

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 124**

51 Int. Cl.:

<b>C13K 1/02</b>	(2006.01)	<b>C12N 1/22</b>	(2006.01)
<b>C13K 1/04</b>	(2006.01)	<b>C12N 1/38</b>	(2006.01)
<b>B01D 61/02</b>	(2006.01)		
<b>C13B 20/16</b>	(2011.01)		
<b>C12P 19/02</b>	(2006.01)		
<b>C12P 19/14</b>	(2006.01)		
<b>C12P 13/00</b>	(2006.01)		
<b>C12P 7/10</b>	(2006.01)		
<b>C12P 7/46</b>	(2006.01)		
<b>C12P 7/56</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2009 E 14003242 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 2840150**

54 Título: **Procedimiento para producir líquido que contiene azúcar**

30 Prioridad:

**09.12.2008 JP 2008313167**  
**04.09.2009 JP 2009204973**

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

**02.06.2020**

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;**  
**ITO, MASATERU;**  
**SAWAI, HIDEKI;**  
**YAMADA, KATSUSHIGE;**  
**HANAKAWA, MASAYUKI y**  
**MINEGISHI, SHIN-ICHI**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

ES 2 764 124 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir líquido que contiene azúcar

## 5 SECTOR TÉCNICO

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

## 10 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El proceso de producción por fermentación de productos químicos utilizando azúcares como materias primas ha sido utilizado para producir diversos materiales industriales. Actualmente, como azúcares a utilizar como materias primas para fermentación, se utilizan a nivel industrial derivados de materiales alimentarios tales como caña de azúcar, almidón y remolacha azucarera. Sin embargo, teniendo en cuenta el hecho de que se espera un aumento de los precios de los materiales alimentarios debido al futuro incremento de la población mundial, o desde un punto de vista ético del hecho de que los azúcares como materiales industriales pueden competir con azúcares para alimento, es necesario conseguir en el futuro un proceso para producir de manera eficiente un líquido que contiene azúcar a partir de un recurso no alimentario renovable, es decir, biomasa que contiene celulosa, o un proceso para convertir de manera eficiente un líquido que contiene azúcar obtenido como materia prima para fermentación en un material industrial.

Los ejemplos de procedimientos dados a conocer para producir un líquido que contiene azúcar a partir de una biomasa que contiene celulosa incluyen procedimientos para producir líquidos que contienen azúcar utilizando ácido sulfúrico, tales como procedimientos para producir líquidos que contienen azúcar por hidrólisis ácida de celulosa y hemicelulosa utilizando ácido sulfúrico concentrado (documentos de patente 1 y 2) y un procedimiento en el que una biomasa que contiene celulosa se somete a tratamiento de hidrólisis utilizando ácido sulfúrico diluido y a continuación es tratada enzimáticamente con celulasa y similares para producir un líquido que contiene azúcar (documento no de patente 1).

Además, los ejemplos de procedimientos dados a conocer en los que no se utilizan ácidos incluyen un procedimiento en el que una biomasa que contiene celulosa se hidroliza utilizando agua subcrítica a aproximadamente de 250 a 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 con 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 presurizada a 240°C - 280°C y a continuación se trata enzimáticamente para producir un líquido que contiene azúcar (documento de patente 5).

Sin embargo, durante la hidrólisis de una biomasa que contiene celulosa, al mismo tiempo con descomposición del componente de celulosa o hemicelulosa o similar, tiene lugar la reacción de descomposición de los azúcares producidos tales como glucosa y xilosa, y se producen subproductos tales como compuestos de furano que incluyen furfural e hidroximetilfurfural; y ácidos orgánicos que incluyen ácido fórmico, ácido acético y ácido levulínico, que han sido problemáticos. Además, dado que una biomasa que contiene celulosa contiene componentes de lignina, que son polímeros aromáticos, los componentes de lignina se descomponen durante la etapa de tratamiento con ácido produciendo compuestos aromáticos de bajo peso molecular, tales como fenoles como subproductos, al mismo tiempo. Estos compuestos tienen acciones inhibitorias durante la etapa de fermentación utilizando un microorganismo y causan la inhibición del crecimiento del microorganismo, lo que conduce a disminución del rendimiento del producto de fermentación. Por lo tanto, estos compuestos se denominan sustancias que inhiben la fermentación y han sido gravemente problemáticas cuando se utilizó un líquido que contiene azúcar de biomasa que contiene celulosa como materia prima de fermentación.

Los ejemplos del procedimiento, que se ha dado a conocer, para eliminar dichas sustancias que inhiben la fermentación durante el proceso de producción de líquido que contiene azúcar incluyen el procedimiento llamado "overliming" (sobreenalado) (documento no de patente 2). En este procedimiento, durante una etapa de neutralización de una celulosa tratada con ácido o líquido sacarificado mediante adición de cal, el líquido se mantiene mientras es calentado a aproximadamente 60°C durante cierto periodo, para eliminar sustancias que inhiben la fermentación tales como furfural y HMF junto con el componente de yeso. Sin embargo, el "overliming" solamente tiene un efecto pequeño de eliminar ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético y ácido levulínico, lo que ha sido problemático.

Además, se ha dado a conocer otro procedimiento para eliminar sustancias que inhiben la fermentación, un procedimiento en el que vapor de agua es soplado al interior de un líquido que contiene azúcar preparado a partir de una biomasa que contiene celulosa para eliminar sustancias que inhiben la fermentación por evaporación (documento de patente 6). Sin embargo, dado que dicho procedimiento por eliminación evaporativa depende de los puntos de ebullición de las sustancias que inhiben la fermentación, las eficiencias de eliminación de sustancias que

inhiben la fermentación tales como ácidos orgánicos que tienen bajos puntos de ebullición son especialmente bajas, de modo que se requiere una gran cantidad de energía para obtener suficiente eficiencia de eliminación, lo que ha sido problemático.

5 También se conoce un procedimiento en el que sustancias que inhiben la fermentación se eliminan por intercambio iónico (documento de patente 7), pero esto ha sido problemático teniendo en cuenta el coste. Además, se conoce un procedimiento en el que se lleva a cabo eliminación adsorptiva utilizando un carburo a base de madera, es decir, carbón activado o similar, pero los compuestos a eliminar están limitados a compuestos hidrófobos, lo que ha sido problemático (documento de patente 8).

10 El documento no de patente 3 da a conocer la separación de azúcares, ácido acético y otros productos químicos en hidrolizados de biomasa acuosos mediante membranas de nanofiltración y de ósmosis inversa para separar azúcares tales como hexosas y pentosas de sustancias que inhiben de la fermentación, tales como ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural. El documento de patente 9, un documento según el art. 54(3) EPC, da a conocer un tratamiento para eliminar un inhibidor de fermentación con la utilización de una membrana de nanofiltración en una etapa previa a la etapa de sacarificación y/o en una etapa previa a la etapa de fermentación de una biomasa a base de polisacárido.

#### 20 DOCUMENTOS DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Documentos de patente

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

25 [Documento de patente 2] JP 2005-229821 A

[Documento de patente 3] JP 2003-212888 A

[Documento de patente 4] JP 2001-95597 A

30 [Documento de patente 5] JP 3041380 B

[Documento de patente 6] JP 2004-187650 A

35 [Documento de patente 7] Solicitud de patente PCT japonesa traducida abierta a inspección pública No. 2001-511418

[Documento de patente 8] JP 2005-270056 A

40 [Documento de patente 9] WO 2009/110374

Documentos no de patente

45 [Documento no de patente 1] A. Aden et al., "Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover" NREL Technical Report (2002)

[Documento no de patente 2] M. Alfred et al., "Effect of pH, time and temperature of overliming on detoxification of dilute-acid hydrolyzates for fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*" Process Biochemistry, 38, 515-522 (2002)

50 [Documento no de patente 3] S. Liu et al., J. Biobased Materials and Bioenergy, 2, 121-134 (2008)

#### CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

##### 55 PROBLEMAS A RESOLVER POR LA INVENCIÓN

En la presente invención, se dan a conocer procedimientos para resolver los problemas mencionados anteriormente, es decir, un procedimiento en el que sustancias que inhiben la fermentación, producidas en la etapa de producir un azúcar a partir de una biomasa que contiene celulosa, se eliminan durante la etapa de producir un líquido que contiene azúcar, y un procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar purificado que contiene solamente una muy pequeña cantidad de sustancias que inhiben la fermentación.

#### MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS

65 Los inventores de la presente invención estudiaron profundamente para resolver los problemas anteriores y descubrieron que, permitiendo que un líquido que contiene azúcar pase a través de una membrana de ósmosis

5 inversa y, opcionalmente, una membrana de nanofiltración durante una etapa de producir un azúcar a partir de una biomasa que contiene celulosa, el azúcar a utilizar como una materia prima de fermentación y sustancias que inhiben la fermentación pueden separarse, las sustancias que inhiben la fermentación pueden eliminarse de un líquido que contiene azúcar. Es decir, la presente invención está constituida por el objeto de las reivindicaciones 1 a 8.

#### EFEECTO DE LA INVENCION

10 Mediante la presente invención, los compuestos de furano tales como furfural y HMF; ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido fórmico y ácido levulínico; y compuestos fenólicos tales como vainilina; que son sustancias que inhiben la fermentación, pueden eliminarse exhaustivamente de una solución acuosa de azúcar derivada de una biomasa que contiene celulosa y, por otro lado, azúcares tales como glucosa y xilosa pueden producirse a alta pureza y a alto rendimiento. Como resultado, utilizando el líquido que contiene azúcar purificado obtenido mediante la presente invención como materia prima de fermentación, la eficiencia de la producción por fermentación de diversos productos químicos puede mejorarse.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 La figura 1 muestra un esquema de un dispositivo de filtración que utiliza una membrana de nanofiltración/membrana de ósmosis inversa.

La figura 2 muestra una vista esquemática de la célula de acero inoxidable que se utilizó en la prueba de membrana plana.

25 La figura 3 es un gráfico que muestra comparación de las cantidades de flujo a diferentes pH durante la filtración de un líquido que contiene azúcar a través de una membrana de nanofiltración.

30 La figura 4 es un gráfico que muestra comparación de las cantidades de flujo mediante un procedimiento en el que un líquido que contiene azúcar es filtrado a través de una membrana de microfiltración o una membrana de ultrafiltración, antes de la filtración del líquido que contiene azúcar a través de una membrana de nanofiltración.

35 La figura 5 muestra fotografías de la superficie de la membrana antes y después de la filtración de un líquido tratado hidrotérmicamente a través de una membrana de microfiltración, fotografías que fueron tomadas en un microscopio electrónico de barrido.

La figura 6 muestra resultados de medición de distribución de elementos durante la observación de las microfotografías electrónicas de barrido mostradas en la figura 5, medición que se llevó a cabo con un analizador de rayos X por dispersión de energía que está fijado al microscopio electrónico de barrido.

40 La figura 7 es un diagrama que muestra un mapa físico de un vector de expresión en levadura pTRS11.

#### MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

45 La presente invención se describirá a continuación con más detalle.

50 Los ejemplos de la biomasa que contiene celulosa utilizada en el procedimiento de producción del líquido que contiene azúcar de la presente invención incluyen biomásas herbáceas tales como bagazo, pasto varilla, forraje de maíz, paja de arroz y paja de trigo; y biomásas madereras tales como árboles y materiales de construcción de desecho. Estas biomásas que contienen celulosa contienen celulosa o hemicelulosa, que son polisacáridos producidos por condensación por deshidratación de azúcares. Hidrolizando dichos polisacáridos, pueden producirse líquidos que contienen azúcar que pueden utilizarse como materias primas de fermentación.

55 El líquido que contiene azúcar de la presente invención significa una solución acuosa de azúcar obtenida mediante hidrólisis de una biomasa que contiene celulosa. Los azúcares generalmente se clasifican, en base al grado de polimerización de monosacáridos, en monosacáridos tales como glucosa y xilosa, oligosacáridos producidos mediante condensación por deshidratación de 2 a 9 monosacáridos, y polisacáridos producidos mediante condensación por deshidratación de no menos de 10 monosacáridos. El líquido que contiene azúcar en la presente invención significa un líquido que contiene azúcar que comprende un monosacárido o monosacáridos como componente o componentes principales y, más particularmente, que contiene glucosa o xilosa como componente principal. Además, el líquido que contiene azúcar también contiene oligosacáridos tales como celobiosa; y monosacáridos tales como arabinosa y manosa, aunque sus cantidades son pequeñas. En este caso, la expresión "que contiene un monosacárido como componente principal" significa que un monosacárido o monosacáridos constituye o constituyen no menos del 80% en peso del peso total de azúcares tales como monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos disueltos en agua. Los ejemplos particulares del procedimiento para analizar monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos disueltos en agua incluyen cuantificación por HPLC en base a la comparación con una muestra estándar. Las condiciones de HPLC concretas son: sin utilización de un líquido de

reacción; utilización de Luna NH<sub>2</sub> (fabricado por Phenomenex, Inc.) como columna; fase móvil, agua ultrapura:acetonitrilo = 25:75; caudal, 0,6 ml/min.; tiempo de medición, 45 min.; procedimiento de detección, RI (índice de refracción diferencial); temperatura, 30°C.

5 La etapa (1), que es una etapa de hidrolización de una biomasa que contiene celulosa, en el procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar de la presente invención se describirá a continuación.

10 Cuando una biomasa que contiene celulosa se somete a hidrólisis, la biomasa que contiene celulosa puede utilizarse como está, o puede someterse a un tratamiento conocido tal como vaporización, pulverización o granallado. Mediante dicho tratamiento, la eficiencia de la hidrólisis puede mejorarse.

15 La etapa de hidrólisis de la biomasa que contiene celulosa no está limitada, y ejemplos particulares de la misma incluyen principalmente 6 procedimientos, es decir, el procedimiento A: un procedimiento que utiliza solamente un ácido; el procedimiento B: un procedimiento en el que se lleva a cabo tratamiento con ácido, seguido por el uso de una enzima; el procedimiento C: un procedimiento que utiliza solamente tratamiento hidrotérmico; el procedimiento D: un procedimiento en el que se lleva a cabo tratamiento hidrotérmico, seguido por el uso de una enzima; el procedimiento E: un procedimiento en el que se lleva a cabo tratamiento alcalino, seguido por el uso de una enzima; y el procedimiento F: un procedimiento en el que se lleva a cabo tratamiento con amoníaco, seguido por el uso de una enzima.

20 En el procedimiento A, se utiliza un ácido para la hidrólisis de una biomasa que contiene celulosa. Los ejemplos del ácido a utilizar incluyen ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido clorhídrico, y se utiliza preferentemente ácido sulfúrico.

25 La concentración del ácido no está limitada, y puede utilizarse un ácido a una concentración del 0,1 al 99% en peso. En los casos en los que la concentración del ácido es del 0,1 al 15% en peso, preferentemente del 0,5 al 5% en peso, la temperatura de reacción se ajusta dentro del intervalo de 100 a 300°C, preferentemente de 120 a 250°C, y el tiempo de reacción se ajusta dentro del intervalo de 1 segundo a 60 minutos. El número de veces del tratamiento no está limitado, y pueden llevarse a cabo 1 o más veces del tratamiento descrito anteriormente. En particular, en los casos en los que el tratamiento descrito anteriormente se lleva a cabo 2 o más veces, las condiciones para el primer tratamiento pueden ser diferentes de aquellas para el segundo y posteriores tratamientos.

35 Además, en los casos en los que la concentración del ácido es del 15 al 95% en peso, preferentemente del 60 al 90% en peso, la temperatura de reacción se ajusta dentro del intervalo de 10 a 100°C, y el tiempo de reacción se ajusta dentro del intervalo de 1 segundo a 60 minutos.

40 El número de veces del tratamiento con ácido no está limitado, y se puede llevar a cabo 1 o más veces el tratamiento descrito anteriormente. En particular, en los casos en los que el tratamiento descrito anteriormente se lleva a cabo 2 o más veces, las condiciones para el primer tratamiento pueden ser diferentes de aquellas para el segundo y posteriores tratamientos.

45 Dado que el hidrolizado obtenido mediante el tratamiento con ácido contiene ácidos tales como ácido sulfúrico, es necesario neutralizarlo para utilizarlo como materia prima de fermentación. La neutralización puede llevarse a cabo para la solución acuosa de ácido preparada mediante eliminación del contenido sólido del hidrolizado o en el estado en el que está contenido el sólido. El reactivo alcalino a utilizar para la neutralización no está limitado y, preferentemente, es un reactivo alcalino monovalente. En los casos en los que los componentes tanto ácidos como alcalinos son sales que tienen valencias de 2 o más durante la etapa (2), estos no pasan a través de la membrana de nanofiltración, y las sales precipitan en el líquido durante el proceso de concentración del líquido, lo que puede causar ensuciamiento de la membrana.

50 En los casos en los que se utiliza un álcali monovalente, los ejemplos del álcali incluyen, aunque sin limitación, amoníaco, hidróxido sódico e hidróxido potásico.

55 En los casos en los que se utiliza un reactivo alcalino que tiene una valencia de 2 o más, es necesario reducir las cantidades del ácido y del álcali, o emplear un mecanismo para la eliminación de precipitados durante la etapa (2), para evitar la precipitación de sales durante la etapa (2). En los casos en los que se utiliza un álcali que tiene una valencia de 2 o más, el álcali es preferentemente hidróxido cálcico teniendo en cuenta el coste. Dado que, en los casos en los que se utiliza hidróxido cálcico, el componente de yeso se produce mediante neutralización, es necesario eliminar el yeso mediante separación sólido-líquido. Los ejemplos del procedimiento de separación sólido-líquido incluyen, aunque sin limitación, centrifugado y separación por membrana, y el yeso también puede eliminarse llevando a cabo varios tipos de etapas de separación.

60 En general, en la hidrólisis utilizando un ácido, la hidrólisis se produce en primer lugar en el componente de hemicelulosa que tiene una baja cristalinidad, que viene seguida por degradación del componente de celulosa que tiene una elevada cristalinidad. Por lo tanto, es posible, utilizando un ácido, obtener un líquido que contiene una gran cantidad de xilosa derivada de hemicelulosa. Además, en el tratamiento con ácido, sometiendo al contenido sólido de la biomasa después del tratamiento a una reacción a una mayor presión a una temperatura más elevada que en

el tratamiento anterior, el componente de celulosa que tiene una mayor cristalinidad puede descomponerse para obtener un líquido que contiene una gran cantidad de glucosa derivada de celulosa. Ajustando la etapa de dos fases de hidrólisis, pueden ajustarse las condiciones para la hidrólisis que son adecuadas para hemicelulosa y celulosa, y la eficiencia de descomposición y el rendimiento de azúcar pueden mejorarse. Además, manteniendo el líquido que contiene azúcar obtenido en las primeras condiciones de descomposición y el líquido que contiene azúcar obtenido en las segundas condiciones de descomposición separados entre sí, pueden producirse dos tipos de líquidos que contienen azúcar que tienen diferentes proporciones de monosacáridos contenidos en los hidrolizados. Es decir, también es posible separar el líquido que contiene azúcar obtenido en las primeras condiciones de descomposición como un líquido que contiene azúcar que contiene xilosa como componente principal, y el líquido que contiene azúcar obtenido en las segundas condiciones de descomposición como un líquido que contiene azúcar que contiene glucosa como componente principal. Separando los componentes monosacáridos contenidos en el líquido que contiene azúcar, tal como se ha descrito anteriormente, la fermentación puede llevarse a cabo por separado como fermentación utilizando xilosa en el líquido que contiene azúcar como materia prima de fermentación y como fermentación utilizando glucosa en el líquido que contiene azúcar como materia prima de fermentación, en el que pueden seleccionarse y emplearse especies de microorganismo que son las más adecuadas para los tipos respectivos de fermentación. Debe observarse que los azúcares derivados de ambos componentes también pueden obtenerse inmediatamente sin separar el componente de hemicelulosa/componente de celulosa, llevando a cabo el tratamiento a alta presión y alta temperatura con un ácido durante un periodo de tiempo controlado.

En el procedimiento B, el líquido tratado obtenido en el procedimiento A se somete, además, a hidrólisis enzimática de la biomasa que contiene celulosa. La concentración del ácido a utilizar en el procedimiento B 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, preferentemente de 120 a 250°C. El tiempo de reacción puede ajustarse dentro del intervalo de 1 segundo a 60 minutos. El número de veces del tratamiento no está limitado, y pueden llevarse a cabo 1 o más veces del tratamiento descrito anteriormente. En particular, en los casos en los que el tratamiento descrito anteriormente se lleva a cabo 2 o más veces, las condiciones para el primer tratamiento pueden ser diferentes de aquellas para el segundo y posteriores tratamientos.

Dado que el hidrolizado obtenido mediante el tratamiento con ácido contiene ácidos tales como ácido sulfúrico, es necesario neutralizarlo para someterlo, posteriormente, a una reacción de hidrólisis con una enzima o para utilizarlo como materia prima de fermentación. La neutralización puede llevarse a cabo de la misma manera que la neutralización en el procedimiento A.

La enzima no está limitada siempre que sea una enzima que tiene actividad de descomposición de celulosa, y pueden utilizarse celulasas utilizadas habitualmente. La enzima es, preferentemente, una celulasa que comprende una celulasa de tipo exocelulasa o celulasa de tipo endocelulasa que tiene actividad para descomponer celulosa cristalina. Como dicha celulasa, es preferente una celulasa producida por un microorganismo que pertenece al género *Trichoderma*. El género *Trichoderma* es un microorganismo clasificado en hongos filamentosos, y secreta una gran cantidad de diversas celulasas de forma extracelular. La celulasa a utilizar en la presente invención es, preferentemente, una celulasa derivada de *Trichoderma reesei*. Además, como enzima a utilizar para la hidrólisis,  $\beta$ -glucosidasa, que es una enzima que descompone celobiosa, puede añadirse para mejorar la eficiencia de producción de glucosa,  $\beta$ -glucosidasa que también puede utilizarse junto con la celulasa mencionada anteriormente para la hidrólisis. La  $\beta$ -glucosidasa no está limitada, sino que preferentemente se deriva del género *Aspergillus*. La reacción de hidrólisis utilizando dichas enzimas se lleva a cabo, preferentemente, a un pH de aproximadamente 3 a 7, más preferentemente a un pH de aproximadamente 5. La temperatura de reacción es, preferentemente, de 40 a 70°C. Además, es preferente llevar a cabo separación sólido-líquido una vez que se ha completado la hidrólisis enzimática, para eliminar el contenido sólido que no se ha descompuesto. Los ejemplos del procedimiento de eliminación del contenido sólido incluyen centrifugado y separación por membrana, pero el procedimiento no está limitado a esto. Además, dichos procedimientos de separación sólido-líquido pueden utilizarse como una combinación de una pluralidad de los procedimientos.

