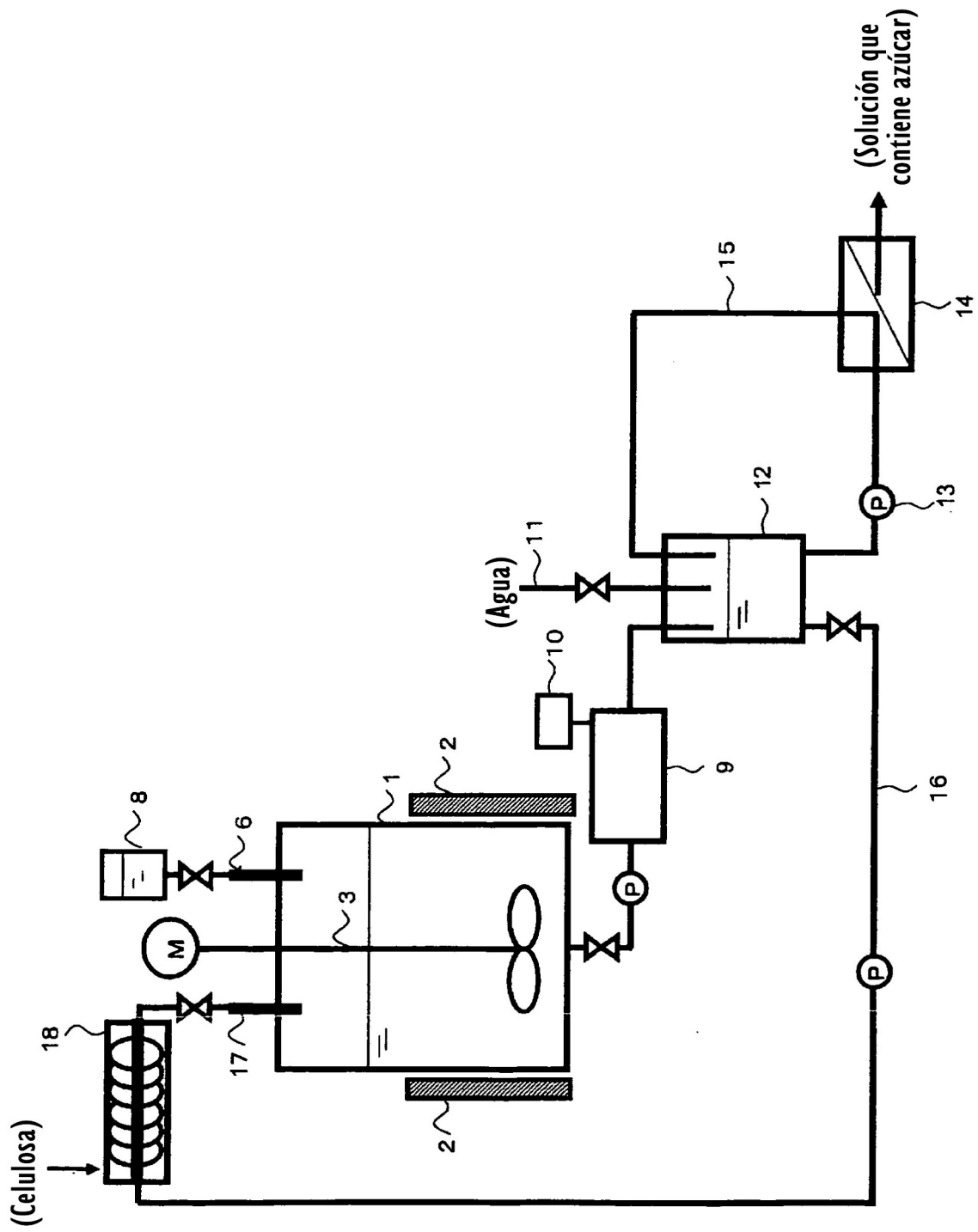


Fig.3

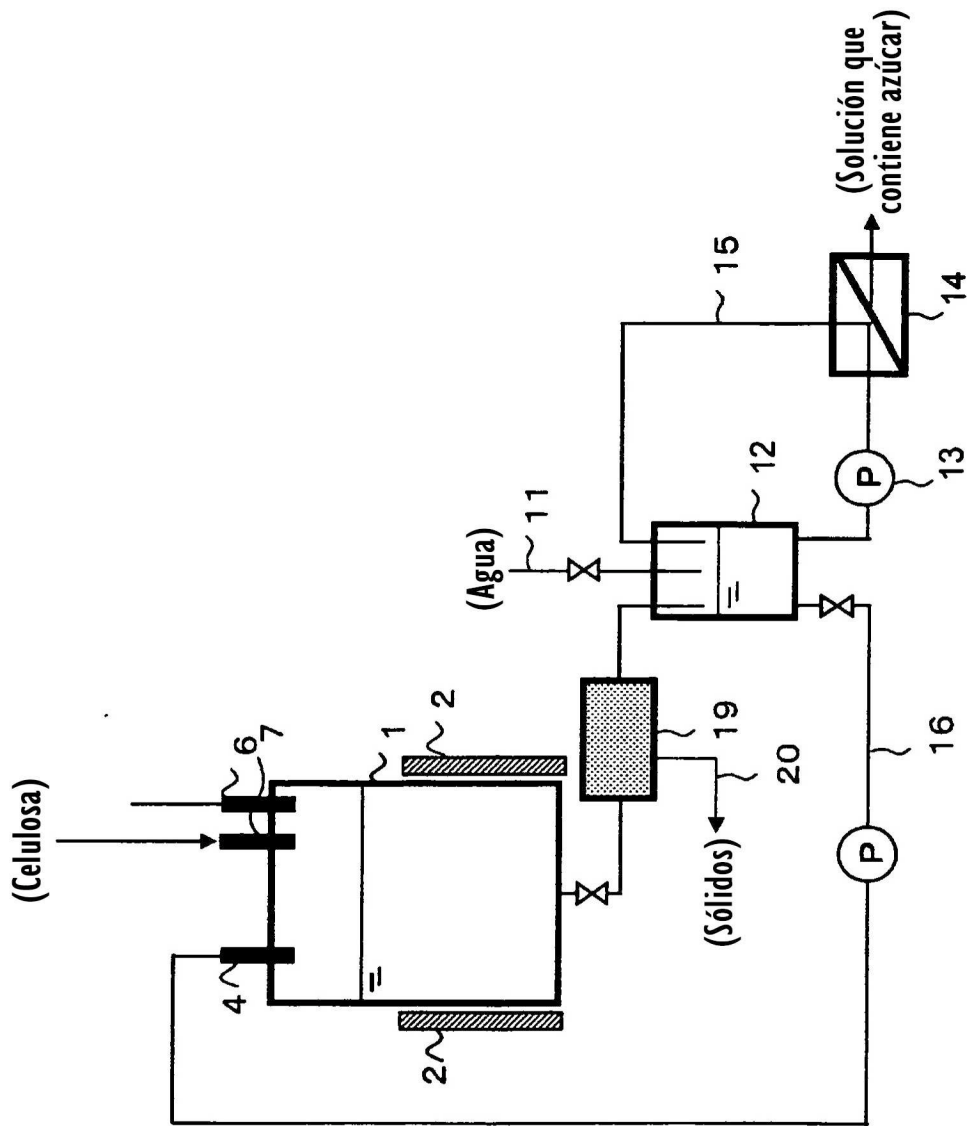