En los casos en los que el tratamiento con ácido viene seguido por hidrólisis enzimática de la biomasa que contiene celulosa, es preferible llevar a cabo hidrólisis de hemicelulosa que tiene una baja cristalinidad mediante el tratamiento con ácido en la primera hidrólisis, seguida de la realización de hidrólisis de celulosa que tiene una elevada cristalinidad utilizando una enzima en la segunda hidrólisis. Utilizando la enzima en la segunda hidrólisis, puede dejarse proseguir a la etapa de hidrólisis de la biomasa que contiene celulosa de forma más eficiente. Más particularmente, en la primera hidrólisis mediante un ácido, se producen principalmente la hidrólisis del componente de hemicelulosa contenido en la biomasa que contiene celulosa y la descomposición parcial de lignina, y el hidrolizado resultante se separa en una solución de ácido y el contenido sólido que contiene celulosa. El contenido sólido que contiene celulosa es hidrolizado a continuación mediante adición de la enzima. Dado que la solución separada/recuperada en ácido sulfúrico diluido contiene, como componente principal, xilosa, que es una pentosa, una solución acuosa de azúcar puede aislarse mediante neutralización de la solución de ácido. Además, a partir del producto de reacción de hidrólisis del contenido sólido que contiene celulosa, pueden obtenerse componentes monosacáridos que contienen glucosa como componente principal. La solución acuosa de azúcar obtenida mediante la neutralización puede mezclarse con el contenido sólido, seguido de la añadidura de la enzima a la mezcla resultante para llevar a cabo hidrólisis.

5 En el procedimiento C, el ácido no se añade particularmente, y se añade agua de modo que la concentración de la biomasa que contiene celulosa pasa a ser de 0,1 al 50% en peso, seguido por tratamiento a una temperatura de 100 a 400°C durante un tiempo de 1 segundo a 60 minutos. Llevando a cabo el tratamiento en dichas condiciones de temperatura, se produce la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa. El número de veces del tratamiento no está limitado, y el tratamiento puede llevarse a cabo 1 o más veces. En particular, en los casos en los que el tratamiento descrito anteriormente se lleva a cabo 2 o más veces, las condiciones para el primer tratamiento pueden ser diferentes de las del segundo y posteriores tratamientos.

10 En general, en hidrólisis que emplea tratamiento hidrotérmico, la hidrólisis se produce en primer lugar en el componente de hemicelulosa que tiene una baja cristalinidad, que viene seguida por degradación del componente de celulosa que tiene una elevada cristalinidad. Por lo tanto, es posible, utilizando tratamiento hidrotérmico, obtener un líquido que contiene una gran cantidad de xilosa derivada de hemicelulosa. Además, en el tratamiento hidrotérmico, sometiendo al contenido sólido de biomasa después del tratamiento a una reacción a una mayor presión a una temperatura más elevada que en el tratamiento anterior, el componente de celulosa que tiene mayor cristalinidad puede descomponerse para obtener un líquido que contiene una gran cantidad de glucosa derivada de celulosa. Ajustando la etapa de dos fases de hidrólisis, pueden ajustarse condiciones para la hidrólisis que son adecuadas para hemicelulosa y celulosa, y la eficiencia de descomposición y el rendimiento de azúcar pueden mejorarse. Además, manteniendo al líquido que contiene azúcar obtenido en las primeras condiciones de descomposición y el líquido que contiene azúcar obtenido en las segundas condiciones de descomposición separados entre sí, pueden producirse dos tipos de líquidos que contienen azúcar que tienen diferentes proporciones de monosacáridos contenidos en los hidrolizados. Es decir, también es posible separar el líquido que contiene azúcar obtenido en las primeras condiciones de descomposición como un líquido que contiene azúcar que contiene xilosa como componente principal, y el líquido que contiene azúcar obtenido en las segundas condiciones de descomposición como un líquido que contiene azúcar que contiene glucosa como componente principal. Separando los componentes monosacáridos contenidos en el líquido que contiene azúcar, tal como se ha descrito anteriormente, la fermentación puede llevarse a cabo por separado como fermentación utilizando xilosa en el líquido que contiene azúcar como materia prima de fermentación, y como fermentación utilizando glucosa en el líquido que contiene azúcar como materia prima de fermentación, en la que pueden seleccionarse y utilizarse especies de microorganismos que son los más adecuados para los tipos respectivos de fermentación.

En el procedimiento D, el líquido tratado obtenido en el procedimiento C se somete, además, a hidrólisis enzimática de la biomasa que contiene celulosa.

35 La enzima utilizada puede ser la misma que la utilizada en el procedimiento B. Las condiciones para el tratamiento enzimático también pueden ser las mismas que las utilizadas en el procedimiento B.

40 En los casos en los que el tratamiento hidrotérmico viene seguido por hidrólisis de la biomasa que contiene celulosa utilizando una enzima, es preferente llevar a cabo hidrólisis de hemicelulosa que tiene una baja cristalinidad mediante el tratamiento hidrotérmico en la primera hidrólisis, seguido por hidrólisis de celulosa que tiene una elevada cristalinidad utilizando la enzima en la segunda hidrólisis. Utilizando la enzima en la segunda hidrólisis, puede dejarse proseguir a la etapa de hidrólisis de la biomasa que contiene celulosa de forma más eficiente. Más particularmente, en la primera hidrólisis mediante el tratamiento hidrotérmico, se producen principalmente la hidrólisis del componente de hemicelulosa contenido en la biomasa que contiene celulosa y la descomposición parcial de la lignina, y el hidrolizado resultante se separa en una solución acuosa y el contenido sólido que contiene celulosa. El contenido sólido que contiene celulosa se hidroliza a continuación mediante adición de una enzima. La solución acuosa separada/recuperada contiene, como componente principal, xilosa, que es una pentosa. Además, a partir del producto de reacción de hidrólisis del contenido sólido que contiene celulosa, pueden obtenerse componentes monosacáridos que contienen glucosa como componente principal. La solución acuosa obtenida mediante el tratamiento hidrotérmico puede mezclarse con el contenido sólido, seguido de la adición de una enzima a mezcla resultante para llevar a cabo la hidrólisis.

55 En el procedimiento E, el álcali a utilizar es, más preferentemente, hidróxido sódico o hidróxido cálcico. Los álcalis se añaden a la biomasa que contiene celulosa de modo que sus concentraciones están dentro del intervalo del 0,1 al 60% en peso, y el tratamiento puede llevarse a cabo a una temperatura dentro del intervalo de 100°C a 200°C, preferentemente de 110°C a 180°C. El número de veces del tratamiento no está limitado, y pueden llevarse a cabo 1 o más veces del tratamiento descrito anteriormente. En particular, en los casos en los que el tratamiento descrito anteriormente se lleva a cabo 2 o más veces, las condiciones para el primer tratamiento pueden ser diferentes de las del segundo y posteriores tratamientos.

60 Dado que el producto tratado obtenido mediante el tratamiento alcalino contiene álcalis, tales como hidróxido sódico, es necesario neutralizarlo para someterlo, además, a la reacción de hidrólisis utilizando una enzima. La neutralización puede llevarse a cabo para la solución acuosa alcalina preparada mediante la eliminación del contenido sólido del hidrolizado mediante separación sólido-líquido, o en el estado en el que el contenido sólido está contenido. El reactivo ácido a utilizar para la neutralización no está limitado y es, preferentemente, un reactivo ácido monovalente. En los casos en los que los componentes tanto ácido como alcalino son sales que tienen valencias de

2 o más durante la etapa (2), éstas no pasan a través de la membrana de nanofiltración, y las sales precipitan en el líquido durante el proceso de concentración del líquido, lo que puede causar ensuciamiento de la membrana.

5 En los casos en los que se utiliza un ácido monovalente, los ejemplos del ácido incluyen, aunque sin limitación, ácido nítrico y ácido clorhídrico.

10 En los casos en los que se utiliza un reactivo ácido que tiene una valencia de 2 o más, es necesario reducir las cantidades del ácido y el álcali, o emplear un mecanismo para la eliminación de precipitados durante la etapa (2), para evitar la precipitación de sales durante la etapa (2). En los casos en los que se utiliza un ácido que tiene una valencia de 2 o más, el ácido es, preferentemente, ácido sulfúrico o ácido fosfórico. Dado que, en los casos en los que se utiliza hidróxido cálcico, el componente de yeso se produce mediante neutralización, es necesario eliminar el yeso mediante separación sólido-líquido. Los ejemplos del procedimiento de separación sólido-líquido incluyen, aunque sin limitación, centrifugado y separación por membrana, y el yeso también puede eliminarse llevando a cabo varios tipos de etapas de separación.

15 La enzima a utilizar puede ser la misma que la utilizada en el procedimiento B. Las condiciones para el tratamiento enzimático también pueden ser las mismas que aquellas en el procedimiento B.

20 En los casos en los que, después del tratamiento alcalino, la biomasa que contiene celulosa se hidroliza utilizando una enzima, el componente de lignina alrededor de los componentes de hemicelulosa y celulosa se elimina mezclando la biomasa que contiene celulosa con una solución acuosa que contiene un álcali y calentando la mezcla resultante, haciendo de este modo a los componentes de hemicelulosa y celulosa reactivos, seguido de la realización de la hidrólisis enzimática de hemicelulosa que tiene una baja cristalinidad y celulosa que tiene una elevada cristalinidad que no han sido descompuestas por el proceso hidrotérmico durante el tratamiento alcalino. Más particularmente, en el tratamiento alcalino, se producen principalmente la hidrólisis de una parte del componente de hemicelulosa contenida en la biomasa que contiene celulosa y la descomposición parcial de lignina, y el hidrolizado resultante se separa en una solución alcalina y el contenido sólido que contiene celulosa. El contenido sólido que contiene celulosa se hidroliza a continuación preparando el pH y añadiéndole una enzima. En los casos en los que la concentración en la solución alcalina es baja, la hidrólisis puede llevarse a cabo simplemente añadiendo la enzima después de la neutralización, sin separación del contenido sólido. A partir del producto de reacción de hidrólisis del contenido sólido que contiene celulosa, pueden obtenerse componentes monosacáridicos que contienen glucosa y xilosa como componentes principales. Dado que la solución alcalina separada/recuperada contiene, como componente principal, xilosa, que es una pentosa, además de lignina, una solución acuosa de azúcar puede aislarse mediante neutralización de la solución alcalina. La solución acuosa de azúcar obtenida mediante la neutralización puede mezclarse con el contenido sólido, seguido de la adición de una enzima a la mezcla resultante para llevar a cabo la hidrólisis.

35 Las condiciones para el tratamiento con amoníaco en el procedimiento F se basan en las Patentes JP 2008-161125 A y JP 2008-535664 A. Por ejemplo, la concentración de amoníaco que se añadirá a la biomasa que contiene celulosa está dentro del intervalo del 0,1 al 15% en peso con respecto a la biomasa que contiene celulosa, y el tratamiento se lleva a cabo entre 4 y 200°C, preferentemente entre 90 y 150°C. El amoníaco que se añadirá puede estar en estado de líquido o gas. Además, la forma del amoníaco que se añadirá puede ser amoníaco puro o amoníaco acuoso. El número de veces del tratamiento no está limitado, y pueden llevarse a cabo 1 o más veces del tratamiento. 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 aquellas para el segundo y posteriores tratamientos.

40 Es necesario someter al producto tratado obtenido mediante el tratamiento con amoníaco para la neutralización del amoníaco o eliminación del amoníaco para llevar a cabo, además, la reacción de hidrólisis utilizando una enzima. La neutralización puede llevarse a cabo para amoníaco preparado mediante la eliminación del contenido sólido del hidrolizado mediante separación sólido-líquido, o en el estado en el que el contenido sólido está contenido. El reactivo ácido a utilizar para la neutralización no está limitado. Los ejemplos del reactivo ácido incluyen ácido clorhídrico, ácido nítrico y ácido sulfúrico, y el reactivo ácido es, preferentemente, ácido sulfúrico para evitar corrosión de las tuberías del proceso y evitar la inhibición de la fermentación. El amoníaco puede eliminarse manteniendo el producto tratado con amoníaco a presión reducida, para evaporar el amoníaco a un gas. El amoníaco eliminado puede recuperarse y reutilizarse.

55 Es conocido que, en la hidrólisis utilizando una enzima después del tratamiento con amoníaco, la estructura cristalina de la celulosa cambia mediante el tratamiento con amoníaco y la estructura cristalina resultante permite que la reacción enzimática se produzca fácilmente. Por lo tanto, permitiendo a la enzima que actúe sobre el contenido sólido después de dicho tratamiento con amoníaco, la hidrólisis puede llevarse a cabo de forma eficiente. La enzima utilizada puede ser la misma que la utilizada en el procedimiento B. Las condiciones para el tratamiento enzimático también pueden ser las mismas que aquellas en el procedimiento B.

60 En los casos en los que se utiliza amoníaco acuoso, el componente acuoso, diferente del amoníaco, puede proporcionar un efecto similar al procedimiento C (tratamiento hidrotérmico), y pueden producirse la hidrólisis de hemicelulosa y la descomposición de la lignina. En los casos en los que el tratamiento con amoníaco acuoso se lleva

a cabo seguido de la realización de la hidrólisis de una biomasa que contiene celulosa utilizando una enzima, el componente de lignina alrededor de los componentes de hemicelulosa y celulosa se elimina mezclando la biomasa que contiene celulosa con una solución acuosa que contiene amoníaco y calentando la mezcla resultante, haciendo de este modo a los componentes de hemicelulosa y celulosa reactivos, seguido de la realización de la hidrólisis enzimática de hemicelulosa que tiene una baja cristalinidad y celulosa que tiene una elevada cristalinidad que no han sido descompuestas por el proceso hidrotérmico durante el tratamiento con amoníaco. Más particularmente, en el tratamiento mediante amoníaco acuoso, principalmente se producen la hidrólisis de una parte del componente de hemicelulosa contenido en la biomasa que contiene celulosa y la descomposición parcial de la lignina, y el hidrolizado resultante se separa en amoníaco acuoso y el contenido sólido que contiene celulosa. El contenido sólido que contiene celulosa es hidrolizado a continuación preparando el pH y añadiéndole una enzima. En los casos en los que la concentración de amoníaco es de hasta aproximadamente 100%, una gran parte del amoníaco puede eliminarse mediante desgasificación, seguido por neutralización y adición de una enzima sin separación del contenido sólido, para llevar a cabo la hidrólisis. A partir del producto de reacción de hidrólisis del contenido sólido que contiene celulosa, pueden obtenerse los componentes monosacáridos que contienen glucosa y xilosa como componentes principales. Dado que el amoníaco acuoso separado/recuperado contiene, como componente principal, xilosa, que es una pentosa, además de lignina, una solución acuosa de azúcar puede aislarse neutralizando la solución alcalina. Además, la solución acuosa de azúcar obtenida mediante la neutralización puede mezclarse con el contenido sólido, seguido por la adición de una enzima a ella, para llevar a cabo la hidrólisis.

La solución acuosa de azúcar obtenida en la etapa (1) puede obtenerse mediante centrifugado o separación por membrana para eliminar el contenido sólido, tal como se ha mencionado anteriormente. En dichos casos, dependiendo de las condiciones de separación, especialmente en la membrana de separación utilizada, la eliminación del contenido sólido puede ser insuficiente, y partículas finas pueden estar contenidas en la solución. Los ejemplos de los componentes constituyentes de dichas partículas finas incluyen, aunque sin limitación, lignina, tanino, sílice, calcio y celulosa no descompuesta. Además, los tamaños de partícula de las partículas finas no están limitados. Además, componentes macromoleculares solubles en agua también pueden estar contenidos además de las partículas finas. Los ejemplos de los componentes macromoleculares solubles en agua contenidos en la solución acuosa de azúcar incluyen oligosacáridos, polisacáridos y tanino, y, en el caso de una solución acuosa de azúcar preparada utilizando una enzima, está contenida una gran cantidad de la enzima.

La existencia de partículas finas o macromoléculas solubles en agua contenidas en la solución acuosa de azúcar pueden causar ensuciamiento durante el funcionamiento continuo mencionado más adelante de una membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa, aunque el funcionamiento es posible. Por lo tanto, la frecuencia de sustitución de la membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa puede incrementarse. En dichos casos, es preferente eliminar, en el tratamiento posterior de la etapa (1), partículas finas permitiendo que la solución acuosa de azúcar pase a través de una membrana de microfiltración y/o membrana de ultrafiltración que puede eliminar con seguridad dichas partículas finas y macromoléculas solubles en agua. Los ejemplos de la filtración incluyen, aunque sin limitación, filtración a presión, filtración al vacío y filtración centrífuga. Además, la operación de filtrado se clasifica *grosso modo* en filtración a presión constante, filtración a flujo constante y filtración a presión no constante/flujo no constante, pero los ejemplos de la operación de filtrado no están limitados a estos. La operación de filtración también puede ser una filtración de etapas múltiples, en la que una membrana de microfiltración o una membrana de ultrafiltración se utiliza 2 o más veces para eliminación eficiente del contenido sólido. En este caso, el material y las propiedades de la membrana a utilizar no están limitados.

La membrana de microfiltración utilizada en la presente invención es una membrana que tiene un tamaño de poro promedio de 0,01  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$ , que se denomina de microfiltración, membrana de MF o similar para abreviar. La membrana de ultrafiltración utilizada en la presente invención es una membrana que tiene un límite de peso molecular de 1.000 a 200.000, membrana que se denomina de ultrafiltración, membrana de UF o similar para abreviar. En este caso, en la membrana de ultrafiltración, el tamaño de poro es demasiado pequeño para medir los tamaños de los poros sobre la superficie de la membrana en el microscopio electrónico o similar, de modo que un valor llamado el límite de peso molecular se utiliza como índice del tamaño del poro en lugar del tamaño de poro promedio. Tal como se ha descrito "La curva obtenida representando gráficamente los pesos moleculares de solutos a lo largo de las abscisas y las tasas de bloqueo a lo largo de las ordenadas se denomina la curva de límite de peso molecular. El peso molecular con el que la tasa de bloqueo alcanza el 90% se denomina el límite de peso molecular". En la página 92 del documento The Membrane Society de Japan ed., Membrane Experiment Series, Vol. III, Artificial Membrane, miembros del comité editorial: Shoji Kimura, Shin-ichi Nakao, Haruhiko Ohya y Tsutomu Nakagawa (1993, publicado por Kyoritsu Shuppan Co., Ltd.), el límite de peso molecular es bien conocido por los expertos en la materia como un índice que representa el rendimiento de membrana de una membrana de ultrafiltración.

El material de la membrana de microfiltración o membrana de ultrafiltración no está limitado, siempre que la eliminación de partículas finas, que es un objetivo de la presente invención tal como se ha mencionado anteriormente, pueda alcanzarse con ella, y ejemplos del mismo incluyen materiales orgánicos tales como celulosa, éster de celulosa, polisulfona, poliétersulfona, polietileno clorado, polipropileno, poliolefina, alcohol polivinílico, metacrilato de polimetilo, fluoruro de polivinilideno y politetrafluoroetileno; metales tales como acero inoxidable; y materiales inorgánicos tales como cerámicas. El material de la membrana de microfiltración o membrana de

ultrafiltración debe seleccionarse apropiadamente en base a las propiedades del hidrolizado y/o el coste de explotación, y el material es, preferentemente, un material orgánico, más preferentemente polietileno clorado, polipropileno, fluoruro de polivinilideno, polisulfona o poliétersulfona.

5 Además, filtrando la solución acuosa de azúcar obtenida en la etapa (1) especialmente a través de una membrana de ultrafiltración, la enzima que se ha utilizado para sacarificación puede recuperarse desde el lado de alimentación. El proceso de recuperación de la enzima se describirá a continuación. La enzima utilizada en la hidrólisis tiene un peso molecular dentro del intervalo de 10.000 a 100.000 y, permitiendo que el líquido que contiene azúcar obtenido en la etapa (1) de la presente invención pase a través de una membrana de ultrafiltración que tiene un límite de peso molecular con el que puede bloquearse la enzima, la enzima puede recuperarse de la fracción en el lado de alimentación. Preferentemente, utilizando una membrana de ultrafiltración que tiene un límite de peso molecular dentro del intervalo de 10.000 a 30.000, la enzima a utilizar para la hidrólisis puede recuperarse de forma eficiente. La forma de la membrana de ultrafiltración utilizada no está limitada, y puede adoptar la forma de una membrana plana o una fibra hueca. Reutilizando la celulosa recuperada en la hidrólisis en la etapa (1), la cantidad de la enzima a utilizar puede reducirse. Cuando dicha filtración de una solución acuosa de azúcar se lleva a cabo utilizando una membrana de ultrafiltración, la solución acuosa de azúcar es, preferentemente, procesada de forma preliminar permitiéndole pasar a través de una membrana de microfiltración, para eliminar partículas finas.

20 Ejemplos de la etapa de procesamiento con una membrana de microfiltración y/o membrana de ultrafiltración después de la etapa (1) incluyen el procedimiento  $\alpha$ : un procedimiento en el que el líquido es filtrado a través de una membrana de microfiltración; el procedimiento  $\beta$ : un procedimiento en el que el líquido es centrifugado y a continuación filtrado a través de una membrana de microfiltración; el procedimiento  $\gamma$ : un procedimiento en el que el líquido es centrifugado y a continuación filtrado a través de una membrana de microfiltración, seguido de filtrado a través de una membrana de ultrafiltración; el procedimiento  $\delta$ : la separación sólido-líquido se lleva a cabo utilizando un filtro prensa, y el filtrado es filtrado a continuación a través de una membrana de ultrafiltración; y el procedimiento  $\epsilon$ : la separación sólido-líquido se lleva a cabo utilizando un filtro prensa, y a continuación se lleva a cabo microfiltración, seguido por filtrar adicionalmente el filtrado a través de una membrana de ultrafiltración.

30 En el procedimiento  $\alpha$ , el líquido que contiene azúcar obtenido en la etapa (1) se somete a separación sólido-líquido utilizando solamente una membrana de microfiltración en los casos en los que las cantidades de sustancias que son especialmente propensas a bloquear la superficie de la membrana de microfiltración, tales como los componentes sólidos representados por celulosa no descompuesta y los componentes de gel derivados de macromoléculas, son pequeños. En este caso, es posible eliminar celulosa no descompuesta y componentes inorgánicos tales como sílice que tiene diámetros de partícula de no menos de varias decenas de nanómetros fijados a la biomasa. Si dichos componentes sólidos no son eliminados, cuando se deja pasar al líquido a través de la superficie de la membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa en la etapa (2), la superficie de la membrana puede resultar dañada y la membrana puede ser destruida, o el contenido sólido puede acumularse sobre la superficie en un corto periodo, conduciendo a una disminución del flujo.

40 Además, en los casos en los que las cantidades de contenido sólido, tal como celulosa no descompuesta, son grandes y la cantidad total del líquido no puede filtrarse solamente con una membrana de microfiltración debido a la gran disminución del flujo con el tiempo, el centrifugado se lleva a cabo de forma preliminar y el tratamiento con membrana de microfiltración se lleva a cabo a continuación mediante el procedimiento  $\beta$ , permitiendo de este modo la eliminación de celulosa no descompuesta y componentes inorgánicos, tales como sílice, que tienen diámetros de partícula de no menos de varias decenas de nanómetros fijadas a la biomasa. En el procedimiento  $\gamma$ , también en los casos en los que las cantidades de los componentes sólidos y los componentes de gel son pequeñas, los componentes que tienen masas relativamente grandes pueden eliminarse de forma preliminar mediante el centrifugado, de modo que el mantenimiento de la membrana de microfiltración es menos necesario, produciendo el efecto de reducir el coste del proceso.

50 Además, mediante el procedimiento  $\gamma$  en el que, además del procedimiento  $\beta$ , el tratamiento con una membrana de ultrafiltración se lleva a cabo en la fase posterior, pueden eliminarse componentes de partículas inorgánicas que tienen tamaños de no más de varias decenas de nanómetros, que no pueden eliminarse con la membrana de microfiltración; componentes macromoleculares solubles en agua derivados de lignina (tanino); azúcares que se hidrolizaron pero siguen estando en el medio del proceso de descomposición en monosacáridos, azúcares que están en los niveles de oligosacáridos o polisacáridos; y la enzima utilizada para la hidrólisis del azúcar. En la etapa (2) mencionada a continuación, los componentes de partícula inorgánica pueden dañar y destruir la membrana, o acumularse en la membrana, conduciendo a una disminución del flujo. Además, partículas ultrafinas/aglomerados que tienen diámetros de no más de varios nanómetros, que habitualmente se agregan y se presentan como partículas/aglomerados que tienen diámetros de varias decenas de nanómetros, pueden penetrar en el interior de la membrana y bloquear la membrana. Análogamente, tanino, oligosacáridos, polisacáridos y enzimas pueden ser factores que gelifican y se acumulan sobre la membrana o bloquean la membrana en el interior de la misma. Por lo tanto, llevando a cabo adicionalmente el tratamiento con una membrana de ultrafiltración, se suprime el ensuciamiento de la membrana en la etapa (2), y el coste de mantenimiento para la membrana puede reducirse en gran medida. Además, en el caso de una etapa en la que se utiliza una enzima cuando se lleva a cabo la hidrólisis,

la enzima puede recuperarse utilizando la membrana de ultrafiltración, y la enzima bloqueada por la membrana de ultrafiltración puede reutilizarse devolviéndola a la etapa de hidrólisis en la etapa (1), lo cual es ventajoso.

5 Además, en los casos en los que se selecciona el procedimiento  $\delta$ , en el que el uso de un filtro prensa, filtración centrífuga, centrifugado a alta velocidad y similares puede llevarse a cabo para incrementar adicionalmente la nitidez del líquido en el momento de la separación sólido-líquido, la etapa de microfiltración puede omitirse del procedimiento  $\gamma$  y la etapa de membrana de ultrafiltración puede llevarse a cabo directamente.

10 Además, en los casos en los que la nitidez del líquido es baja, es decir, en los casos en los que la turbidez del líquido es alta, el ensuciamiento de la membrana se produce de forma más acusada en la etapa de membrana de ultrafiltración, lo que puede conducir a un incremento del coste de mantenimiento. Por lo tanto, seleccionando, dependiendo del coste de explotación para la membrana de ultrafiltración, el procedimiento  $\epsilon$ , que es un procedimiento de separación sólido-líquido de alta claridad llevando a cabo tratamiento con membrana de microfiltración antes del tratamiento con membrana de ultrafiltración, para prevenir el ensuciamiento de la membrana de ultrafiltración, el coste de explotación total para la membrana de microfiltración y la membrana de ultrafiltración puede volverse menor que en el procedimiento  $\delta$ , en el que solamente se utiliza una membrana de ultrafiltración.

15 La etapa (2) del procedimiento para producir el líquido que contiene azúcar de la presente invención, que es una etapa de dejar que una solución acuosa de azúcar pase a través de una membrana de ósmosis inversa y, opcionalmente, a través de una membrana de nanofiltración, recuperar un líquido que contiene azúcar purificado desde el lado de alimentación y eliminar sustancias que inhiben la fermentación desde el lado del permeado, se describirá a continuación.

20 La expresión “inhibición de la fermentación” utilizada en la presente invención significa un fenómeno, en el que la cantidad de producción, la cantidad de acumulación o la tasa de producción disminuye en los casos en los que un producto químico se produce utilizando, como materia prima de fermentación, un líquido que contiene azúcar preparado utilizando una biomasa que contiene celulosa que contiene sustancias que inhiben la fermentación como materia prima, en comparación con casos en los que un monosacárido de calidad analítica se utiliza como materia prima de fermentación. El alcance de dicha inhibición de la fermentación no está limitado en la presente invención, dado que el alcance al cual es microorganismo es inhibido varía dependiendo de los tipos de las sustancias que inhiben la fermentación que existen en el líquido sacarificado y las cantidades de las mismas, y el alcance de la inhibición también varía dependiendo de la especie del microorganismo utilizado y el tipo del producto químico producido por el microorganismo.

25 Cualquiera de las soluciones acuosas de azúcar obtenidas mediante los procedimientos para hidrólisis de la biomasa que contiene celulosa contiene sustancias que inhiben la fermentación aunque las cantidades o los componentes de las mismas varían dependiendo del procedimiento o el tipo de la biomasa que contiene celulosa como materia prima. Dichas sustancias que inhiben la fermentación pueden eliminarse sometiendo a la solución acuosa de azúcar al procedimiento de la etapa (2). Las sustancias que inhiben la fermentación son compuestos que se producen mediante hidrólisis de una biomasa que contiene celulosa y tienen acciones inhibitorias, tal como se ha mencionado anteriormente, durante la etapa de fermentación utilizando un líquido que contiene azúcar obtenido mediante el procedimiento de producción de la presente invención. Las sustancias que inhiben la fermentación se producen especialmente durante la etapa de tratamiento con ácido de la biomasa que contiene celulosa, y se clasifican *grosso modo* en ácidos orgánicos, compuestos de furano y compuestos fenólicos.

30 Los ácidos orgánicos incluyen ácido acético, ácido fórmico y ácido levulínico. Los compuestos de furano incluyen furfural e hidroximetilfurfural (MHF). Dichos ácidos orgánicos y compuestos de furano son productos producidos mediante descomposición de glucosa o xilosa, que son monosacáridos.

35 Los compuestos fenólicos incluyen vanilina, acetovanilina, ácido vanílico y ácido siríngico. Estos compuestos se derivan de la lignina o son precursores de la lignina.

40 Además, en los casos en los que un material de desecho de construcción, contrachapado o similar se utiliza como la biomasa que contiene celulosa, componentes tales como adhesivos utilizados en el proceso maderero pueden estar contenidos como sustancias que inhiben la fermentación. Los ejemplos de sustancias que inhiben la fermentación derivadas de dichos adhesivos incluyen ácido acético y ácido fórmico.

45 La solución acuosa de azúcar obtenida en la etapa (1) contiene, como mínimo, una de las sustancias como sustancia o sustancias que inhiben la fermentación, y la solución acuosa de azúcar realmente contiene una pluralidad de las sustancias. Estas sustancias que inhiben la fermentación pueden detectarse y cuantificarse mediante un procedimiento analítico habitual, tal como cromatografía en capa fina, cromatografía de gases o cromatografía de líquidos de alta resolución.

50 La membrana de nanofiltración opcionalmente utilizada en la presente invención también se denomina un nanofiltro (membrana de nanofiltración, membrana de NF), y se define en general como “una membrana que permite la penetración de iones monovalentes, pero bloquea iones divalentes”. Se considera que la membrana tiene vacíos

finos que tienen tamaños aproximadamente de varios nanómetros, y se utiliza principalmente para bloquear partículas finas, moléculas, iones y sales en el agua.

5 La membrana de ósmosis inversa utilizada en la presente invención también se denomina una membrana de RO, y se define en general como “una membrana que tiene una función de desalinización que también puede eliminar iones monovalentes”. Se considera que la membrana tiene vacíos ultrafinos que tienen tamaños que varían entre aproximadamente varios Angstroms y varios nanómetros, y se utiliza principalmente para la eliminación de componentes iónicos, tales como desalinización de agua de mar y producción de agua ultrapura.

10 La expresión “filtrado a través de una membrana de ósmosis inversa y, opcionalmente, a través de una membrana de nanofiltración” en la presente invención significa que un líquido que contiene azúcar obtenido mediante hidrólisis de una biomasa que contiene celulosa es filtrado a través de una membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa para bloquear o separar un líquido que contiene azúcar que contiene azúcares disueltos, especialmente monosacáridos disueltos tales como glucosa y xilosa, en el lado de alimentación, mientras permite a  
15 las sustancias que inhiben la fermentación penetrar como un permeado o filtrado.

El rendimiento o rendimientos de la membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa utilizada en la presente invención pueden evaluarse calculando la tasa de penetración (%) del compuesto previsto (una sustancia que inhibe la fermentación, monosacárido o similar) contenido en la solución acuosa de azúcar. El procedimiento  
20 para calcular la tasa de penetración (%) es el que se muestra en la ecuación 1.

Tasa de penetración (%) = (concentración de compuesto sujeto en el lado del permeado / concentración de compuesto sujeto en el líquido no permeado) × 100 ... (Ecuación 1)

25 El procedimiento para medir la concentración del compuesto sujeto en la ecuación 1 no está limitado, siempre que la concentración pueda medirse con elevada exactitud y reproducibilidad, y los ejemplos preferentes del procedimiento incluyen cromatografía de líquidos de alta resolución y cromatografía de gases. En los casos en los que el compuesto sujeto es un monosacárido, su tasa de penetración a través de la membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa utilizada en la presente invención es preferentemente baja, mientras que en los  
30 casos en los que el compuesto sujeto es una sustancia que inhibe la fermentación, su tasa de penetración es preferentemente alta.

En términos del rendimiento de penetración de la membrana de nanofiltración, preferentemente se utiliza una membrana de nanofiltración en la que el caudal de penetración de cloruro sódico (500 mg/l) por área unitaria de  
35 membrana ( $m^3/m^2/día$ ) a una presión de filtración de 0,3 MPa es de 0,5 a 0,8. El caudal de penetración por área unitaria de membrana (flujo de penetración de la membrana o flujo) puede calcularse según la ecuación 2, midiendo la cantidad del líquido permeado, el tiempo de recogida del líquido permeado, y el área de membrana.

40 Flujo de penetración de la membrana ( $m^3/m^2/día$ ) = cantidad de líquido permeado/área de membrana/tiempo de recogida de líquido ... (Ecuación 2)

El pH de la solución acuosa de azúcar que se aplicará a la membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa no está limitado y es, preferentemente, de 1 a 5. En los casos en los que el pH es menor de 1, la membrana se degrada cuando se utiliza durante un largo periodo, conduciendo a una drástica disminución de los rendimientos  
45 de la membrana, tal como el flujo y la tasa de penetración, mientras que, en los casos en los que el pH es mayor que 5, las tasas de eliminación de ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido fórmico y ácido levulínico pueden disminuir drásticamente. Dado que la superficie o superficies de membrana de la membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa están cargadas, las sustancias ionizadas en la solución son más propensas a ser eliminadas o bloqueadas que las sustancias no ionizadas, de modo que, en los casos en los que el contenido de  
50 ácidos orgánicos contenidos en la solución acuosa de azúcar es elevado, o en los casos en los que se requiere un elevado efecto de eliminación, la eficiencia de eliminación puede mejorarse drásticamente ajustando el pH de la solución acuosa de azúcar a dentro del intervalo descrito anteriormente. Otro efecto de filtrar la solución acuosa de azúcar, cuyo pH se ajustó entre 1 y 5, a través de la membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa es el efecto inhibitorio sobre ensuciamiento de la membrana. En general, el valor de flujo inicial disminuye a medida  
55 que el pH disminuye pero, especialmente en el caso de una solución acuosa de azúcar derivada de una biomasa que contiene celulosa, la estabilidad de la membrana puede mantenerse durante más tiempo a un pH de 1 a 5.

Además, especialmente en el caso de una membrana de ósmosis inversa, el pH de la solución acuosa de azúcar se ajusta preferentemente entre 1 y 3. Análogamente a una membrana de nanofiltración, en los casos en los que el pH  
60 es menor que 1, una membrana de ósmosis inversa se degrada cuando se utiliza durante mucho tiempo, conduciendo a una drástica disminución de los rendimientos de membrana tales como el flujo y la tasa de penetración. Por otro lado, en los casos en los que el pH es mayor de 3, las tasas de eliminación de ácidos orgánicos pueden ser insuficientes. Esto puede deberse al hecho de que, debido a los tamaños de poro más pequeños de una membrana de ósmosis inversa que los de una membrana de nanofiltración, o similar, el radio  
65 iónico, que es el radio efectivo de un ácido orgánico, es demasiado grande para mantener el rendimiento de eliminación equivalente al de una membrana de nanofiltración sin supresión adicional de la carga derivada de la

ionidad de los componentes eluidos.

La utilización de una membrana de ósmosis inversa de tipo de presión baja/presión ultrabaja con la que la presión de funcionamiento puede reducirse, entre membranas de ósmosis inversa, permite la consecución de una tasa de eliminación de ácidos orgánicos equivalente a la de una membrana de RO que no es una membrana de tipo de presión baja/presión ultrabaja, incluso en los casos en los que el pH ajustado del líquido sin procesar es mayor de 3. Por lo tanto, pueden obtenerse los efectos de reducir la cantidad del ácido utilizado para el ajuste del pH y reducir la cantidad del álcali utilizado para el ajuste del pH en la etapa de fermentación en un proceso posterior, y las tasas de eliminación de ácidos orgánicos se mejoran en comparación con una membrana de ósmosis inversa que no es una membrana de tipo de presión baja/presión ultrabaja, de modo que una membrana de ósmosis inversa de tipo de presión baja/presión ultrabaja se utiliza preferentemente en la presente invención. En este caso, la membrana de ósmosis inversa de tipo de presión baja/presión ultrabaja significa una membrana de ósmosis inversa en la que el caudal de penetración de cloruro sódico (500 mg/l) por área unitaria de membrana ( $m^3/m^2/día$ ) a una presión de filtración de 0,75 MPa no es menor de 0,4.

El ácido o álcali utilizado para el ajuste del pH de la solución acuosa de azúcar no está limitado. El ácido es, preferentemente, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico o ácido fosfórico, más preferentemente ácido sulfúrico, ácido nítrico o ácido fosfórico teniendo en cuenta el hecho de que es menos probable que se produzca la inhibición durante la fermentación, aún más preferentemente ácido sulfúrico teniendo en cuenta la eficiencia económica. El álcali es, preferentemente, amoníaco, hidróxido sódico o hidróxido cálcico, o una solución acuosa que lo contiene teniendo en cuenta la eficiencia económica, más preferentemente amoníaco o sodio, que son iones monovalentes, teniendo en cuenta el ensuciamiento de membrana, aún más preferentemente amoníaco teniendo en cuenta que es menos probable que se produzca la inhibición durante la fermentación.

La fase en la que el ajuste del pH de la solución acuosa de azúcar se puede llevar a cabo antes del tratamiento con membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa. Además, en los casos en los que se utiliza una enzima para hidrólisis de la biomasa que contiene celulosa, el pH puede ajustarse a no más de 5 cuando se lleva a cabo la reacción de hidrólisis. Además, en los casos en los que se emplea el proceso de reutilizar la enzima utilizando una membrana de ultrafiltración, es probable que la enzima se desactive si el pH disminuye a no más de 4, de modo que se ajuste preferentemente el pH del filtrado después del tratamiento con membrana de ultrafiltración.

La temperatura de la solución acuosa de azúcar que se someterá al tratamiento con una membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa en la presente invención no está limitada, sino que la temperatura puede ajustarse apropiadamente con el fin de mejora de la capacidad de eliminación de sustancia que inhibe la fermentación durante la filtración a través de la membrana utilizada.

Más particularmente, en los casos en los que la filtración se lleva a cabo a través de una membrana de ósmosis inversa, la capacidad de eliminación de sustancia que inhibe la fermentación de la membrana de ósmosis inversa es alta si la temperatura de la solución acuosa de azúcar es de 40 a 80°C, de modo que la temperatura se ajusta preferentemente dentro de este intervalo. Esto se debe a que la capacidad de eliminación comienza a incrementar a una temperatura de la solución acuosa de azúcar de 40°C o superior en los casos en los que la filtración se lleva a cabo a través de una membrana de nanofiltración, pero una temperatura superior a 80°C puede causar degradación de la membrana de ósmosis inversa, dando como resultado la pérdida de las propiedades de la membrana.

En los casos en los que la filtración se lleva a cabo a través de una membrana de nanofiltración, la temperatura de la solución acuosa de azúcar se ajusta, preferentemente, entre 1 y 15°C. Si la temperatura de la solución acuosa de azúcar es menor de 1°C en los casos en los que la filtración se lleva a cabo a través de una membrana de nanofiltración, las tuberías pueden congelarse en el interior, causando errores del dispositivo, mientras que en los casos en los que la temperatura es mayor de 15°C, un efecto de reducir la pérdida no aparece en gran medida. El control de la temperatura se basa en el hecho de que, en los casos en los que la temperatura es alta, se produce hinchazón de la membrana, las sustancias que tienen pesos moleculares más grandes son eliminadas, y la cantidad de eliminación tiende a incrementar, mientras que en los casos en los que la temperatura es baja, se produce la contracción de la membrana y los tamaños de poro de la membrana disminuyen, dando como resultado la disminución de la pérdida del azúcar en el lado del filtrado.

Dado que una membrana de nanofiltración se clasifica, en general, como una membrana que tiene un tamaño de poro mayor que una membrana de ósmosis inversa, en los casos en los que se utiliza una membrana de nanofiltración en la etapa (2), las sustancias que inhiben la fermentación penetran a través de la membrana y los pesos de las sustancias eliminadas son mayores en comparación con los de una membrana de ósmosis inversa pero, por otro lado, se considera que los pesos de monosacáridos, que son los productos de interés, perdidos en el lado del permeado también son grandes. En particular, en los casos en los que la concentración de azúcar es alta, dicha tendencia aparece de forma notable. Por otro lado, dado que se utiliza una membrana de ósmosis inversa en la etapa (2), se considera, debido a los pequeños tamaños de poro, que los pesos de las sustancias inhibitorias que tienen pesos moleculares grandes que pueden eliminarse son más pequeños en comparación con aquellos en el caso de una membrana de nanofiltración. Por lo tanto, es preferente seleccionar una membrana apropiada entre membranas de ósmosis inversa y, opcionalmente, membranas de nanofiltración dependiendo de los pesos de las

sustancias que inhiben la fermentación y los pesos moleculares de las sustancias principales que inhiben la fermentación en el líquido que contiene azúcar obtenido mediante los tratamientos descritos anteriormente. El número de tipos de la membrana seleccionada no es necesariamente uno, y varios tipos de membranas pueden seleccionarse, a utilizar en combinación para la filtración, siempre que se seleccionen la capa o capas funcionales para la membrana de ósmosis inversa, según la reivindicación 1.

Se descubrió que, en los casos en los que un líquido que contiene azúcar purificado se obtiene utilizando una membrana de nanofiltración, a medida que prosigue la purificación de monosacáridos capturados en el lado del concentrado de la membrana de nanofiltración y sus concentraciones se incrementan, la tendencia de perder los monosacáridos en el lado del filtrado se incrementa bruscamente. Por otro lado, en los casos en los que la purificación se llevó a cabo utilizando una membrana de ósmosis inversa, la tendencia a perder los monosacáridos fue constantemente casi cero incluso cuando la concentración de monosacárido en el lado del concentrado se incrementa pero, teniendo en cuenta la eliminación de sustancias que inhiben la fermentación, una membrana de nanofiltración mostraba un mejor rendimiento que una membrana de ósmosis inversa. Por lo tanto, se descubrió que la pérdida de monosacáridos en el lado del filtrado puede suprimirse mientras se eliminan grandes cantidades de sustancias que inhiben la fermentación, llevando a cabo el proceso de purificación utilizando una membrana de nanofiltración, con la que pueden eliminarse cantidades más grandes de sustancias que inhiben la fermentación en comparación con una membrana de ósmosis inversa, a una concentración a la cual la pérdida de azúcares en el filtrado es grande, seguido de la continuación adicional del proceso de purificación utilizando una membrana de ósmosis inversa, que muestra una eficiencia de eliminación de sustancias que inhiben la fermentación algo menor que una membrana de nanofiltración pero puede concentrar monosacáridos sin pérdida. Por lo tanto, en los casos en los que una membrana de nanofiltración y una membrana de ósmosis inversa se combinan para obtener un líquido que contiene azúcar purificado en la presente invención, la combinación no está limitada, pero es preferente filtrar la solución acuosa de azúcar obtenida en la etapa (1) en primer lugar a través de una membrana de nanofiltración, seguido por filtrar adicionalmente el filtrado obtenido a través de una membrana de ósmosis inversa.