Fig.4

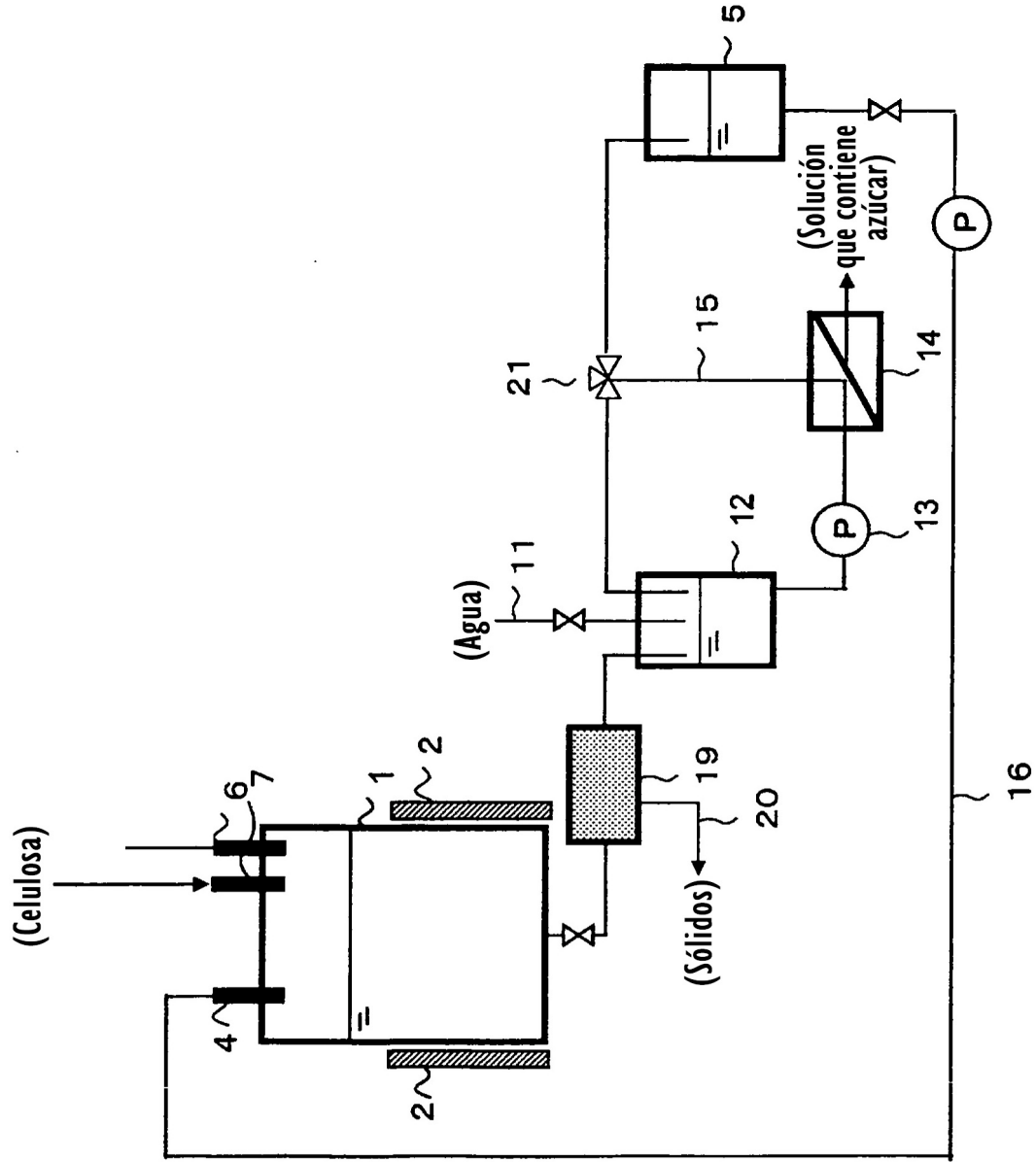


Fig.5