Los ejemplos del material de la membrana de nanofiltración que pueden utilizarse en la presente invención incluyen materiales macromoleculares tales como polímeros de acetato de celulosa, poliamidas, poliésteres, poliimidas y polímeros de vinilo. La membrana no está limitada a una membrana constituida por solamente uno de los materiales, y puede ser una membrana que comprende varios materiales de membrana. En términos de la estructura de la membrana, la membrana puede ser una membrana asimétrica, que tiene una capa densa, como mínimo, sobre un lado y microporos que tienen tamaños de poro que gradualmente se incrementan en la dirección desde la capa densa hacia el interior de la membrana o el otro lado de la membrana, o una membrana compuesta, que tiene una capa funcional muy fina formada por otro material sobre la capa densa de una membrana asimétrica. Los ejemplos de la membrana compuesta que puede utilizarse incluyen la membrana compuesta descrita en la Patente JP 62-201606 A, que tiene un nanofiltro compuesto por una capa funcional de poliamida sobre una membrana de soporte que comprende polisulfona como material de membrana.

Entre estos, una membrana compuesta que tiene una capa funcional compuesta por una poliamida es preferente, dado que tiene una elevada resistencia a la presión, elevada permeabilidad y elevado rendimiento de eliminación de soluto, que dotan a la membrana de un gran potencial. Para el mantenimiento de la durabilidad contra la presión de funcionamiento, elevada permeabilidad y elevado rendimiento de bloqueo, es adecuada una membrana que tiene una estructura en la que se utiliza una poliamida como una capa funcional, capa que es retenida por un soporte que comprende una membrana porosa y una tela no tejida. Además, como membrana semipermeable de poliamida, es adecuada una membrana semipermeable compuesta que tiene, sobre un soporte, una capa funcional de una poliamida reticulada obtenida mediante reacción de policondensación entre una amina polifuncional y un haluro de ácido polifuncional.

En la membrana de nanofiltración que tiene una capa funcional compuesta por una poliamida, los ejemplos preferentes del componente de ácido carboxílico de los monómeros que constituyen la poliamida incluyen ácidos carboxílicos aromáticos tales como ácido trimésico, ácido benzofenonetetracarboxílico, ácido trimelítico, ácido piromelítico, ácido isoftálico, ácido tereftálico, ácido naftalenodicarboxílico, ácido difenilcarboxílico y ácido piridincarboxílico. Teniendo en cuenta la solubilidad de disolventes formadores de película, son más preferentes ácido trimésico, ácido isoftálico y ácido tereftálico, y mezclas de los mismos.

Los ejemplos preferentes del componente de amina de los monómeros que constituyen la poliamida incluyen diaminas primarias que tienen un anillo aromático, tal como m-fenilendiamina, bencidina, metilen bis dianilina, 4,4'-diaminobifeniléter, dianisidina, 3,3',4'-triaminobifeniléter, 3,3',4,4'-tetraaminobifeniléter, 3,3'-dioxibencidina, 1,8-naftalendiamina, m(p)-monometilfenilendiamina, 3,3'-monometilamino-4,4'-diaminobifeniléter, 4,N,N'-(4-aminobenzoil)-p(m)-fenilendiamina, 2,2'-bis(4-aminofenil)benzimidazol, 2,2'-bis(4-aminofenil)benzooxazol y 2,2'-bis(4-aminofenil)benzotiazol; y diaminas secundarias tales como piperazina, piperidina y derivados de las mismas. Entre éstas, una membrana de nanofiltración que tiene una capa funcional compuesta por una poliamida reticulada que comprende piperazina o piperidina como monómeros se utiliza preferentemente, dado que tiene resistencia térmica y resistencia química además de la resistencia a la presión y la durabilidad. La poliamida, más preferentemente, contiene como componente principal la poliamida de piperazina reticulada o poliamida de piperidina reticulada y contiene, además, un componente constituyente representado por la fórmula química 1, aún

más preferentemente contiene una poliamida de piperazina reticulada como componente principal y contiene además un componente constituyente representado por la fórmula química 1. Además, preferentemente, en la fórmula química 1,  $n=3$ . Los ejemplos de la membrana de nanofiltración que tiene una capa funcional compuesta por una poliamida que contiene una poliamida de piperazina reticulada como componente principal y que contiene, además, un componente constituyente representado por la fórmula química 1 incluyen la descrita en la Patente JP 62-201606 A, y los ejemplos particulares de la misma incluyen UTC60 fabricada por TORAY INDUSTRIES, INC., que es una membrana de nanofiltración de poliamida de piperazina reticulada que tiene una capa funcional compuesta por una poliamida que contiene una poliamida de piperazina reticulada como componente principal y que contiene, además, un componente constituyente representado por la fórmula química 1, en la que  $n=3$ .

Una membrana de nanofiltración se utiliza generalmente como un módulo de membrana enrollado en espiral, y la membrana de nanofiltración utilizada en la presente invención también se utiliza, preferentemente, como un módulo de membrana enrollado en espiral. Ejemplos preferentes particulares del módulo de membrana de nanofiltración incluyen GEsepa, que es una membrana de nanofiltración de acetato de celulosa fabricada por GE Osmonics; NF99 y NF99HF, que son membranas de nanofiltración que tienen una capa funcional compuesta por una poliamida, fabricadas por Alfa-Laval; NF-45, NF-90, NF-200, NF-270 y NF-400, que son membranas de nanofiltración que tienen una capa funcional compuesta por una poliamida de piperazina reticulada, fabricadas por Filmtec Corporation; y SU-210, SU-220, SU-600 y SU-610, que son módulos de membrana de nanofiltración fabricados por TORAY INDUSTRIES, INC., que tienen UTC60 fabricado por el mismo fabricante, que tiene una capa funcional compuesta por una poliamida que contiene una poliamida de piperazina reticulada como componente principal y que contiene, además, un componente constituyente representado por la fórmula química 1. El módulo de membrana de nanofiltración es, más preferentemente, NF99 o NF99HF, que son membranas de nanofiltración que tienen una capa funcional compuesta por una poliamida, fabricadas por Alfa-Laval; NF-45, NF-90, NF-200 o NF-400, que son membranas de nanofiltración que tienen una capa funcional compuesta por una poliamida de piperazina reticulada, fabricadas por Filmtec Corporation; o SU-210, SU-220, SU-600 o SU-610, que son módulos de membrana de nanofiltración fabricados por TORAY INDUSTRIES, INC., que tienen UTC60 fabricado por el mismo fabricante, que tiene una capa funcional compuesta por una poliamida que contiene una poliamida de piperazina reticulada como componente principal y que contiene, además, un componente constituyente representado por la fórmula química 1. El módulo de membrana de nanofiltración es, aún más preferentemente, SU-210, SU-220, SU-600 o SU-610, que son módulos de membrana de nanofiltración fabricados por TORAY INDUSTRIES, INC., que tienen UTC60 fabricado por el mismo fabricante, que tiene una capa funcional compuesta por una poliamida que contiene una poliamida de piperazina reticulada como componente principal y que contiene, además, un componente constituyente representado por la fórmula química 1.

La filtración a través de una membrana de nanofiltración en la etapa (2) puede llevarse a cabo a presión, y la presión de filtración está, preferentemente, dentro del intervalo de 0,1 a 8 MPa. En los casos en los que la presión de filtración es menor de 0,1 MPa, la tasa de penetración de la membrana puede disminuir, mientras que, en los casos en los que la presión de filtración es mayor de 8 MPa, la membrana puede resultar dañada. En los casos en los que la presión de filtración está dentro del intervalo de 0,5 a 7 MPa, el flujo de penetración de la membrana es elevado, de modo que se puede dejar de manera eficiente penetrar la solución de azúcar y la posibilidad de dañar la membrana es pequeña, lo que es más preferente. El intervalo es, de forma especialmente preferente, de 1 a 6 MPa.

En términos del material de la membrana de ósmosis inversa utilizada en la presente invención, la membrana incluye una membrana compuesta que tiene una capa funcional compuesta por un polímero de acetato de celulosa (en lo sucesivo denominada como una membrana de ósmosis inversa de acetato de celulosa) o una membrana compuesta que tiene una capa funcional compuesta por una poliamida (en lo sucesivo denominada también como una membrana de ósmosis inversa de poliamida). En este caso, los ejemplos del polímero de acetato de celulosa incluyen polímeros preparados con ésteres de ácido orgánico de celulosa, tales como acetato de celulosa, diacetato de celulosa, triacetato de celulosa, propionato de celulosa y butirato de celulosa, que pueden usarse individualmente, como una mezcla, o como un éster mixto. Los ejemplos de la poliamida incluyen polímeros lineales y polímeros reticulados por monómeros de diamina alifáticos y/o aromáticos.

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

En la presente invención, se utiliza, preferentemente, una membrana de ósmosis inversa que tiene un material de poliamida. Esto es porque, cuando una membrana de acetato de celulosa se utiliza durante un largo periodo, las

enzimas utilizadas en la etapa previa, especialmente una parte del componente de celulasa, pueden penetrar en la membrana para descomponer celulosa como un material de membrana.

5 Los ejemplos de la forma de la membrana que pueden utilizarse como apropiados incluyen membrana plana, membrana enrollada en espiral y membrana de fibra hueca.

10 La filtración a través de una membrana de ósmosis inversa en la etapa (2) puede llevarse a cabo a presión, y la presión de filtración se encuentra, preferentemente, dentro del intervalo de 0,1 a 8 MPa. En los casos en los que la presión de filtración es menor de 0,1 MPa, la tasa de penetración de la membrana puede disminuir mientras que, en los casos en los que la presión de filtración es mayor de 8 MPa, la membrana puede resultar dañada. En los casos en los que la presión de filtración está dentro del intervalo de 0,5 a 7 MPa, el flujo de penetración de la membrana es elevado, de modo que se puede dejar penetrar de forma eficiente a la solución de azúcar y la posibilidad de dañar la membrana es pequeña, lo cual es más preferente. El intervalo es, de forma especialmente preferente, de 1 a 6 MPa.

15 En la etapa (2), las sustancias que inhiben la fermentación se eliminan de la solución acuosa de azúcar permitiendo que penetren a través de la membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa. Entre las sustancias que inhiben la fermentación, HMF, furfural, ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, vanilina, acetovanilina, ácido vanílico y ácido síringico pueden dejarse penetrar/eliminarse. Por otro lado, los azúcares contenidos en la solución acuosa de azúcar son bloqueados o separados en el lado de alimentación de la membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa. Los azúcares contienen monosacáridos, tales como glucosa y xilosa como componentes principales, y también contienen componentes de azúcar que no han sido descompuestos completamente en monosacáridos durante el proceso de hidrólisis en la etapa (1), tales como disacáridos y oligosacáridos.

25 En la etapa (2), cuando se compara con la solución acuosa de azúcar antes de haber pasado a través de la membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa, el líquido que contiene azúcar purificado obtenido desde el lado de alimentación de la membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa tiene un contenido reducido especialmente de sustancias que inhiben la fermentación con respecto a su contenido inicial. Los componentes de azúcar contenidos en el líquido que contiene azúcar purificado son azúcares derivados de la biomasa que contiene celulosa y, esencialmente, estos no son diferentes en gran medida de los componentes de azúcar obtenidos mediante la hidrólisis en la etapa (1). Es decir, los monosacáridos contenidos en el líquido que contiene azúcar purificado de la presente invención comprenden glucosa y/o xilosa como componente o componentes principales. La proporción entre glucosa y xilosa varía, dependiendo de la etapa de hidrólisis en la etapa (1), y no está limitada en la presente invención. Es decir, en los casos en los que la hidrólisis se lleva a cabo principalmente para hemicelulosa, la xilosa es el componente monosacárido principal mientras que, en los casos en los que la hemicelulosa se descompone y solamente el componente de celulosa es separado e hidrolizado a continuación, la glucosa es el componente monosacárido principal. Además, en los casos en los que la descomposición de hemicelulosa, la descomposición de celulosa y la separación no se llevan a cabo, la glucosa y la xilosa están contenidas como componentes monosacáridos principales.

40 El líquido que contiene azúcar purificado obtenido en la etapa (2) puede concentrarse una vez utilizando un concentrador, tal como un evaporador, o el líquido que contiene azúcar purificado puede filtrarse adicionalmente a través de una membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa para incrementar la concentración. A efectos de reducir la energía para la concentración, la etapa de incrementar adicionalmente la concentración filtrando el líquido que contiene azúcar purificado a través de una membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa se emplea preferentemente. La membrana utilizada en esta etapa de concentración es un filtro de membrana que elimina iones y moléculas de bajo peso molecular utilizando una diferencia de presión mayor que la presión osmótica del líquido que será tratado como fuerza motriz, y ejemplos de los que pueden utilizarse incluyen membranas de celulosa tales como las de acetato de celulosa y membranas producidas policondensando un compuesto de amina polifuncional y un haluro de ácido polifuncional para proporcionar una capa funcional de separación hecha de una poliamida sobre una membrana de soporte microporosa. Para suprimir la suciedad, es decir, el ensuciamiento, en la superficie o superficies de la membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa, una membrana de ósmosis inversa de bajo ensuciamiento, destinada principalmente al tratamiento de aguas residuales, también puede emplearse preferentemente, membrana de ósmosis inversa de bajo ensuciamiento que se prepara cubriendo la superficie de una capa funcional de separación hecha de una poliamida con una solución acuosa de un compuesto que tiene, como mínimo, un grupo reactivo, reactivo con un grupo de haluro de ácido, permitiendo de este modo que los grupos de haluro de ácido que quedan sobre la superficie de la capa funcional de separación formen enlaces covalentes con los grupos reactivos. Como membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa a utilizar en la presente invención, puede utilizarse, más preferentemente, una que tiene tasas de bloqueo de monosacáridos, tales como glucosa y xilosa, más elevadas que la membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa utilizada en la etapa (2).

65 Los ejemplos particulares de la membrana de nanofiltración o membrana de ósmosis inversa utilizada para la concentración son los mismos que los ejemplos particulares de la membrana de nanofiltración o membrana de ósmosis inversa descrita anteriormente.

El agua descargada como filtrado en la etapa (2) puede reutilizarse en una etapa de producción de un azúcar, tal como hidrólisis o purificación de azúcar, o en una etapa posterior de producir un producto químico, tal como fermentación o purificación de un producto químico. Además, el filtrado puede filtrarse a través de una membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa una vez más antes de la reutilización. Más preferentemente, el pH se ajusta entre 1 y 5 y el líquido se purifica utilizando una membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa, seguido por filtrar el filtrado a través de una membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa y llevar a cabo la reutilización. Aún más preferentemente, el pH se ajusta entre 1 y 5 y el líquido se purifica a través de una membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa, seguido por incrementar el pH de nuevo, eliminar selectivamente especialmente ácidos orgánicos utilizando una membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa, y llevar a cabo la reutilización.

El procedimiento para producir un producto químico utilizando, como materia prima de fermentación, un líquido que contiene azúcar purificado, obtenido mediante el procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar de la presente invención se describirá a continuación.

Utilizando un líquido que contiene azúcar purificado obtenido mediante la presente invención como materia prima de fermentación, puede producirse un producto químico. El líquido que contiene azúcar purificado obtenido en la presente invención contiene, como componentes principales, glucosa y/o xilosa, que son fuentes de carbono para el crecimiento de microorganismos o células cultivadas. Por otro lado, el contenido de sustancias que inhiben la fermentación, tales como compuestos de furano, ácidos orgánicos y compuestos aromáticos es muy pequeño. Por lo tanto, el líquido que contiene azúcar purificado puede utilizarse eficazmente como materia prima de fermentación, especialmente como fuente de carbono.

Los ejemplos de los microorganismos o células cultivadas utilizados en el procedimiento de la presente invención para producir un producto químico incluyen levaduras, tales como levadura de panadería, que se utilizan habitualmente en la industria de la fermentación; bacterias tales como *E. coli* y bacterias corineformes; hongos filamentosos; actinomicetos; células animales; y células de insecto. Los microorganismos o células cultivadas utilizadas pueden ser aquellos aislados de un entorno natural, o pueden ser aquellos cuyas propiedades fueron parcialmente modificadas por mutación o recombinación génica. En particular, dado que un líquido que contiene azúcar derivado de una biomasa que contiene celulosa contiene pentosas, tales como xilosa, pueden utilizarse preferentemente microorganismos cuyas rutas metabólicas para pentosas se mejoraron.

Como medio utilizado en el procedimiento de la presente invención para producir un producto químico, se utiliza preferentemente un medio líquido que contiene, además del líquido que contiene azúcar purificado, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas y, según se requiera, micronutrientes orgánicos tales como aminoácidos y vitaminas. El líquido que contiene azúcar purificado de la presente invención contiene, como fuentes de carbono, monosacáridos que pueden ser utilizados por microorganismos, tales como glucosa y xilosa pero, en algunos casos, azúcares tales como glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa y lactosa; líquidos de almidón sacarificado que contienen estos azúcares; melazas de boniato; melazas de remolacha azucarera; melazas de alta concentración; ácidos orgánicos tales como ácido acético; alcoholes tales como etanol; glicerina; y similares pueden añadirse además como fuentes de carbono, para utilizar el líquido que contiene azúcar purificado como materia prima de fermentación. Los ejemplos de las fuentes de nitrógeno utilizada incluyen amoníaco gaseoso, amoníaco acuoso, sales de amonio, sales de urea y ácido nítrico; y otras fuentes de nitrógeno orgánicas utilizadas de forma suplementaria tales como tortas oelaginosas, líquidos hidrolizados con soja, digestos de caseína, otros aminoácidos, vitaminas, licores de maceración de maíz, levaduras o extractos de levaduras, extractos de carne, péptidos tales como peptonas, y células de diversos microorganismos de fermentación e hidrolizados de los mismos. Los ejemplos de las sales inorgánicas que pueden añadirse, según sea apropiado, incluyen sales de ácido fosfórico, sales de magnesio, sales de calcio, sales de hierro y sales de manganeso.

En los casos en los que el microorganismo utilizado en la presente invención requiere nutrientes particulares para su crecimiento, los nutrientes pueden añadirse como preparaciones o productos naturales que las contienen. También puede añadirse un agente anti-formación, según se requiera.

El cultivo del microorganismo se lleva a cabo habitualmente a un pH dentro del intervalo de 4 a 8, a una temperatura dentro del intervalo de 20 a 40°C. El pH del medio de cultivo se ajusta por adelantado con un ácido inorgánico u orgánico, sustancia alcalina, urea, carbonato cálcico, amoníaco gaseoso o similar a un pH predeterminado dentro del intervalo de, habitualmente, 4 a 8. En los casos en los que es necesario incrementar la tasa de alimentación de oxígeno, puede emplearse un procedimiento en el que la concentración de oxígeno se mantiene a no menos del 21% añadiendo oxígeno al aire; el cultivo se lleva a cabo a presión; la tasa de agitación se incrementa; el volumen de ventilación se incrementa; o similar.

Como procedimiento para producir un producto químico utilizando, como materia prima de fermentación, un líquido que contiene azúcar purificado obtenido mediante el procedimiento de la presente invención para producir un líquido que contiene azúcar, puede emplearse un procedimiento de cultivo de fermentación conocido por los expertos en la materia pero, teniendo en cuenta la productividad, se emplea preferentemente el procedimiento de cultivo continuo dado a conocer en la Patente WO2007/097260.

El producto químico producido mediante el procedimiento de la presente invención para producir un producto químico no está limitado siempre que sea una sustancia producida en el medio de cultivo por el microorganismo o células anteriores. Los ejemplos particulares del producto químico producido en la presente invención incluyen alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos y ácidos nucleicos, que son sustancias producidas en masa en la industria de la fermentación. Los ejemplos de las sustancias incluyen alcoholes tales como etanol, 1,3-propanodiol, 1,4-propanodiol y glicerol; ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido málico, ácido itacónico y ácido cítrico; ácidos nucleicos tales como nucleósidos que incluyen inosina y guanosina, y nucleótidos que incluyen ácido inosínico y ácido guanílico; y compuestos de diamina tales como cadaverina. Además, la presente invención también puede aplicarse a la producción de sustancias tales como enzimas, antibióticos y proteínas recombinantes.

## EJEMPLOS

El procedimiento de la presente invención para producir un líquido que contiene azúcar se describirá a continuación con más detalle por medio de ejemplos. Sin embargo, la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

(Ejemplo de referencia 1) Procedimiento para analizar la concentración de monosacárido

Las concentraciones de monosacáridos contenidos en la solución acuosa de azúcar obtenida se cuantificaron en las condiciones de HPLC descritas a continuación, en base a comparación con muestras estándar.

Columna: Luna NH<sub>2</sub> (fabricada por Phenomenex, Inc.)  
 Fase móvil: agua ultrapura:acetonitrilo = 25:75 (caudal, 0,6 ml/min.)  
 Solución de reacción: ninguna  
 Procedimiento de detección: RI (índice de refracción diferencial)  
 Temperatura: 30°C

(Ejemplo de referencia 2) Procedimiento para analizar concentraciones de sustancias que inhiben la fermentación

Las sustancias que inhiben la fermentación a base de furano (HMF, furfural) y las sustancias que inhiben la fermentación a base de fenol (vanilina, acetovanilina, ácido siríngico, ácido levulínico y ácido 4-hidroxibenzoico) contenidas en el líquido que contiene azúcar se cuantificaron en las condiciones de HPLC descritas a continuación, en base a comparación con muestras estándar.

Columna: Synergi HidroRP 4,6 mm×250 mm (fabricada por Phenomenex, Inc.)  
 Fase móvil: acetonitrilo-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0,1% (caudal, 1,0 ml/min.)  
 Procedimiento de detección: UV (283 nm)  
 Temperatura: 40°C

Las sustancias que inhiben la fermentación a base de ácidos orgánicos (ácido acético, ácido fórmico) contenidas en el líquido que contiene azúcar se cuantificaron en las condiciones de HPLC descritas a continuación, en base a comparación con muestras estándar.

Columna: Shim-Pack SPR-H y Shim-Pack SCR101H (fabricadas por Shimadzu Corporation) en serie  
 Fase móvil: ácido p-toluenosulfónico 5 mM (caudal, 0,8 ml/min.)  
 Solución de reacción: ácido p-toluenosulfónico 5 mM, Bis-Tris 20 mM, EDTA 0,1 mM-2Na (caudal, 0,8 ml/min.)  
 Procedimiento de detección: conductividad eléctrica  
 Temperatura: 45°C

(Ejemplo de referencia 3) Etapa de hidrólisis de biomasa que contiene celulosa mediante tratamiento con ácido sulfúrico diluido/enzima

En términos de la etapa de hidrólisis de una biomasa que contiene celulosa en la etapa (1), se describe un ejemplo del procedimiento de hidrólisis de una biomasa que contiene celulosa utilizando del 0,1 al 15% en peso de ácido sulfúrico diluido y una enzima.

Como biomasa que contiene celulosa, se utilizó paja de arroz. La biomasa que contiene celulosa se empapó en solución acuosa de ácido sulfúrico al 1%, y se sometió a tratamiento utilizando un autoclave (fabricado por Nitto Koatsu Co., Ltd.) a 150°C durante 30 minutos. Después del tratamiento, se llevó a cabo separación sólido-líquido para separar la celulosa tratada con ácido sulfúrico de la solución acuosa de ácido sulfúrico (en lo sucesivo denominada como "líquido de tratamiento con ácido sulfúrico diluido"). Posteriormente, la celulosa tratada con ácido sulfúrico se mezcló con el líquido de tratamiento con ácido sulfúrico diluido con agitación, de modo que la concentración del contenido sólido es el 10% en peso, y el pH se ajustó a aproximadamente 5 con hidróxido sódico. A esta mezcla, se añadieron celulasas de *Trichoderma* (Sigma Aldrich Japón) y Novozyme 188 (preparación de β-glucosidasa derivada de *Aspergillus niger*, Sigma Aldrich Japón) como celulasas, y la mezcla resultante se mezcló

agitando a 50°C durante 3 días para permitir proseguir a la reacción de hidrólisis. Seguidamente, se llevó a cabo centrifugado (3.000 G) para separar/eliminar celulosa no descompuesta y lignina, para obtener una solución acuosa de azúcar. La turbidez de la solución acuosa de azúcar era de 700 NTU. Las composiciones de las sustancias que inhiben la fermentación y los monosacáridos contenidos en la solución acuosa de azúcar fueron tal como se muestra en las tablas 1 y 2.

[Tabla 1]

Tabla 1 Cuantificación de sustancias que inhiben la fermentación

	Líquido de tratamiento con ácido sulfúrico diluido	Solución acuosa de azúcar
Ácido fórmico	0,1 g/l	0,1 g/l
Ácido acético	2,0 g/l	2,4 g/l
HMF	100 mg/l	125 mg/l
Furfural	560 mg/l	875 mg/l
Vanilina	60 mg/l	90 mg/l
Acetovanilina	120 mg/l	146 mg/l
Ácido siríngico	10 mg/l	15 mg/l
Ácido levulínico	9 mg/l	10 mg/l

[Tabla 2]

Tabla 2 Cuantificación de monosacáridos

	Líquido de tratamiento con ácido sulfúrico diluido	Solución acuosa de azúcar
Glucosa	3 g/l	25 g/l
Xilosa	15 g/l	12 g/l
Arabinosa	0,8 g/l	1 g/l
Manosa	0,9 g/l	1 g/l

(Ejemplo de referencia 4) Etapa de hidrólisis de biomasa que contiene celulosa mediante tratamiento hidrotérmico/tratamiento enzimático

En términos de la etapa de hidrólisis de una biomasa que contiene celulosa en la etapa (1), se describe un ejemplo del procedimiento de hidrólisis de una biomasa que contiene celulosa utilizando tratamiento hidrotérmico y una enzima.

Como biomasa que contiene celulosa, se utilizó paja de arroz. La biomasa que contiene 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, se llevó a cabo separación sólido-líquido mediante centrifugado (3.000 G) para separar el componente de biomasa procesada del componente de solución (en lo sucesivo denominado como "líquido tratado hidrotérmicamente"). El pH del líquido tratado hidrotérmicamente era de 4,0, y la turbidez del líquido tratado hidrotérmicamente era de 800 NTU.

Seguidamente, se midió el contenido de agua del componente de biomasa procesada, y se añadió agua de RO al componente, de modo que la concentración del contenido sólido fuera del 15% en peso en términos de la biomasa procesada seca absoluta, seguido de la añadidura de además, como celulasas, celulasa de *Trichoderma* (Sigma Aldrich Japón) y Novozyme 188 (Preparación de  $\beta$ -glucosidasa derivada de *Aspergillus niger*, Sigma Aldrich Japón) y mezclar la mezcla resultante mediante agitación a 50°C durante 3 días para permitir la reacción de hidrólisis. Seguidamente, se llevó a cabo centrifugado (3.000 G) para separar/eliminar celulosa no descompuesta y lignina, para obtener una solución acuosa de azúcar. El pH de la solución acuosa de azúcar era de 5,2, y la turbidez de la solución acuosa de azúcar era de 900 NTU. Las composiciones de las sustancias que inhiben la fermentación y los monosacáridos contenidos en el líquido tratado hidrotérmicamente y la solución acuosa de azúcar eran tal como se muestra en las tablas 3 y 4.

[Tabla 3]

Tabla 3 Cuantificación de sustancias que inhiben la fermentación

	Líquido tratado hidrotérmicamente	Solución acuosa de azúcar
Ácido fórmico	1,1 g/l	0,1 g/l
Ácido acético	2,2 g/l	0,5 g/l
HMF	139 mg/l	10 mg/l
Furfural	8 mg/l	15 mg/l
Vanilina	50 mg/l	3 mg/l
Acetovanilina	2 mg/l	13 mg/l
Ácido siríngico	1 mg/l	1 mg/l

5 [Tabla 4]

Tabla 4 Cuantificación de monosacáridos

	Líquido tratado hidrotérmicamente	Solución acuosa de azúcar
Glucosa	2 g/l	50 g/l
Xilosa	15 g/l	8 g/l
Arabinosa	0,5 g/l	1 g/l
Manosa	0,5 g/l	0,5 g/l

10 (Ejemplo de referencia 5) Etapa de hidrólisis de biomasa que contiene celulosa mediante tratamiento con amoníaco/tratamiento enzimático

15 En términos de la etapa de hidrólisis de una biomasa que contiene celulosa en la etapa (1), se describe un ejemplo del procedimiento de hidrólisis de una biomasa que contiene celulosa utilizando del 5,0 al 100% en peso de amoníaco acuoso y una enzima. Como biomasa que contiene celulosa, se utilizó paja de arroz. La biomasa que  
 20 contiene celulosa se introdujo en un pequeño reactor (fabricado por Taiatsu Techno Corporation, TVS-N2 30 ml), y se refrigeró con nitrógeno líquido. Al interior de 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 reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos. Posteriormente, el reactor se procesó en un baño de aceite a 150°C durante 1 hora. Seguidamente, el reactor se extrajo del baño de aceite, y el amoníaco gaseoso se dejó escapar en una campana extractora, seguido por someter al vacío el interior del reactor a 10 Pa con una bomba de vacío, secando de este modo la biomasa que contiene celulosa. Esta biomasa que contiene celulosa procesada se  
 25 mezcló con agua pura mediante agitación de modo que la concentración del contenido sólido sea del 15% en peso, y el pH se ajustó a aproximadamente 5 con ácido sulfúrico. A esta mezcla, se le añadieron celulasas de *Trichoderma* (Sigma Aldrich Japón) y Novozyme 188 (Preparación de  $\beta$ -glucosidasa derivada de *Aspergillus niger*, Sigma Aldrich Japón) como celulasas, y la mezcla resultante se mezcló agitando a 50°C durante 3 días para permitir la reacción de hidrólisis. Seguidamente, se llevó a cabo centrifugado (3.000 G) para separar/eliminar celulosa no descompuesta y lignina, para obtener una solución acuosa de azúcar. La turbidez de la solución acuosa de azúcar era de 600 NTU. Las composiciones de las sustancias que inhiben la fermentación y los monosacáridos contenidos en la solución  
 30 acuosa de azúcar eran tal como se muestra en las tablas 5 y 6.

[Tabla 5]

Tabla 5 Cuantificación de sustancias que inhiben la fermentación

	Solución acuosa de azúcar
Ácido fórmico	1,1 g/l
Ácido acético	0,5 g/l
HMF	500 mg/l
Furfural	5 mg/l
Vanilina	20 mg/l
Acetovanilina	18 mg/l
Ácido siríngico	2 mg/l

35 [Tabla 6]

Tabla 6 Cuantificación de monosacáridos

	Solución acuosa de azúcar
Glucosa	50 g/l
Xilosa	25 g/l
Arabinosa	2 g/l
Manosa	1 g/l

(Ejemplo 1) Etapa de filtración de la solución acuosa de azúcar tratada con ácido sulfúrico diluido/enzima a través de membrana de nanofiltración o membrana de ósmosis inversa

Una etapa de filtración de la solución acuosa de azúcar obtenida en el ejemplo de referencia 3 a través de una membrana de nanofiltración (membrana de NF) o membrana de ósmosis inversa (membrana de RO) y recoger un líquido que contiene azúcar purificado desde el lado de alimentación, mientras se eliminan sustancias que inhiben la fermentación desde el lado del permeado se describe por medio de un ejemplo. A través de una membrana de PVDF que tiene un tamaño de poro de 0,05  $\mu\text{m}$ , se filtraron 20 l de la solución acuosa de azúcar obtenida en el ejemplo de referencia 3, y el filtrado se procesó a través de una membrana de nanofiltración o módulo de membrana de ósmosis inversa. En el tanque de líquido sin procesar 1 del aparato de filtración por membrana mostrado en la figura 1, se introdujeron 20 l de la solución acuosa de azúcar obtenida en el ejemplo 2. Seguidamente, se añadieron 200 l de agua de RO al tanque de líquido sin procesar 1. Como membrana de nanofiltración, se estableció una membrana de nanofiltración de poliamida de piperazina reticulada UTC60 (fabricada por TORAY INDUSTRIES, INC.) o, como membrana de RO, se estableció una membrana de ósmosis inversa de poliamida completamente aromática reticulada UTC80 (fabricada por TORAY INDUSTRIES, INC.), membrana que se indica mediante el símbolo 7 en la figura 2. La temperatura del líquido sin procesar se ajustó a 25°C y la presión mediante la bomba de alta presión 3 se ajustó a 3 MPa, eliminando de este modo el permeado. Se eliminó un total de 200 l del permeado y, a la solución que quedaba en el tanque de líquido sin procesar, cuyo volumen era un poco menor de 20 l, se le añadió agua de RO para conseguir un volumen final de 20 l. La dilución resultante se utilizó como líquido que contiene azúcar purificado.

Sustancias que inhiben la fermentación (HMF, furfural, vanilina, acetovanilina y ácido siríngico) contenidas en la solución acuosa de azúcar obtenida en el ejemplo de referencia 3 y en los líquidos que contienen azúcar purificados anteriores se cuantificaron en las condiciones de HPLC descritas en el ejemplo de referencia 1, en base a comparación con muestras estándar. Además, las concentraciones de monosacáridos se cuantificaron en las condiciones de HPLC descritas en el ejemplo de referencia 1, en base a comparación con muestras estándar. Los resultados se resumen en las tablas 7 y 8. Se demostró mediante el análisis que, como sustancias que inhiben la fermentación, estaban contenidos ácido acético, ácido fórmico, furfural, HMF, vanilina, acetovanilina, ácido siríngico y ácido levulínico. Además, en términos de monosacáridos contenidos en los líquidos que contienen azúcar respectivos, glucosa y xilosa eran los componentes principales. Además, aunque las cantidades eran muy pequeñas, también se detectaron arabinosa y manosa. Además, se confirmó que los líquidos que contienen azúcar purificados tienen cantidades reducidas en gran medida de sustancias que inhiben la fermentación en comparación con la solución acuosa de azúcar obtenida en el ejemplo de referencia 3. Por otro lado, dado que las concentraciones de azúcares no disminuían en gran medida en los líquidos que contienen azúcar purificados, podía confirmarse que el procesamiento de la solución acuosa de azúcar a través de la membrana de nanofiltración o membrana de ósmosis inversa permite la eliminación de sustancias que inhiben la fermentación como permeado, mientras permite la recuperación de un líquido que contiene azúcar purificado, en el que las concentraciones de sustancias que inhiben la fermentación disminuyen, desde el lado de alimentación.

[Tabla 7]

Tabla 7 Cuantificación de sustancias que inhiben la fermentación

	Solución acuosa de azúcar	líquido que contiene azúcar purificado a través de membrana de NF (referencia) <sup>1</sup>	líquido que contiene azúcar purificado a través de membrana de RO (invención)
Ácido fórmico	0,1 g/l	0 g/l	0 g/l
Ácido acético	2,4 g/l	0,2 g/l	1,2 g/l
HMF	125 mg/l	18 mg/l	90 mg/l
Furfural	875mg/l	88 mg/l	240 g/l
Vanilina	90 mg/l	2,7 mg/l	62 mg/l
Acetovanilina	146 mg/l	9 mg/l	103 mg/l
Ácido siríngico	15 mg/l	0 mg/l	10 mg/l
Ácido levulínico	10 mg/l	0 mg/l	3 mg/l

<sup>1</sup> Las realizaciones de referencia están fuera del alcance de la presente invención

[Tabla 8]

Tabla 8 Cuantificación de monosacáridos

	Solución acuosa de azúcar	Líquido que contiene azúcar purificado a través de membrana de NF (referencia)	Líquido que contiene azúcar purificado a través de membrana de RO (invención)
Glucosa	25 g/l	24 g/l	25 g/l
Xilosa	12 g/l	11,2 g/l	12 g/l
Arabinosa	1 g/l	0,96 g/l	1 g/l
Manosa	1 g/l	0,98 g/l	1 g/l

5 (Ejemplo 2) Etapa de filtración de la solución acuosa de azúcar tratada hidrotérmicamente/tratada enzimáticamente a través de una membrana de nanofiltración o membrana de ósmosis inversa

10 En términos de la etapa de filtración de la solución acuosa de azúcar obtenida en el ejemplo de referencia 4 a través de una membrana de nanofiltración o membrana de ósmosis inversa y recoger un líquido que contiene azúcar purificado desde el lado de alimentación, mientras se eliminan sustancias que inhiben la fermentación desde el lado del permeado, se obtuvo un líquido que contiene azúcar purificado de la misma manera que en el ejemplo 1, y se cuantificaron las concentraciones de sustancias que inhiben la fermentación y monosacáridos. Los resultados se resumen en las tablas 9 y 10. Se demostró mediante el análisis que, como sustancias que inhiben la fermentación, estaban contenidos ácido acético, ácido fórmico, furfural, HMF, vanilina, acetovanilina y ácido siríngico. Además, en términos de monosacáridos contenidos en los líquidos que contienen azúcar respectivos, glucosa y xilosa eran los componentes principales. Además, aunque las cantidades eran muy pequeñas, también se detectaron arabinosa y manosa.

[Tabla 9]

20

Tabla 9 Cuantificación de sustancias que inhiben la fermentación

	Solución acuosa de azúcar	Líquido que contiene azúcar purificado a través de membrana de NF (referencia)	Líquido que contiene azúcar purificado a través de membrana de RO (invención)
Ácido fórmico	0,1 g/l	0 g/l	0 g/l
Ácido acético	0,5 g/l	0 g/l	0,2 g/l
HMF	10 mg/l	1 mg/l	6 mg/l
Furfural	15 mg/l	0 mg/l	3 g/l
Vanilina	3 mg/l	0 mg/l	1 mg/l
Acetovanilina	13 mg/l	1 mg/l	3 mg/l
Ácido siríngico	1 mg/l	0 mg/l	0 mg/l

[Tabla 10]

25

Tabla 10 Cuantificación de monosacáridos

	Solución acuosa de azúcar	Líquido que contiene azúcar purificado a través de membrana de NF (referencia)	Líquido que contiene azúcar purificado a través de membrana de RO (invención)
Glucosa	50 g/l	49 g/l	50 g/l
Xilosa	8 g/l	7,2 g/l	8 g/l
Arabinosa	1 g/l	0,96 g/l	1 g/l
Manosa	0,5 g/l	0,48 g/l	0,5 g/l

30 Se confirmó que los líquidos que contienen azúcar purificados respectivos tenían cantidades reducidas en gran medida de sustancias que inhiben la fermentación en comparación con la solución acuosa de azúcar obtenida en el ejemplo de referencia 4. Por otro lado, dado que las concentraciones de azúcares no disminuían en gran medida en los líquidos que contienen azúcar purificados, podía confirmarse que el procesamiento de la solución acuosa de azúcar a través de la membrana de ósmosis inversa permite la eliminación de sustancias que inhiben la fermentación como permeado, mientras permite la recuperación de un líquido que contiene azúcar purificado, en el que las concentraciones de sustancias que inhiben la fermentación disminuyen, desde el lado de alimentación.

35 (Ejemplo 3) Etapa de filtración de la solución acuosa de azúcar tratada con amoníaco/tratada enzimáticamente a través de una membrana de nanofiltración o membrana de ósmosis inversa

En términos de la etapa de filtración de la solución acuosa de azúcar obtenida en el ejemplo de referencia 5 a través

de una membrana de nanofiltración o membrana de ósmosis inversa y recoger un líquido que contiene azúcar purificado desde el lado de alimentación, mientras se eliminan sustancias que inhiben la fermentación desde el lado del permeado, se obtuvo un líquido que contiene azúcar purificado de la misma manera que en el ejemplo 1, y se cuantificaron las concentraciones de sustancias que inhiben la fermentación y monosacáridos. Los resultados se resumen en las tablas 11 y 12. Se demostró mediante el análisis que, como sustancias que inhiben la fermentación, estaban contenidos ácido acético, ácido fórmico, furfural, HMF, vanilina, acetovanilina y ácido siríngico. Además, en términos de monosacáridos contenidos en los líquidos que contienen azúcar respectivos, glucosa y xilosa eran los componentes principales. Además, aunque las cantidades eran muy pequeñas, también se detectaron arabinosa y manosa.

[Tabla 11]

Tabla 11 Cuantificación de sustancias que inhiben la fermentación

	Solución acuosa de azúcar	líquido que contiene azúcar purificado a través de membrana de NF (referencia)	líquido que contiene azúcar purificado a través de membrana de RO (invención)
Ácido fórmico	1,1 g/l	0 g/l	0,3 g/l
Ácido acético	0,5 g/l	0 g/l	0,2 g/l
HMF	500 mg/l	10 mg/l	120 mg/l
Furfural	5 mg/l	0 mg/l	1 mg/l
Vanilina	20 mg/l	0,4 mg/l	12 mg/l
Acetovanilina	18 mg/l	1 mg/l	8 mg/l
Ácido siríngico	2 mg/l	0 mg/l	1 mg/l

[Tabla 12]

Tabla 12 Cuantificación de monosacáridos

	Solución acuosa de azúcar	líquido que contiene azúcar purificado a través de membrana de NF (referencia)	líquido que contiene azúcar purificado a través de membrana de RO (invención)
Glucosa	50 g/l	49 g/l	50 g/l
Xilosa	25 g/l	21 g/l	25g/l
Arabinosa	2 g/l	1,8 g/l	2 g/l
Manosa	1 g/l	0,9 g/l	1 g/l

Se confirmó que los líquidos que contienen azúcar purificados respectivos tenían cantidades reducidas en gran medida de sustancias que inhiben la fermentación en comparación con la solución acuosa de azúcar obtenida en el ejemplo de referencia 5. Por otro lado, dado que las concentraciones de azúcares no estaban disminuidas en gran medida, podía confirmarse que el procesamiento de la solución acuosa de azúcar a través de la membrana de RO permite la eliminación de sustancias que inhiben la fermentación como permeado, mientras permite la recuperación de un líquido que contiene azúcar purificado, en el que las concentraciones de sustancias que inhiben la fermentación disminuyen, desde el lado de alimentación.

(Ejemplo 5) Etapa de filtración del líquido tratado hidrotérmicamente a través de una membrana de nanofiltración o membrana de ósmosis inversa

En términos de la etapa de filtración del líquido tratado hidrotérmicamente obtenido en el ejemplo de referencia 4 a través de una membrana de nanofiltración o membrana de ósmosis inversa y recoger un líquido que contiene azúcar purificado desde el lado de alimentación, mientras se eliminan sustancias que inhiben la fermentación desde el lado del permeado, se obtuvo un líquido que contiene azúcar purificado de la misma manera que en el ejemplo 1, y se cuantificaron las concentraciones de sustancias que inhiben la fermentación y monosacáridos. Los resultados se resumen en las tablas 13 y 14. Se demostró mediante el análisis que, como sustancias que inhiben la fermentación, estaban contenidos ácido acético, ácido fórmico, furfural, HMF, vanilina, acetovanilina y ácido siríngico. Además, en términos de monosacáridos contenidos en los líquidos que contienen azúcar respectivos, glucosa y xilosa eran los componentes principales. Además, aunque las cantidades eran muy pequeñas, también se detectaron arabinosa y manosa.