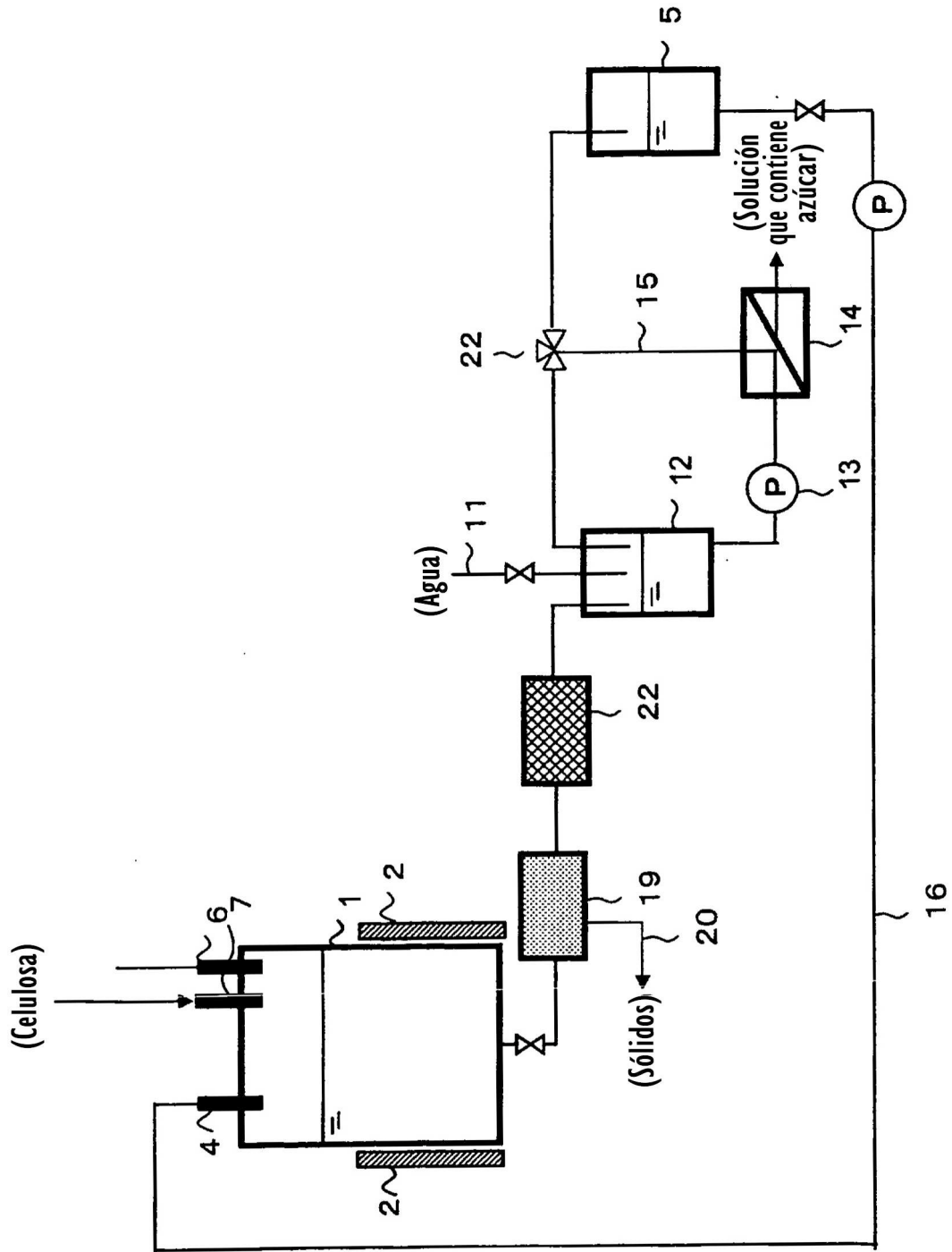


Fig.6

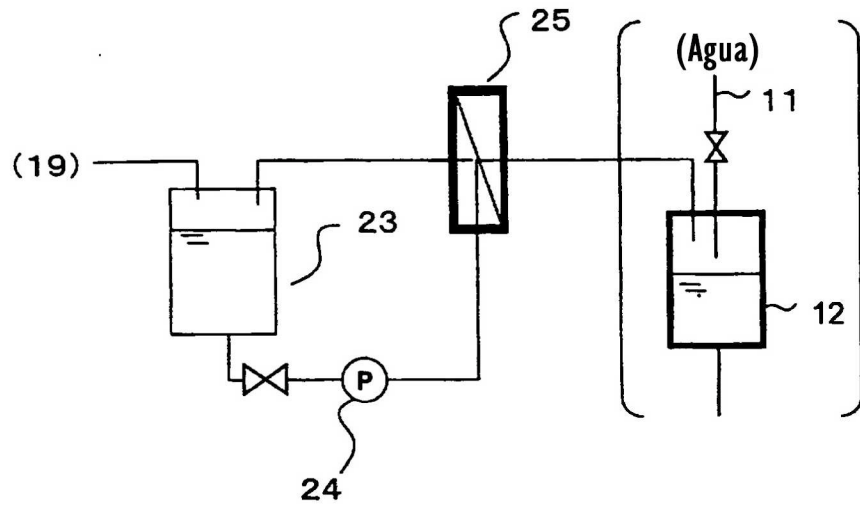