[Tabla 13]

Tabla 13 Cuantificación de sustancias que inhiben la fermentación

	Solución acuosa de azúcar	líquido que contiene azúcar purificado a través de membrana de NF (referencia)	líquido que contiene azúcar purificado a través de membrana de RO (invención)
Ácido fórmico	1,1 g/l	0 g/l	0,3 g/l
Ácido acético	2,2 g/l	0 g/l	0,2 g/l
HMF	139 mg/l	1 mg/l	6 mg/l
Furfural	8 mg/l	0 mg/l	3 mg/l
Vanilina	50 mg/l	1,2 mg/l	31 mg/l
Acetovanilina	2 mg/l	0 mg/l	1 mg/l
Ácido síringico	1 mg/l	0 mg/l	0 mg/l

5 [Tabla 14]

Tabla 14 Cuantificación de monosacáridos

	Solución acuosa de azúcar	líquido que contiene azúcar purificado a través de membrana de NF (referencia)	líquido que contiene azúcar purificado a través de membrana de RO (invención)
Glucosa	2 g/l	1,8 g/l	2 g/l
Xilosa	15 g/l	13 g/l	15 g/l
Arabinosa	0,5 g/l	0,48 g/l	0,5 g/l
Manosa	0,5 g/l	0,48 g/l	0,5 g/l

10 Se confirmó que los líquidos que contienen azúcar purificados respectivos tenían cantidades reducidas en gran medida de sustancias que inhiben la fermentación en comparación con el líquido tratado hidrotérmicamente obtenido en el ejemplo de referencia 4. Por otro lado, dado que las concentraciones de azúcares no disminuían en gran medida en los líquidos que contienen azúcar purificados, podía confirmarse que el procesamiento de la solución acuosa de azúcar a través de la membrana de RO permite la eliminación de sustancias que inhiben la fermentación como permeado, mientras permite la recuperación de un líquido que contiene azúcar purificado, en el que las  
15 concentraciones de sustancias que inhiben la fermentación disminuyen, desde el lado de alimentación.

(Ejemplo 6) Etapa de filtración de los líquidos que contienen azúcar modelo a través de una membrana de nanofiltración o membrana de ósmosis inversa

20 Como líquidos que contienen azúcar modelo para la solución acuosa de azúcar preparada mediante hidrólisis de una biomasa, se prepararon uno que contenía azúcares a altas concentraciones (solución acuosa de azúcar modelo A) y uno que contenía azúcares a bajas concentraciones (solución acuosa de azúcar modelo B). Sus composiciones se muestran en las tablas 15 y 16.

25 [Tabla 15]

Tabla 15 Composiciones de líquidos que contienen azúcar modelo (monosacáridos)

	Glucosa	Xilosa
Solución acuosa de azúcar modelo A	40 g/l	20 g/l
Solución acuosa de azúcar modelo B	2 g/l	1 g/l

[Tabla 16]

30 Tabla 16 Composiciones de líquidos que contienen azúcar modelo (sustancias que inhiben la fermentación)

	Ácido fórmico	Ácido acético	HMF	Furfural	Vanilina
Solución acuosa de azúcar modelo A	2 g/l	2 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l
Solución acuosa de azúcar modelo B	2 g/l	2 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l

35 Los pH de los líquidos que contienen azúcar modelo A y B se ajustaron utilizando ácido sulfúrico o hidróxido sódico a 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7, y los líquidos se filtraron de la misma manera que en el ejemplo 1, seguido de la cuantificación de las concentraciones de sustancias que inhiben la fermentación y azúcares contenidos en los permeados mediante el procedimiento descrito en el ejemplo de referencia 1. Los resultados se muestran en las tablas 17 a 20. Las tasas de penetración de monosacáridos eran diferentes entre los líquidos modelo A y B, pero no diferentes entre los diferentes pH. Además, las tasas de penetración de sustancias que inhiben la fermentación eran diferentes entre los diferentes pH, pero no diferentes entre los líquidos que contienen azúcar modelo A y B.

40

[Tabla 17]

Tabla 17 Comparación de las tasas de penetración de azúcares a través de la membrana de nanofiltración 1

	Glucosa	Xilosa
Solución acuosa de azúcar modelo A	10%	15%
Solución acuosa de azúcar modelo B	3%	5%

5 [Tabla 18]

Tabla 18 Comparación de las tasas de penetración de sustancias que inhiben la fermentación a través de la membrana de nanofiltración a diferentes pH (referencia)

	Ácido fórmico	Ácido acético	HMF	Furfural	Vanilina
pH 0,5	La obstrucción de la membrana impedía la penetración del líquido				
pH 1,0	100%	100%	98%	98%	96%
pH 2,0	100%	100%	98%	98%	96%
pH 3,0	100%	100%	98%	98%	96%
pH 4,0	99%	99%	98%	98%	96%
pH 5,0	90%	88%	98%	98%	96%
pH 6,0	55%	48%	100%	100%	100%
pH 7,0	50%	45%	100%	100%	100%

10 [Tabla 19]

Tabla 19 Comparación de las tasas de penetración de azúcares a través de la membrana de ósmosis inversa (invención)

	Glucosa	Xilosa
Solución acuosa de azúcar modelo A	0,2%	0,4%
Solución acuosa de azúcar modelo B	0%	0%

15 [Tabla 20]

Tabla 20 Comparación de las tasas de penetración de sustancias que inhiben la fermentación a través de la membrana de ósmosis inversa a diferentes pH (invención)

	Ácido fórmico	Ácido acético	HMF	Furfural	Vanilina
pH 0,5	La obstrucción de la membrana impedía la penetración del líquido				
pH 1,0	85%	55%	25%	55%	15%
pH 2,0	85%	52%	25%	55%	15%
pH 3,0	80%	50%	25%	55%	15%
pH 4,0	50%	25%	25%	55%	15%
pH 5,0	30%	15%	25%	55%	15%
pH 6,0	5%	0%	25%	55%	15%
pH 7,0	0%	0%	25%	55%	15%

20 A partir de los resultados anteriores, se descubrió que la membrana de ósmosis inversa pueden incrementar las concentraciones de monosacáridos mientras se eliminan sustancias que inhiben la fermentación en el lado del filtrado. Además, se descubrió que la tasa de pérdida de monosacáridos en el lado del filtrado se incrementa en la membrana de nanofiltración en los casos en los que la concentración de azúcar es alta, mientras que la pérdida de azúcares apenas ocurre en la membrana de ósmosis inversa incluso en dichos casos. Además, se descubrió que las

25 tasas de eliminación de ácidos orgánicos varían en gran medida dependiendo del pH.

(Ejemplo 7) Etapa de filtración de la solución acuosa de azúcar tratada hidrotérmicamente/tratada enzimáticamente a través de una membrana de ósmosis inversa (efecto de supresión del ensuciamiento mediante ajuste del pH)

30 Se investigó el efecto de supresión del ensuciamiento mediante ajuste del pH sobre la solución acuosa de azúcar obtenida en el ejemplo de referencia 4. Diez litros de la solución acuosa de azúcar obtenida en el ejemplo de referencia 4 se filtraron a través de una membrana de microfiltración (fabricada por Millipore; tamaño de poro, 0,45 μm; membrana de PVDF). La turbidez no era mayor de 1 NTU en este momento. La filtración se llevó a cabo adicionalmente utilizando una membrana de ultrafiltración (GE SEPA serie PW; poliétersulfona; límite de peso

35 molecular, 10.000). Seguidamente, el filtrado se dividió en alcuotas en volúmenes de 2 l, y cada una de estas alcuotas se preparó con ácido sulfúrico o amoníaco de modo que el pH se volvió 1, 2, 3, 5 ó 7, seguido por filtración a través de una membrana de ósmosis inversa de la misma manera que en el ejemplo 1 hasta que el volumen restante en el tanque de líquido sin procesar disminuyó a 0,5 l (concentración 4 veces). La cantidad de flujo durante la recogida del permeado se calculó en base a las diferencias en los cambios en la cantidad total del permeado con

40 el tiempo. Los resultados del cálculo del flujo se muestran en la figura 3. Como resultado, a un pH de 1, el flujo era

muy pequeño y la filtración requirió un largo periodo y, a un pH de 7, se produjo una notable disminución del flujo en el medio de la operación. También a pH de 2, 3 y 5, se observó una disminución del flujo desde aproximadamente 1,5 horas después, y se supuso que esto se debía al incremento de la concentración de azúcar, conduciendo a un drástico incremento de la presión osmótica. Las concentraciones de monosacáridos y sustancias que inhiben la fermentación en la solución acuosa de azúcar y líquidos que contienen azúcar purificados eran tal como se muestra en las tablas 21 y 22, y pudo confirmarse que, aunque los monosacáridos se concentraron a la proporción de concentración correspondiente, los niveles de concentración de las sustancias que inhiben la fermentación eran bajos, de modo que se pudo confirmar la eliminación de las sustancias que inhiben la fermentación de la solución acuosa de azúcar.

[Tabla 21]

Tabla 21 Concentraciones de monosacáridos

	Solución acuosa de azúcar	Líquido que contiene azúcar purificado (filtración a pH 3)	Líquido que contiene azúcar purificado (filtración a pH 7)
Glucosa	50 g/l	200 g/l	200 g/l
Xilosa	8 g/l	32 g/l	32 g/l

[Tabla 22]

Tabla 22 Cuantificación de sustancias que inhiben la fermentación

	Solución acuosa de azúcar	Líquido que contiene azúcar purificado (filtración a pH 3)	Líquido que contiene azúcar purificado (filtración a pH 7)
Ácido fórmico	0,1 g/l	0,2 g/l	0,4 g/l
Ácido acético	0,5 g/l	1,2 g/l	2,0 g/l
Furfural	15 mg/l	35mg/l	35 mg/l
HMF	10 mg/l	30 mg/l	30 mg/l
Vanilina	3 mg/l	9 mg/l	9 mg/l
Acetovanilina	13 mg/l	45 mg/l	45 mg/l

(Ejemplo de referencia 6) Etapa de filtración del líquido tratado hidrotérmicamente a través de una membrana de nanofiltración (efecto de supresión de ensuciamiento mediante membrana de microfiltración/membrana de ultrafiltración)

El efecto de supresión de ensuciamiento mediante tratamiento por filtración, que se lleva a cabo antes de la concentración del líquido tratado hidrotérmicamente obtenido en el ejemplo de referencia 4 a través de una membrana de nanofiltración, se investigó mediante una prueba de aceleración utilizando un volumen reducido del líquido. Se prepararon tres tipos de líquidos, es decir, un líquido preparado simplemente centrifugando el líquido tratado hidrotérmicamente obtenido en el ejemplo de referencia 4 como está, un líquido tratado con una membrana de microfiltración (fabricada por Millipore; tamaño de poro, 0,45 µm; membrana de PVDF), y un líquido tratado con una membrana de ultrafiltración (GE SEPA serie PW; poliétersulfona; límite de peso molecular, 10.000), y sus pH se ajustaron a 3. La turbidez del líquido tratado por centrifugado era de 800 NTU, y las turbideces de ambos de los otros 2 tipos de líquidos no eran superiores a 1 NTU. Cada líquido en una cantidad de 2 l se filtró a través de una membrana de nanofiltración de la misma manera que en el ejemplo 1 hasta que el volumen restante en el tanque de líquido sin procesar disminuyó a 0,5 l, y la cantidad de flujo durante la recogida del permeado se calculó en base a las diferencias en los cambios en la cantidad total del permeado con el tiempo. Los resultados del cálculo del flujo se muestran en la figura 4. Como resultado, se demostró que, en el caso de tratamiento solamente con centrifugado, la turbidez era alta y el flujo disminuía drásticamente durante la concentración. Se supuso que esto se debía a la adhesión de componentes responsables de la turbidez a la membrana durante la concentración, dando como resultado una drástica disminución de la capacidad de filtración de la membrana.

(Ejemplo 8) Identificación de componentes de ensuciamiento

El líquido tratado hidrotérmicamente obtenido en el ejemplo de referencia 4 se aireó y se lavó, mientras se llevaba a cabo la microfiltración, y la membrana resultante se secó al vacío y se observó con un aparato de microscopio electrónico de barrido (fabricado por Hitachi High-Technologies Corporation, S-4800). Además, el análisis de los componentes se llevó a cabo utilizando un analizador de rayos X por dispersión de energía (fabricado por HORIBA, Ltd., EX-250) fijado al aparato de microscopio electrónico de barrido. Como resultado, sobre la membrana de microfiltración, se observaron muchos depósitos de gel y partículas que tenían tamaños del orden de varios nanómetros a varios micrómetros, tal como se muestra en la figura 5. Estos componentes se sometieron a análisis de la dispersión de los componentes, en el modo de cartografía del analizador de rayos X por dispersión de energía,

y grandes cantidades de Si (silicio) y O (oxígeno) se detectaron en las posiciones de las partículas (figura 6). Se supuso que estas materias particuladas eran SiO<sub>2</sub> (sílice). Además, como los componentes de gel alrededor de las partículas, se observaron C (carbono) y O (oxígeno). Por lo tanto, se consideró que los depósitos de gel eran celulosa no descompuesta, lignina y similares. Además, el filtrado obtenido mediante la microfiltración se filtró a través de una membrana de ultrafiltración, y la membrana de ultrafiltración se lavó ligeramente con agua de RO. La membrana de ultrafiltración se secó a continuación al vacío y se sometió solamente a análisis elemental mediante un analizador de rayos X por dispersión de energía utilizando un microscopio electrónico de barrido que aplica un voltaje de 20 kV a un aumento de  $\times 100$ , en 3 posiciones diferentes. Como resultado, se detectaron C (carbono) a un contenido del 72 al 77% y O (oxígeno) a un contenido del 20 al 25%. Por lo tanto, en términos de los componentes eliminados, se supuso que polisacáridos solubles en agua, tanino, polifenol y similares se acumulan sobre la membrana de ultrafiltración y se eliminan.

(Ejemplo 9) Recuperación de enzimas

Se describe un ejemplo de recuperación de enzimas de la solución acuosa de azúcar obtenida en el ejemplo de referencia 1 anterior. Para la recuperación de las enzimas, se colocó una membrana de ultrafiltración de poliétersulfona (diámetro, 44,5 mm; Millipore) que tenía un límite de peso molecular de 10.000 en un aparato Stirred Cells Series 8000 (Millipore), y la filtración a presión se llevó a cabo utilizando un cilindro de nitrógeno gaseoso. En la filtración a presión, 50 ml del líquido que contiene azúcar obtenido en el ejemplo 1 se introdujeron al lado de alimentación, y 45 ml del líquido se eliminaron como un permeado. Se midió la concentración de enzima (concentración de proteína) en 5 ml del líquido que contiene azúcar que quedaba en el lado de alimentación. La concentración de enzima se midió por colorimetría utilizando el kit de medición BCA (BCA Protein Assay Regent kit, fabricado por PIERCE) mediante medición de la absorbancia a 562 nm utilizando albúmina bovina (2 mg/ml) como muestra estándar. Como resultado, tomando la concentración de enzima inicial antes de la alimentación del líquido como el 100%, podía confirmarse que la concentración de enzima en el líquido recuperado en el ejemplo de referencia 1 estaba dentro del intervalo del 10-60% como valor relativo.

(Ejemplo 10) Cambios en la capacidad para eliminar sustancias que inhiben la fermentación dependiendo de la temperatura de la solución acuosa de azúcar

Una etapa de filtración de la solución acuosa de azúcar tratada con amoníaco/tratada enzimáticamente obtenida en el ejemplo de referencia 5 a través de una membrana de microfiltración y una membrana de ultrafiltración, y a continuación filtrar adicionalmente la solución a través de una membrana de ósmosis inversa, seguida de la recuperación de una solución de azúcar purificada desde el lado de alimentación y eliminar sustancias que inhiben la fermentación desde el lado del permeado, se describe por medio de un ejemplo. A través de una membrana de microfiltración (fabricada por Millipore; tamaño de poro, 0,45  $\mu\text{m}$ ; membrana de PVDF), se filtraron 4 l de la solución acuosa de azúcar obtenida en el ejemplo de referencia 5. La turbidez no era mayor de 1 NTU en este momento. La filtración se llevó a cabo adicionalmente utilizando una membrana de ultrafiltración (GE SEPAG PW series; poliétersulfona; límite de peso molecular, 10.000). Esta solución acuosa de azúcar se ajustó con ácido sulfúrico a pH 3, y una alícuota de 2 l de la solución resultante se filtró a una temperatura de la solución acuosa de azúcar de 25°C o 50°C a través de una membrana de ósmosis inversa de la misma manera que en el ejemplo 1 hasta que el volumen restante en el tanque de líquido sin procesar disminuyó a 0,5 l, seguido por recuperar el permeado. En el momento en el que se completó la filtración, se añadió agua de RO a cada líquido para conseguir un volumen final de 2 l, proporcionando de este modo un líquido que contiene azúcar purificado. Las concentraciones de sustancias que inhiben la fermentación en los líquidos que contienen azúcar purificados en los casos de temperaturas de la solución acuosa de azúcar de 25°C y 50°C eran tal como se muestra en la tabla 23. La temperatura incrementada de la solución acuosa de azúcar mejoraba la capacidad de eliminación de sustancia que inhibe la fermentación. Se supuso que esto se debía al incremento del tamaño de poro de la membrana causado por la temperatura incrementada de la solución acuosa de azúcar.

[Tabla 23]

Tabla 23 Cambios en la capacidad de eliminación de sustancia que inhibe la fermentación dependiendo de la temperatura de la solución acuosa de azúcar

	Antes del tratamiento de la solución acuosa de azúcar	Tratamiento de la solución acuosa de azúcar a 25°C	Tratamiento de la solución acuosa de azúcar a 50°C
Ácido fórmico	1,1 g/l	0,6 g/l	0,2 g/l
Ácido acético	0,5 g/l	0,3 g/l	0,1 g/l
Furfural	5 mg/l	3 mg/l	1 mg/l
Vanilina	20 mg/l	16 mg/l	10 mg/l
Acetovanilina	18 mg/l	16 mg/l	12 mg/l
Ácido siríngico	2 mg/l	1,9 mg/l	1,2 mg/l

55

(Ejemplo de referencia 7) Cambios en el nivel de supresión de la pérdida de monosacáridos dependiendo de la temperatura de la solución acuosa de azúcar

5 Se describe por medio de un ejemplo una etapa de filtración de la solución acuosa de azúcar tratada con amoníaco/tratada enzimáticamente obtenida en el ejemplo de referencia 5 a través de una membrana de microfiltración y una membrana de ultrafiltración, y a continuación filtrar adicionalmente la solución a través de una membrana de nanofiltración, seguida por recuperar una solución de azúcar purificada desde el lado de alimentación y eliminar sustancias que inhiben la fermentación desde el lado del permeado. A través de una membrana de microfiltración (fabricada por Millipore; tamaño de poro, 0,45 µm; membrana de PVDF), se filtraron 4 l de la solución acuosa de azúcar obtenida en el ejemplo de referencia 5. La turbidez no era mayor de 1 NTU en este momento. La filtración se llevó a cabo adicionalmente utilizando una membrana de ultrafiltración (GE SEPA serie PW; poliétersulfona; límite de peso molecular, 10.000; fabricada por GE Osmonics). Esta solución acuosa de azúcar se ajustó con ácido sulfúrico a pH 3, y una alícuota de 2 l de la solución resultante se filtró a una temperatura de la solución acuosa de azúcar de 25°C o 10°C a través de una membrana de nanofiltración de la misma manera que en el ejemplo 1 hasta que el volumen restante en el tanque de líquido sin procesar disminuyó a 0,5 l, seguido de la recuperación del permeado. En el momento en el que se completó la filtración, se añadió agua de RO a cada líquido para conseguir un volumen final de 2 l, proporcionando de este modo un líquido que contiene azúcar purificado. Las concentraciones de azúcares en los líquidos que contienen azúcar purificados en los casos de temperaturas de la solución acuosa de azúcar de 25°C y 10°C eran tal como se muestra en la tabla 24, lo que indicaba que la disminución de la temperatura disminuía la pérdida de los azúcares. Se supuso que esto se debía a la disminución del tamaño de poro de la membrana causada por la disminución de la temperatura de la solución acuosa de azúcar.

[Tabla 24]

25 Tabla 24 Pérdida de azúcares dependiendo de la temperatura de la solución acuosa de azúcar

	Antes del tratamiento de la solución acuosa de azúcar	Tratamiento de la solución acuosa de azúcar a 25°C	Tratamiento de la solución acuosa de azúcar a 10°C
Glucosa	50 g/l	44 g/l	50 g/l
Xilosa	25 g/l	21 g/l	25 g/l
Arabinosa	2 g/l	1,8 g/l	2 g/l
Manosa	1 g/l	0,8 g/l	1 g/l

(Ejemplo 11) Ejemplos de producción de líquidos que contienen azúcar purificados utilizando diversas membranas de ósmosis inversa

30 La solución acuosa de azúcar obtenida en el ejemplo de referencia 5 se filtró a través de una membrana de microfiltración (fabricada por Millipore; tamaño de poro, 0,45 µm; membrana de PVDF). La turbidez no era mayor de 1 NTU en este momento. La filtración se llevó a cabo adicionalmente utilizando una membrana de ultrafiltración (GE SEPA serie PW; poliétersulfona; límite de peso molecular, 10.000). El filtrado se ajustó con ácido sulfúrico a pH 3, y partes alícuotas de 20 l del líquido resultante se trataron de la misma manera que en el ejemplo 1 con membranas de ósmosis inversa. Como membranas de ósmosis inversa, se utilizaron una membrana de ósmosis inversa de poliamida completamente aromática reticulada UTC80 (membrana de ósmosis inversa 1, fabricada por TORAY INDUSTRIES, INC.), una membrana preparada empapando la membrana de ósmosis inversa de poliamida completamente aromática reticulada UTC80 en un líquido con enzima celulasa Novozyme 188 (Preparación de β-glucosidasa derivada de *Aspergillus niger*, Sigma Aldrich Japón) a 50°C durante 1 día y lavando la membrana resultante con agua de RO (membrana de ósmosis inversa 2), una membrana de ósmosis inversa de poliamida DESAL-3B (membrana de ósmosis inversa 3; fabricada por DESAL), una membrana de ósmosis inversa de acetato de celulosa GE SEPA CE (membrana de ósmosis inversa 4, fabricada por GE Osmonics) (ejemplo comparativo), y una membrana preparada empapando la membrana de ósmosis inversa de acetato de celulosa GE SEPA CE (fabricada por GE Osmonics) en un líquido con enzima celulasa Novozyme 188 (Preparación de β-glucosidasa derivada de *Aspergillus niger*, Sigma Aldrich Japón) a 50°C durante 1 día y lavando la membrana resultante con agua de RO (membrana de ósmosis inversa 5), y cada permeado se recuperó hasta que el volumen del líquido sin procesar disminuyó hasta una cuarta parte del volumen inicial.

50 Agua de RO en la misma cantidad que el permeado se introdujo en el líquido concentrado en el tanque de líquido sin procesar, y las concentraciones de sustancias que inhiben la fermentación contenidas en el tanque de líquido sin procesar y el permeado se analizaron mediante HPLC (fabricada por Shimadzu Corporation), calculando de este modo las tasas de penetración de las sustancias que inhiben la fermentación (ácido acético, ácido fórmico, HMF, furfural, vanilina, acetovanilina y ácido siríngico) y las tasas de penetración de los monosacáridos (glucosa y xilosa). Los resultados indicaban que los monosacáridos y las sustancias que inhiben la fermentación podían bloquearse con cualquiera de las membranas de ósmosis inversa y que, en particular, las membranas de ósmosis inversa 1 y 2, es decir, las membranas de ósmosis inversa de poliamida y poliamida completamente aromática reticulada, tienen bajas tasas de penetración de monosacáridos, mientras que tienen altas tasas de penetración de sustancias que inhiben la fermentación. Se reveló, además, que las membranas de acetato de celulosa son menos resistentes a la celulasa (tablas 25 y 26).

[Tabla 25]

Tabla 25 Comparación de las tasas de penetración de sustancias que inhiben la fermentación a través de diversas membranas de filtración inversa

	Ácido acético	Ácido fórmico	HMF	Furfural	Vanilina	Acetovanilina	Ácido siríngico
Membrana de ósmosis inversa 1	50%	80%	25%	55%	15%	10%	10%
Membrana de ósmosis inversa 2	50%	80%	25%	55%	15%	10%	10%
Membrana de ósmosis inversa 3	45%	75%	20%	55%	15%	10%	10%
Membrana de ósmosis inversa 4	30%	50%	5%	15%	5%	0%	0%
Membrana de ósmosis inversa 5	99%	99%	99%	99%	95%	92%	85%

5

[Tabla 26]

Tabla 26 Comparación de las tasas de penetración de monosacáridos a través de diversas membranas de filtración por ósmosis inversa

	Glucosa	Xilosa
Membrana de ósmosis inversa 1	0,1%	0%
Membrana de ósmosis inversa 2	0,1%	0%
Membrana de ósmosis inversa 3	0,2%	0,1%
Membrana de ósmosis inversa 4	1,0%	2,0%
Membrana de ósmosis inversa 5	75%	85%

10

(Ejemplo 12) Comparación de efectos para concentrar monosacáridos y sustancias que inhiben la fermentación

Para comparar los efectos para concentrar monosacáridos y sustancias que inhiben la fermentación, los grados de concentración de monosacáridos y sustancias que inhiben la fermentación se compararon entre casos de filtración de la solución acuosa de azúcar a través de una membrana de nanofiltración y/o membrana de ósmosis inversa. Después de preparar 60 l de la solución acuosa de azúcar tratada con amoníaco/tratada enzimáticamente obtenida en el ejemplo de referencia 5 a pH 3 con amoníaco acuoso y ácido sulfúrico, la solución resultante se filtró a través de una membrana de microfiltración. La solución se filtró adicionalmente a través de una membrana de ultrafiltración. La turbidez no era mayor de 0,5 NTU en este momento. El filtrado se dividió en 3 partes alícuotas (de 20 l cada una), y se trató solamente con una membrana de nanofiltración hasta que el volumen en el lado del líquido sin procesar disminuyó a 5 l (concentración 4 veces); se trató con una membrana de nanofiltración hasta que el volumen en el lado del líquido sin procesar disminuyó a 10 l (concentración 2 veces), seguido por tratamiento con una membrana de ósmosis inversa hasta que el volumen en el lado del líquido sin procesar disminuyó a 5 l (concentración adicional 2 veces: un total de concentración 4 veces), o se trató solamente con una membrana de ósmosis inversa hasta que el volumen en el lado del líquido sin procesar disminuyó a 5 l (concentración 4 veces); de la misma manera que en el ejemplo 7. Como membrana de nanofiltración, se utilizó una membrana de nanofiltración de poliamida de piperazina reticulada UTC60 (membrana de nanofiltración 1, fabricada por TORAY INDUSTRIES, INC.) y, como membrana de ósmosis inversa, se utilizó una membrana de ósmosis inversa de poliamida completamente aromática reticulada UTC80 (membrana de ósmosis inversa 1, fabricada por TORAY INDUSTRIES, INC.).

30

La tabla 27 muestra los resultados del análisis de las concentraciones de monosacáridos y sustancias que inhiben la fermentación contenidas en el líquido que contiene azúcar purificado, análisis que se llevó a cabo mediante HPLC en las condiciones mostradas en el ejemplo de referencia 1. Debajo de cada una de las concentraciones mostradas en la tabla, se muestra la concentración esperada cuando el líquido se diluye más tarde, de modo que se consiga una concentración de glucosa de 50 g/l. Como resultado, se reveló que los grados de concentración de las sustancias que inhiben la fermentación eran inferiores que los grados de concentración de los monosacáridos, y que el rendimiento de eliminación de sustancia que inhibe la fermentación por concentración de glucosa unitaria era el más alto en el caso del tratamiento con membrana de nanofiltración, seguido por el caso del tratamiento con membrana de nanofiltración y el posterior tratamiento con membrana de ósmosis inversa, y el caso del tratamiento con membrana de ósmosis inversa, en ese orden. Por otro lado, utilizando la membrana de nanofiltración y la membrana de ósmosis inversa en combinación, la pérdida de azúcares en el lado del filtrado de una membrana de nanofiltración, que se produce notablemente en los casos en los que la concentración de azúcar es de hasta no menos de 100 g/l, podía reducirse, y el rendimiento de eliminación de sustancia que inhibe la fermentación mejoraba en gran medida en comparación con el caso de tratamiento solamente con una membrana de ósmosis inversa.

45

[Tabla 27]

Tabla 27 Cuantificación de monosacáridos y sustancias que inhiben la fermentación

	Solución acuosa de azúcar	tratada con membrana de NF	tratada con membrana de NF/membrana de RO	tratada con membrana de RO
Glucosa	50 g/l	160 g/l (50 g/l)	195 g/l (50 g/l)	200 g/l (50 g/l)
Xilosa	25 g/l	79 g/l (25 g/l)	96 g/l (50 g/l)	100 g/l (50 g/l)
Arabinosa	2 g/l	6 g/l (1,9 g/l)	7,6 g/l (1,9 g/l)	8 g/l (2 g/l)
Manosa	1 g/l	3,0 g/l (0,9 g/l)	3,2 g/l (0,9 g/l)	3,8 g/l (1 g/l)
Ácido fórmico	1,1 g/l	1,0 g/l (0,3 g/l)	1,3 g/l (0,3 g/l)	2,0 g/l (0,5 g/l)
Ácido acético	0,5 g/l	0,4 g/l (0,1 g/l)	0,7 g/l (0,2 g/l)	1,2 g/l (0,3 g/l)
HMF	0 mg/l	0 mg/l (0 mg/l)	0 mg/l (0 mg/l)	0 mg/l (0 mg/l)
Furfural	5 mg/l	4 mg/l (1,3 mg/l)	7 mg/l (1,8 mg/l)	12 mg/l (3 mg/l)
Vanilina	20 mg/l	18 mg/l (5,6 mg/l)	30 mg/l (7,7 mg/l)	60 mg/l (15 mg/l)
Acetovanilina	18 mg/l	18 mg/l (5,6 mg/l)	26 mg/l (6,7 mg/l)	70 mg/l (17 mg/l)
Ácido siríngico	2 mg/l	2 mg/l (0,6 mg/l)	4 mg/l (1,0 mg/l)	8 mg/l (2,0 mg/l)

5 (Ejemplo 13) Ejemplos de producción de líquidos que contienen azúcar purificados utilizando membranas de ósmosis inversa de tipo de presión baja/presión ultrabaja

10 Para comparar los efectos para concentrar monosacáridos y sustancias que inhiben la fermentación entre diferentes tipos de membranas de ósmosis inversa, un líquido que contiene azúcar modelo se filtró a través de membranas de ósmosis inversa que tienen diferentes caudales de penetración de la misma manera que en el ejemplo 6. Las composiciones de líquidos que contienen azúcar modelo de la solución acuosa de azúcar preparados mediante hidrólisis de biomasa se muestran en la tabla 28.

[Tabla 28]

15

Tabla 28 Composición del líquido que contiene azúcar modelo

	Glucosa	Xilosa	Ácido acético
Solución acuosa de azúcar modelo	40 g/l	20 g/l	2 g/l

20 Como membranas de ósmosis inversa, se utilizaron BW-30 fabricada por Filmtec Corporation (membrana de ósmosis inversa 6) y SU-700 fabricada por TORAY INDUSTRIES, INC. (membrana de ósmosis inversa 7), que son membranas de tipo de presión baja; TFC-ULP fabricada por KOCH (membrana de ósmosis inversa 8) y SUL-G10 fabricada por TORAY INDUSTRIES, INC. (membrana de ósmosis inversa 9), que son membranas de tipo de presión ultrabaja; y DESAL-3B fabricada por DESAL (membrana de ósmosis inversa 10), que es una membrana de tipo de presión media para referencia. Los caudales de penetración de cloruro sódico (500 mg/l) por área unitaria de membrana ( $m^3/m^2/día$ ) observados a una presión de filtración de 0,75 MPa a pH 6,5 para las respectivas membranas se muestran en la tabla 29.

25

[Tabla 29]

Tabla 29 Valores de caudales de penetración de respectivas membranas de ósmosis inversa

	Caudal de penetración ( $m^3/m^2/D$ )
Membrana de ósmosis inversa 6	0,51
Membrana de ósmosis inversa 7	0,51
Membrana de ósmosis inversa 8	0,9
Membrana de ósmosis inversa 9	0,8
Membrana de ósmosis inversa 10	0,27

30

Líquidos que contienen azúcar modelo A y B cuyos pH se ajustaron con ácido sulfúrico o hidróxido sódico a 2, 3, 4,

5, 6 ó 7 se filtraron de la misma manera que en el ejemplo 1, y las concentraciones de ácido acético, que es una sustancia que inhibe la fermentación, y azúcares contenidos en el permeado se cuantificaron mediante el procedimiento descrito en el ejemplo de referencia 1. Los resultados se muestran en las tablas 30 y 31. La tasa de penetración de ácido acético variaba dependiendo del pH, y la pérdida de azúcares tendía a ser menor en el tipo de presión baja que en el tipo de presión ultrabaja, aunque la diferencia era muy pequeña. A partir de estos resultados, se reveló que las membranas de ósmosis inversa de tipo de presión baja/presión ultrabaja son excelentes en el rendimiento de eliminación de ácidos orgánicos y pueden eliminar de forma eficiente sustancias que inhiben la fermentación incluso en los casos en los que el pH del líquido sin procesar es mayor de 3.

10 [Tabla 30]

Tabla 30 Comparación de las tasas de penetración de ácido acético a través de respectivas membranas de ósmosis inversa a diferentes pH

	Membrana de ósmosis inversa 6	Membrana de ósmosis inversa 7	Membrana de ósmosis inversa 8	Membrana de ósmosis inversa 9	Membrana de ósmosis inversa 10
pH 2,0	78%	80%	99%	99%	45%
pH 3,0	60%	65%	82%	78%	45%
pH 4,0	45%	50%	60%	58%	25%
pH 5,0	20%	20%	35%	33%	15%
pH 6,0	5%	5%	10%	10%	0%
pH 7,0	0%	0%	5%	5%	0%

15 [Tabla 31]

Tabla 31 Comparación de las tasas de penetración de azúcares a través de respectivas membranas de ósmosis inversa

	Glucosa	Xilosa
Membrana de ósmosis inversa 6	0,5%	0,5%
Membrana de ósmosis inversa 7	0,5%	0,5%
Membrana de ósmosis inversa 8	1,0%	1,2%
Membrana de ósmosis inversa 9	0,8%	1,0%
Membrana de ósmosis inversa 10	0,2%	0,1%

20 Los procedimientos de producción de productos químicos utilizando el líquido que contiene azúcar purificado obtenido mediante la presente invención como materia prima de fermentación se describen a continuación con más detalle por medio de los ejemplos para ácido L-láctico, ácido D-láctico, etanol, cadaverina y ácido succínico. Sin embargo, los productos químicos producidos mediante la presente invención no están limitados a los siguientes ejemplos.

25 (Ejemplo de referencia 8) Procedimientos para medir concentraciones de productos químicos [ácido L-láctico, ácido D-láctico]

30 La concentración de ácido L-láctico o ácido D-láctico acumulados se confirmó midiendo la cantidad de ácido láctico mediante el procedimiento de HPLC.

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

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

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

35 Procedimiento de detección: conductividad eléctrica

Temperatura: 45°C

Además, la pureza óptica de ácido L-láctico se midió mediante el procedimiento de HPLC en las siguientes condiciones.

40 Columna: TSK-gel Enantio L1 (fabricada por Tosoh Corporation)

Fase móvil: solución acuosa de sulfato de cobre 1 mM

Caudal: 1,0 ml/min.

Procedimiento de detección: UV 254 nm

45 Temperatura: 30°C

Además, se calculó la pureza óptica del ácido L-láctico mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Pureza óptica (\%)} = 100 \times (L-D)/(L+D)$$

50

## ES 2 764 124 T3

En esta ecuación, L representa la concentración de ácido L-láctico, y D representa la concentración de ácido D-láctico. La pureza óptica del ácido D-láctico también se calculó de manera similar.

[Etanol]

5 La concentración de etanol acumulado se cuantificó mediante el procedimiento de cromatografía de gases. La evaluación se llevó a cabo mediante detección/cálculo utilizando un aparato Shimadzu GC-2010 capillary GC TC-1 (GL science) 15 metros L. x 0,53 mm de D.I., df 1,5 µm con un detector de ionización de llama de hidrógeno.

10 [Cadaverina]

La cadaverina se evaluó mediante el siguiente procedimiento de HPLC.

15 Columna utilizada: CAPCELL PAK C18 (fabricada por Shiseido Co., Ltd.)  
Fase móvil: solución acuosa de ácido fosfórico al 0,1% (p/p):acetonitrilo = 4,5:5,5  
Detección: UV 360 nm

20 Pretratamiento de la muestra: A 25 µl de la muestra que se analizará, se le añadieron 25 µl de 1,4-diaminobutano (0,03 M), 150 µl de hidrogenocarbonato sódico (0,075 M) y una solución de 2,4-dinitrofluorobenceno (0,2 M) en etanol como estándares internos, y la mezcla resultante se incubó a 37°C durante 1 hora.

En 1 ml de acetonitrilo, se disolvieron 50 µl de la solución de reacción anterior, y la solución resultante se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos, seguido por analizar 10 µl del sobrenadante mediante HPLC.

[Ácido succínico]

25 La medición de la concentración de ácido succínico acumulado se llevó a cabo mediante análisis utilizando HPLC (fabricado por Shimadzu Corporation; LC10A; monitor de RI: RID-10A; columna: Aminex HPX-87H). La temperatura de la columna se ajustó a 50°C. Después de equilibrar la columna con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N, se inyectó la muestra, y la elución se llevó a cabo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N para realizar el análisis.

30 (Ejemplo de referencia 9) Preparación de una cepa de levadura que tiene capacidad de producir ácido L-láctico

Una cepa de levadura que tiene capacidad de producir ácido L-láctico se preparó de la siguiente manera. Enlazando un gen LDH derivado del ser humano cadena abajo del promotor PDC1 en el genoma de la levadura, se preparó una cepa de levadura que tiene una capacidad de producir ácido L-láctico. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo utilizando La-Taq (fabricada por TAKARA BIO INC.) o KOD-Plus-polimerasa (fabricada por Toyobo Co. Ltd.) según las instrucciones adjuntas.

35 Se cultivó una línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7), y las células cultivadas se recogieron, seguido de la extracción de ARN utilizando el reactivo TRIZOL (fabricado por INVITROGEN) y llevar a cabo reacción de transcripción inversa utilizando el ARN obtenido como plantilla y el sistema SuperScript Choice System (fabricado por INVITROGEN), sintetizando de este modo ADNc. Para detalles de las respectivas operaciones, se siguieron las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido se utilizó como plantilla para la posterior amplificación por PCR.

45 Utilizando el ADNc obtenido mediante las operaciones anteriores como plantilla para amplificación, oligonucleótidos que tienen la secuencias mostradas en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 como conjunto de cebadores, y KOD-Plus-polimerasa (fabricada por Toyobo Co. Ltd.), se llevó a cabo la PCR para clonar el gen L-ldh. Cada fragmento amplificado por PCR se purificó, y se fosforiló en sus extremos con T4 Polinucleótido quinasa (fabricada por TAKARA BIO INC.), seguida por ligamiento en el vector pUC118 (que había sido digerido con la enzima de restricción HincII y desfosforilado en el sitio de escisión). El ligamiento se llevó a cabo utilizando el kit DNA Ligation Kit Ver. 2 (fabricado por TAKARA BIO INC.). *E. coli* DH5α se transformó con los productos del plásmido de ligamiento, y los ADN plasmídicos se recuperaron para obtener plásmidos en los que diversos genes L-ldh (SEQ ID NO:3) están subclonados. Los plásmidos pUC118 obtenidos en los que se insertan los genes L-ldh se digirieron con las enzimas de restricción *Xho*I y *Not*I para obtener fragmentos de ADN, cada uno de los cuales se insertó a continuación en el sitio de restricción *Xho*I/*Not*I del vector de expresión de levadura pTRS11 (figura 7). Por lo tanto, se obtuvo el plásmido pL-ldh5 que expresa el gen L-ldh derivado de ser humano (gen L-ldh). El pL-ldh5 descrito anteriormente, que es un plásmidos que expresa el gen L-ldh derivado de ser humano, se depositó en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) con el No. de entrada FERM AP-20421 (fecha de depósito: 21 de febrero 2005) en forma del propio plásmido.

40 Utilizando el plásmido pL-ldh5 que contiene el gen LDH derivado de ser humano como plantilla para amplificación, y oligonucleótidos que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5 como conjunto de cebadores, se llevó a cabo la PCR para amplificar un fragmento de ADN que contiene el gen LDH derivado de ser humano que tiene una longitud de 1,3 kb y la secuencia de terminación de un gen TDH3 derivado de

*Saccharomyces cerevisiae*. Además, utilizando el plásmido pRS424 como plantilla para amplificación, y oligonucleótidos que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7 como conjunto de cebadores, se llevó a cabo la PCR para amplificar un fragmento de ADN que contiene un gen TRP 1 derivado de *Saccharomyces cerevisiae* que tiene una longitud de 1,2 kb. Cada fragmento de ADN se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y se purificó según un procedimiento convencional. Utilizando una mezcla del fragmento de 1,3 kb y el fragmento de 1,2 kb obtenidos de este modo como plantilla para amplificación, y oligonucleótidos que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:7 como conjunto de cebadores, se llevó a cabo la PCR para obtener un producto, que a continuación se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, preparando de este modo un fragmento de ADN que tiene una longitud de 2,5 kb en el que el gen LDH derivado de ser humano y el gen TRP1 están enlazados. Con este fragmento de ADN que tiene una longitud de 2,5 kb, la cepa NBRC 10505 de la levadura gemante *Saccharomyces cerevisiae* se transformó en fototrofia de triptófano, según un procedimiento convencional.

La confirmación del hecho de que las células transformadas obtenidas tienen el gen LDH derivado de ser humano enlazado cadena abajo del promotor PDC1 en el genoma de la levadura se llevó a cabo de la siguiente manera. El ADN genómico de las células transformadas se preparó según un procedimiento convencional, y a continuación se llevó a cabo la PCR utilizando el ADN genómico preparado como plantilla para amplificación, y oligonucleótidos que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9 como conjunto de cebadores, para confirmar si se obtuvo un fragmento de ADN amplificado que tiene una longitud de 0,7 kb. Además, si las células transformadas tenían o no una capacidad para producir ácido láctico se confirmó cultivando las células transformadas en medio SC (METHODS IN YEAST GENETICS 2000 EDITION, CSHL PRESS) y confirmando si el sobrenadante del cultivo contenía o no ácido láctico midiendo la cantidad de ácido láctico mediante el procedimiento de HPLC.

Mediante el análisis por HPLC, se detectó ácido L-láctico a una concentración de 4 g/l, y la concentración de ácido D-láctico estaba por debajo del límite de detección. A partir de los estudios anteriores, se confirmó que este transformante tiene una capacidad de producir ácido L-láctico. Las células transformadas obtenidas se denominaron la cepa de levadura SW-1, y esta cepa se utilizó para la posterior fermentación ácido L-láctica.

(Ejemplo de referencia 10) fermentación ácido L-láctica (levadura)

La fermentación ácido L-láctica se llevó a cabo utilizando la cepa de levadura obtenida en el ejemplo de referencia 9 (SW-1). Al medio, se mezclaron glucosa como fuente de carbono, y medio con deficiencia selectiva sintético de levadura suplementado sin triptófano (Sigma Aldrich Japón, tabla 34, Drop-out MX), base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y sulfato de amonio (Difco, Yeast NTbase), y sulfato de amonio, como los otros componentes, en la proporción mostrada en la tabla 32. El medio se sometió a esterilización por filtración (Millipore, Stericup 0,22 µm) antes de utilizarlo en la fermentación. La concentración de glucosa se cuantificó utilizando Glucose Test Wako (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). La cantidad de ácido láctico producida en cada cultivo se midió mediante HPLC en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 8.