Fig.7

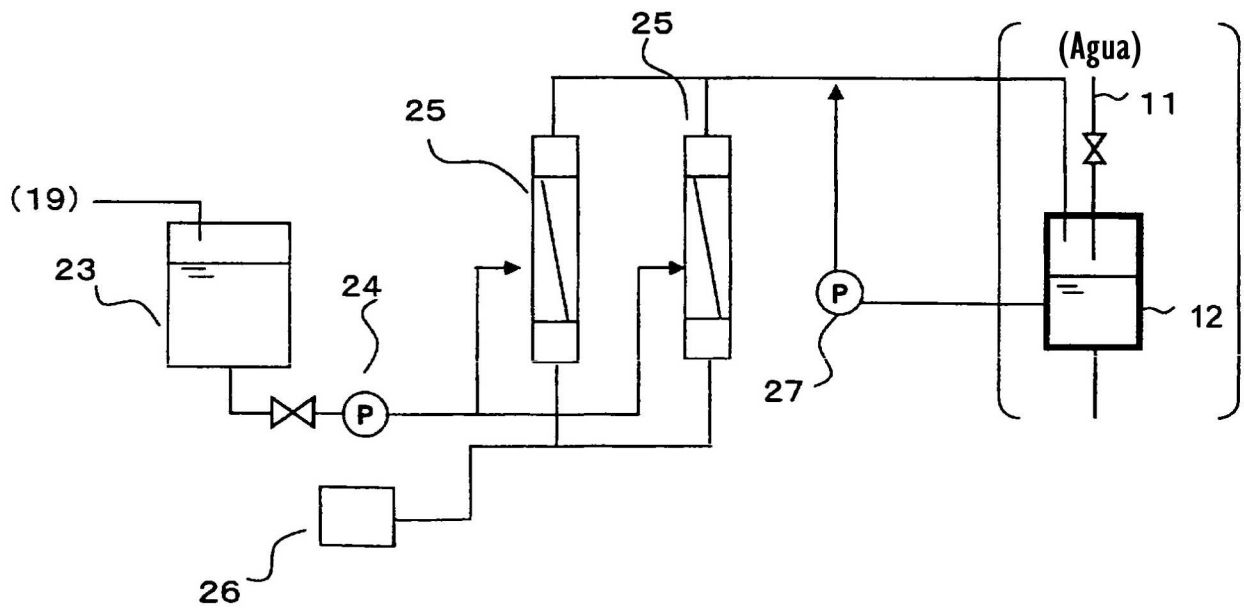


Fig.8

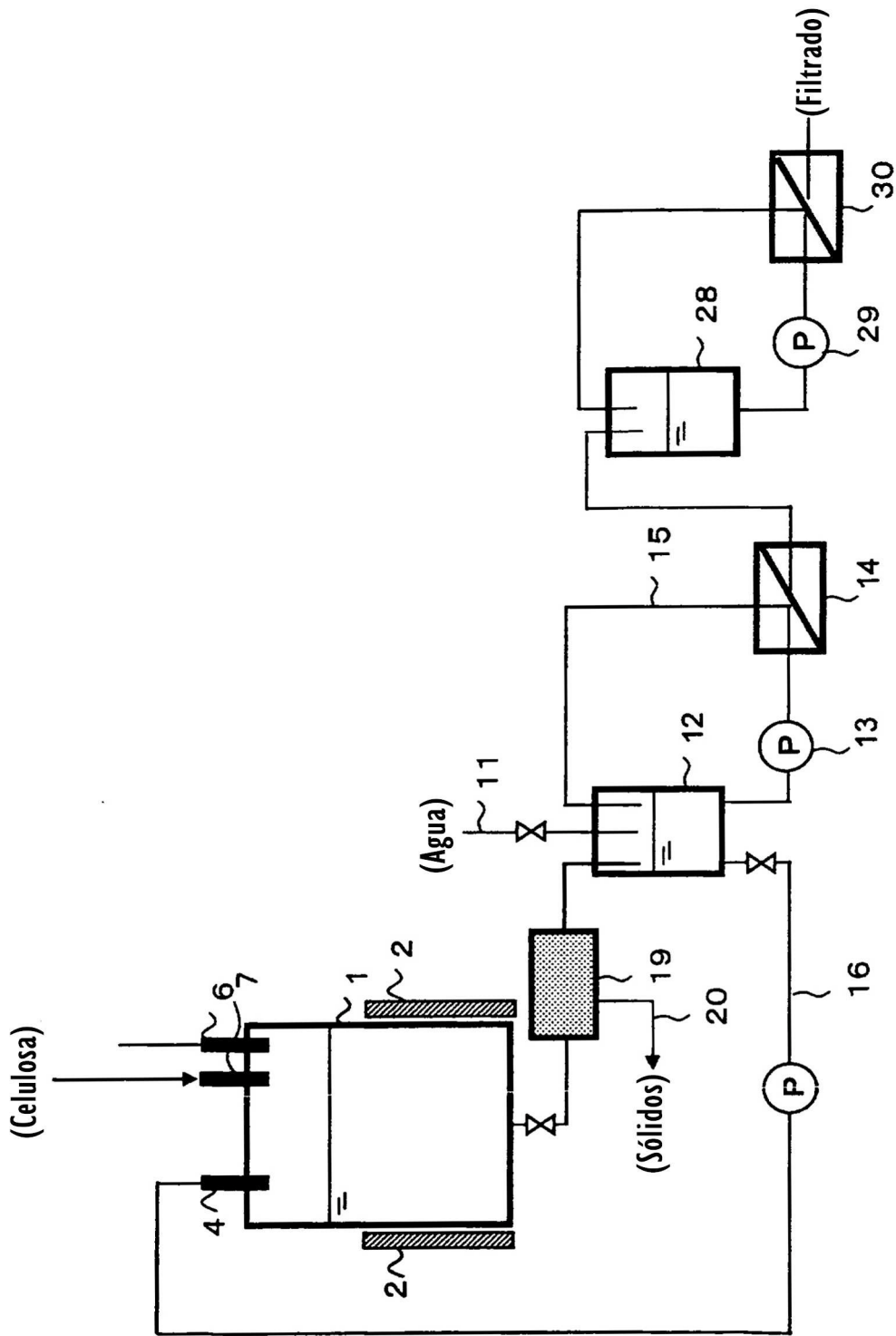


Fig.9

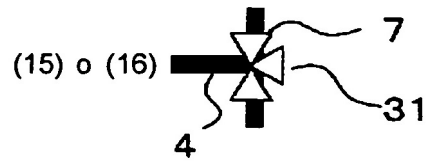


Fig.10

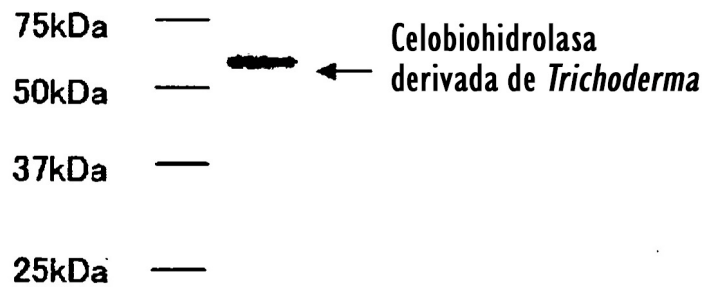


Fig.11