[Tabla 32]

Tabla 32 Composición del medio de fermentación ácido L-láctica

Composición	Concentración del componente
Glucosa	50 g/l
Drop-out MX	3,8 g/l
Yeast NTbase	1,7 g/l
Sulfato de amonio	5 g/l

La cepa SW-1 se cultivó en 5 ml de un medio de fermentación (medio de precultivo) en un tubo de ensayo con agitación durante una noche (precultivo). Se recogieron células de levadura del precultivo mediante centrifugado, y las células se lavaron bien con 15 ml de agua estéril. Las células de levadura lavadas se inocularon a 100 ml de los medios que tienen las composiciones descritas en la tabla 32, y se cultivaron en un matraz de Sakaguchi de 500 ml durante 40 horas con agitación (cultivo principal).

(Ejemplo de referencia 11) Procedimiento de fermentación ácido L-láctica (bacteria de ácido láctico)

El medio de fermentación bacteriana ácido L-láctica mostrado en la tabla 33 se esterilizó en autoclave (121°C, 15 minutos) y se utilizó como medio. Como bacteria del ácido láctico, se utilizó la cepa de *Lactococcus lactis* JCM 7638, que es un microorganismo procarionta y, como medio, se utilizó el medio de fermentación ácido láctica de bacterias del ácido láctico que tiene la composición mostrada en la tabla 33. El ácido L-láctico contenido en el líquido de fermentación se evaluó mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo de referencia 1. La concentración de glucosa se midió utilizando Glucose Test Wako C (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

[Tabla 33]

Tabla 33 El medio de fermentación ácido láctica de bacterias del ácido láctico

Composición	Concentración del componente
Glucosa	50 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Polipeptona	5 g/l
Cloruro sódico	5 g/l

5 La cepa de *Lactococcus lactis* JCM 7638 se sometió a cultivo estático en 5 ml del medio de fermentación ácido láctica purgado con nitrógeno mostrado en la tabla 33 colocados en un tubo de ensayo, durante 24 horas a una temperatura de 37°C (precultivo). El cultivo obtenido se inoculó a 50 ml de un medio de fermentación ácido láctica purgado con nitrógeno fresco, y se sometió a cultivo estático durante 48 horas a una temperatura de 37°C (cultivo principal).

10

(Ejemplo de referencia 12) Fermentación etanólica (levadura)

15 Se estudió la fermentación etanólica mediante una cepa de levadura (OC2, *Saccharomyces cerevisiae*, levadura vinícola). El medio a utilizar para la fermentación se preparó sometiéndolo al medio que tiene la composición del ejemplo de referencia 10 a esterilización por filtración (Millipore, Stericup 0,22 µm). La concentración de glucosa se cuantificó utilizando Glucose Test Wako (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). La cantidad de etanol producida en cada cultivo se midió mediante GC en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 9.

20 La cepa OC2 se cultivó en 5 ml de un medio de fermentación (medio de precultivo) en un tubo de ensayo con agitación durante una noche (precultivo). Se recuperaron células de levadura del precultivo mediante centrifugado, y las células se lavaron bien con 15 ml de agua estéril. Las células de levadura lavadas se inocularon a 100 ml de medios que tienen las composiciones descritas en la tabla 32, y se cultivaron en un matraz de Sakaguchi de 500 ml durante 24 horas con agitación (cultivo principal).

25 (Ejemplo de referencia 13) Fermentación para producir cadaverina (*Corynebacterium glutamicum*)

30 Como microorganismo para la producción de cadaverina, se utilizó la cepa de *Corynebacterium glutamicum* TR-CAD1 descrita en la Patente JP 2004-222569 A, para estudiar la fermentación para producir cadaverina mediante asimilación de glucosa. Se preparó un medio de fermentación para producir cadaverina preparando un líquido que contiene azúcar de modo que se conseguía la composición de glucosa mostrada en la tabla 34, como fuente de carbono, y se conseguía un pH de 7,0 con amoníaco acuoso 3 M. La evaluación de la concentración de cadaverina, que es el producto, se llevó a cabo mediante medición mediante el procedimiento de HPLC. La concentración de glucosa se midió utilizando Glucose Test Wako C (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

35

[Tabla 34]

Tabla 34 Medio de fermentación para producir cadaverina

Composición	Concentración del componente
Glucosa	50 g/l
Ácido cítrico	1 g/l
Urea	15 g/l
Dihidrogenofosfato potásico	0,5 g/l
Hidrogenofosfato dipotásico	0,5 g/l
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,5 g/l
L-treonina	0,8 g/l
L-metionina	0,6 g/l
L-leucina	1,5 g/l
Sulfato de hierro heptahidratado	6,0 mg/l
Sulfato de manganeso monohidratado	4,2 mg/l
Biotina	1,0 mg/l
Tiamina	2,0 mg/l

40 En un tubo de ensayo, se añadieron 5 ml del medio de fermentación para producir cadaverina suplementado con kanamicina (25 µg/ml) a la cepa de *Corynebacterium glutamicum* TR-CAD1, y la cepa se cultivó durante una noche con agitación (precultivo). A partir del precultivo, la cepa de *Corynebacterium glutamicum* TR-CAD1 se recuperó mediante centrifugado, y las células se lavaron bien con 15 ml de agua estéril. Las células bacterianas lavadas se inocularon a 100 ml del medio descrito anteriormente, y se cultivaron en un matraz de Sakaguchi de 500 ml durante

45 24 horas con agitación (cultivo principal).

(Ejemplo de referencia 14) Fermentación D-ácido láctica

Como microorganismo, se utilizó la cepa de levadura NBRC10505/pTM63 descrita en la Patente JP 2007-074939 A y, como medio, se utilizó el medio de producción de ácido D-láctico que tiene la composición mostrada en la tabla 35. La evaluación de la concentración de ácido D-láctico, que es el producto, se llevó a cabo mediante medición mediante el procedimiento de HPLC de la misma manera que en el ejemplo de referencia 1. La concentración de glucosa se midió utilizando Glucose Test Wako C (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

[Tabla 35]

Tabla 35 Medio de fermentación ácido D-láctico

Composición	Concentración del componente
Glucosa	50 g/l
Base nitrogenada de levadura sin aminoácido	6,7 g/l
Diecinueve aminoácidos estándar excluyendo leucina	152 mg/l
Leucina	760 mg/l
Inositol	152 mg/l
Ácido p-aminobenzoico	16 mg/l
Adenina	40 mg/l

La cepa NBRC10505/pTM63 se cultivó en 5 ml del medio de producción de ácido D-láctico en un tubo de ensayo durante una noche con agitación (precultivo). El cultivo obtenido se inoculó a 50 ml de un medio de producción de ácido D-láctico fresco, y se cultivó en un matraz de Sakaguchi de 500 ml durante 24 horas a una temperatura de 30°C con agitación (cultivo principal).

(Ejemplo de referencia 15) Procedimiento de fermentación para producir ácido succínico

Como microorganismo que tiene una capacidad de producir ácido succínico, se utilizó la cepa de *Anaerobiospirillum succiniciproducens* ATCC53488, para llevar a cabo la fermentación para producir ácido succínico. En un matraz Erlenmeyer de 125 ml, se colocaron 100 ml del medio de cultivo de siembra que tenía la composición mostrada en la tabla 36, seguido por esterilización térmica.

[Tabla 36]

Tabla 36 Medio de fermentación para producir ácido succínico

Composición	Concentración del componente
Glucosa	50 g/l
Polipeptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Hidrogenofosfato dipotásico	1 g/l
Cloruro sódico	1 g/l
Cloruro de magnesio	0,2 g/l

En una cámara de manipulación con guantes anaeróbica, se añadieron 1 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 30 mM y 0,15 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 180 mM al medio, y además, se le añadieron 0,5 ml de una solución reductora que contenía 0,25 g/l de cisteína·HCl y 0,25 g/l de Na<sub>2</sub>S, seguido por inoculación de la cepa ATCC53488 y cultivo estático a 39°C durante 24 horas (cultivo principal).

(Ejemplo 16) Fermentación para producir productos químicos utilizando líquidos que contienen azúcar purificados a partir de solución acuosa de azúcar tratada con ácido sulfúrico diluido/tratada con una enzima

A partir de 1 litro de cada uno de la solución acuosa de azúcar y los líquidos que contienen azúcar purificados (líquido tratado con membrana de nanofiltración y líquido tratado con membrana de ósmosis inversa) en el ejemplo 1, el agua se evaporó a presión reducida (200 hPa) utilizando un evaporador rotatorio (fabricado por Tokyo Rikakikai) para obtener una solución/líquido concentrado aproximadamente 3 veces. Utilizando estos y, para comparación, glucosa de calidad analítica, se prepararon componentes del medio adecuados para los respectivos casos de fermentación en las condiciones de concentración de los respectivos componentes del medio descritos en las condiciones de fermentación mostradas en los ejemplos de referencia 10 a 15, y los componentes del medio preparados se utilizaron en el cultivo principal. En el precultivo, se utilizó glucosa de calidad analítica, y cada líquido que contiene azúcar se utilizó solamente en el cultivo principal. Como resultado, tal como se muestra en la tabla 37, los casos en los que el tratamiento con membrana se llevó a cabo mostraban mejor supresión de la inhibición de la fermentación y concentraciones mejoradas de productos químicos acumulados, en comparación con el caso en el que el tratamiento con membrana no se llevó a cabo.

[Tabla 37]

Tabla 37 Concentraciones de productos químicos acumulados

	Solución acuosa de azúcar	tratamiento con membrana de NF (referencia)	tratamiento con membrana de RO (invención)	Monosacárido de calidad analítica
Ácido L-láctico (Ejemplo de referencia 10)	5 g/l	12 g/l	11 g/l	14 g/l
Ácido L-láctico (Ejemplo de referencia 11)	5 g/l	8 g/l	7 g/l	9 g/l
Etanol (Ejemplo de referencia 12)	22 g/l	29 g/l	28 g/l	29 g/l
Cadaverina (Ejemplo de referencia 13)	0,4 g/l	1,1 g/l	1,0 g/l	1,3 g/l
Ácido D-láctico (Ejemplo de referencia 14)	1,2 g/l	7 g/l	5 g/l	9 g/l
Ácido succínico (Ejemplo de referencia 15)	30 g/l	35 g/l	35 g/l	35 g/l

5 En términos de la prueba de fermentación ácido L-láctico utilizando levadura (ejemplo de referencia 10), la cantidad de glucosa en el líquido que contiene azúcar consumido durante la fermentación y el rendimiento con respecto al azúcar (glucosa) se muestran en la tabla 38. El tratamiento de la solución acuosa de azúcar a través de la membrana de ósmosis inversa dio como resultado mejores tendencias de mejora también en el consumo de azúcar, en comparación con el caso en el que el tratamiento no se llevó a cabo.

[Tabla 38]

Tabla 38 Consumo de glucosa y rendimiento con respecto al azúcar en la fermentación ácido L-láctico

	Solución acuosa de azúcar	tratamiento con membrana de NF (referencia)	tratamiento con membrana de RO (invención)	Monosacárido de calidad analítica
Consumo de glucosa	31 g/l	48 g/l	48 g/l	49 g/l
Rendimientos con respecto al azúcar (glucosa)	16%	25%	24%	28%

15 (Ejemplo 17) Fermentación para producir productos químicos utilizando líquidos que contienen azúcar purificados a partir de solución acuosa de azúcar tratada hidrotérmicamente/tratada enzimáticamente

20 A partir de aproximadamente 1 litro de cada uno de la solución acuosa de azúcar y los líquidos que contienen azúcar purificados (líquido tratado con membrana de nanofiltración y líquido tratado con membrana de ósmosis inversa) en el ejemplo 2, el agua se evaporó a presión reducida (200 hPa) utilizando un evaporador rotatorio (fabricado por Tokyo Rikakikai) para obtener una solución/líquido concentrado aproximadamente 1,2 veces. Utilizando estos y, para comparación, glucosa de calidad analítica, se prepararon componentes del medio adecuados para los respectivos casos de fermentación en las condiciones de concentración de los respectivos componentes del medio descritos en las condiciones de fermentación mostradas en los ejemplos de referencia 10 a 15, y los componentes del medio preparados se utilizaron en el cultivo principal. En el precultivo, se utilizó glucosa de calidad analítica, y cada líquido que contiene azúcar se utilizó solamente en el cultivo principal. Como resultado, tal como se muestra en la tabla 39, los casos en los que el tratamiento con membrana se llevó a cabo mostraban mejor supresión de la inhibición de la fermentación y concentraciones mejoradas de productos químicos acumulados, en comparación con el caso en el que el tratamiento con membrana no se llevó a cabo.

[Tabla 39]

Tablas 39 Concentraciones de productos químicos acumulados

	Solución acuosa de azúcar	tratamiento con membrana de NF (referencia)	tratamiento con membrana de RO (invención)	Monosacárido de calidad analítica
Ácido L-láctico (Ejemplo de referencia 10)	7 g/l	14 g/l	13 g/l	14 g/l
Ácido L-láctico (Ejemplo de referencia 11)	7 g/l	9 g/l	8 g/l	9 g/l
Etanol (Ejemplo de referencia 12)	25 g/l	29 g/l	29 g/l	29 g/l
Cadaverina (Ejemplo de referencia 13)	0,7 g/l	1,3 g/l	1,2 g/l	1,3 g/l
Ácido D-láctico (Ejemplo de referencia 14)	2,8 g/l	8 g/l	7 g/l	9 g/l
Ácido succínico (Ejemplo de referencia 15)	32 g/l	35 g/l	35 g/l	35 g/l

- 5 (Ejemplo 18) Fermentación para producir productos químicos utilizando líquidos que contienen azúcar purificados a partir de solución acuosa de azúcar tratada con amoníaco/tratada enzimáticamente

10 A partir de aproximadamente 1 litro de cada uno de la solución acuosa de azúcar y los líquidos que contienen azúcar purificados (líquido tratado con membrana de nanofiltración y líquido tratado con membrana de ósmosis inversa) en el ejemplo 3, el agua se evaporó a presión reducida (200 hPa) utilizando un evaporador rotatorio (fabricado por Tokyo Rikakikai) para obtener una solución/líquido concentrado aproximadamente 1,2 veces. Utilizando estos y, para comparación, glucosa de calidad analítica, se prepararon componentes del medio adecuados para los respectivos casos de fermentación en las condiciones de concentración de los respectivos componentes del medio descritos en las condiciones de fermentación mostradas en los ejemplos de referencia 10 a 15, y los componentes del medio preparados se utilizaron en el cultivo principal. En el precultivo, se utilizó glucosa de calidad analítica, y cada líquido que contiene azúcar se utilizó solamente en el cultivo principal. Como resultado, tal como se muestra en la tabla 40, los casos en los que el tratamiento con membrana se llevó a cabo mostraban mejor supresión de la inhibición de la fermentación y concentraciones mejoradas de productos químicos acumulados, en comparación con el caso en el que el tratamiento no se llevó a cabo.

20

[Tabla 40]

Tabla 40 Concentraciones de productos químicos acumulados

	Solución acuosa de azúcar	tratamiento con membrana de NF (referencia)	tratamiento con membrana de RO (invención)	Monosacárido de calidad analítica
ácido L-láctico (Ejemplo de referencia 10)	6 g/l	13 g/l	11 g/l	14 g/l
ácido L-láctico (Ejemplo de referencia 11)	6 g/l	9 g/l	7 g/l	9 g/l
Etanol (Ejemplo de referencia 12)	23 g/l	29 g/l	29 g/l	29 g/l
Cadaverina (Ejemplo de referencia 13)	0,6 g/l	1,2 g/l	1,1 g/l	1,3 g/l
ácido D-láctico (Ejemplo de referencia 14)	2,1 g/l	8 g/l	6 g/l	9 g/l
Ácido succínico (Ejemplo de referencia 15)	31 g/l	35 g/l	35 g/l	35 g/l

(Ejemplo 19) Fermentación para producir productos químicos utilizando líquidos que contienen azúcar purificados a partir de solución acuosa de azúcar tratada hidrotérmicamente

5 A partir de 1 litro de cada uno de la solución acuosa de azúcar y los líquidos que contienen azúcar purificados (líquido tratado con membrana de NF y líquido tratado con membrana de RO) en el ejemplo 5, el agua se evaporó a presión reducida (200 hPa) utilizando un evaporador rotatorio (fabricado por Tokyo Rikakikai) para obtener una solución/líquido concentrado aproximadamente 20 veces. Utilizando estos y, para comparación, glucosa de calidad analítica, se prepararon componentes del medio adecuados para los respectivos casos de fermentación en las condiciones de concentración de los respectivos componentes del medio descritos en las condiciones de fermentación mostradas en los ejemplos de referencia 10 a 15, y los componentes del medio preparados se utilizaron en el cultivo principal. En el precultivo, se utilizó glucosa de calidad analítica, y cada líquido que contiene azúcar se utilizó solamente en el cultivo principal. Como resultado, tal como se muestra en la tabla 41, los casos en los que el tratamiento con membrana se llevó a cabo mostraban mejor supresión de la inhibición de la fermentación y concentraciones mejoradas de productos químicos acumulados, en comparación con el caso en el que el tratamiento no se llevó a cabo.

[Tabla 41]

Tabla 41 Concentraciones de productos químicos acumulados

	Solución acuosa de azúcar	tratamiento con membrana de NF (referencia)	tratamiento con membrana de RO (invención)	Monosacárido de calidad analítica
Ácido L-láctico (Ejemplo de referencia 10)	0 g/l	9 g/l	4 g/l	14 g/l
Ácido L-láctico (Ejemplo de referencia 11)	0 g/l	6 g/l	3 g/l	9 g/l
Etanol (Ejemplo de referencia 12)	12 g/l	24 g/l	14 g/l	29 g/l
Cadaverina (Ejemplo de referencia 13)	0 g/l	0,5 g/l	0 g/l	1,3 g/l
Ácido D-láctico (Ejemplo de referencia 14)	0 g/l	9 g/l	0 g/l	9 g/l
Ácido succínico (Ejemplo de referencia 15)	21 g/l	32 g/l	26 g/l	35 g/l

20 (Ejemplo 20) Efecto del pH de la solución acuosa de azúcar sobre la producción de productos químicos

Para investigar el efecto del pH de la solución acuosa de azúcar sobre la producción de productos químicos utilizando el líquido que contiene azúcar purificado, se compararon y se estudiaron los resultados de fermentación ácido L-láctico utilizando soluciones acuosas de azúcar que tenían diferentes pH. Como fuentes de carbono de los medios de fermentación, se utilizaron los dos tipos de líquidos que contienen azúcar purificados en el ejemplo 7 (preparados tratando soluciones acuosas de azúcar a pH de 3 y 7 a través de una membrana de ósmosis inversa) y, como control, se utilizó glucosa de calidad analítica. Con ácido sulfúrico y amoníaco acuoso, 0,5 l de cada uno de los líquidos que contienen azúcar purificados en el ejemplo 7 se ajustaron a pH 5, y los líquidos resultantes se diluyeron a una concentración de glucosa de 55 g/l, para proporcionar los líquidos que contienen azúcar A y B (A: tratado a través de una membrana de ósmosis inversa a pH 3; B: tratado a través de una membrana de ósmosis inversa a pH 7). A estos líquidos que contienen azúcar, se les mezclaron medio con deficiencia selectiva sintético de levadura suplementado sin triptófano (Sigma Aldrich Japón, Tabla 32, Drop-out MX), base nitrogenada de levadura sin aminoácido y sulfato de amonio (Difco, Yeast NTbase), y sulfato de amonio de modo que se consiguió la proporción mostrada en la tabla 32 para el medio de fermentación ácido L-láctico en el ejemplo de referencia 10, para proporcionar los medios del líquido que contiene azúcar purificado A y B, respectivamente. Análogamente, se preparó un medio monosacárido de calidad analítica mediante la mezcla de glucosa de calidad analítica a la proporción mostrada en la tabla 32.

40 Cada medio se sometió a esterilización por filtración (Millipore, Stericup 0,22 µm) antes de utilizarlo en la fermentación. La concentración de glucosa se cuantificó utilizando Glucose Test Wako (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). La cantidad de ácido láctico producida en cada cultivo se midió mediante HPLC en las mismas condiciones que en la medición de ácidos orgánicos mediante HPLC en el ejemplo de referencia 2.

45 Según el procedimiento en el ejemplo de referencia 10, la cepa de levadura SW-1 se precultivó en 5 ml del medio monosacárido de calidad analítica en un tubo de ensayo, y a continuación se llevó a cabo el cultivo principal en los

medios del líquido que contiene azúcar purificado A y B y el medio monosacárido de calidad analítica. Como resultado, tal como se muestra en la tabla 42, la utilización del líquido que contiene azúcar purificado preparado tratando la solución acuosa de azúcar (pH 3) a través de una membrana de ósmosis inversa dio como resultado un consumo más elevado, que era equivalente al consumo observado en el caso del medio monosacárido de calidad analítica, de glucosa por el microorganismo en comparación con el caso del líquido que contiene azúcar purificado preparado tratando la solución acuosa de azúcar (pH 7) a través de una membrana de ósmosis inversa. Por lo tanto, podía confirmarse que la inhibición de la fermentación se redujo en el primer caso. Además, también se demostró que la concentración de ácido láctico acumulado en el caso del medio líquido que contiene azúcar purificado preparado filtrando la solución acuosa de azúcar (pH 3) a través de una membrana de ósmosis inversa era equivalente a aquella en el caso del medio monosacárido de calidad analítica.

[Tabla 42]

Tabla 42 Resultados de fermentación ácido L-láctico (después de 24 horas de cultivo)

	Consumo de glucosa	Concentración de ácido láctico acumulado	Rendimiento con respecto al azúcar (glucosa)
Medio líquido que contiene azúcar purificado A	50 g/l	14 g/l	28%
Medio líquido que contiene azúcar purificado B	40 g/l	10 g/l	25%
Medio monosacárido de calidad analítica	50 g/l	14 g/l	28%

(Ejemplo 21) Comparación de rendimientos de membrana de nanofiltración y membrana de ósmosis inversa en la producción de productos químicos

Para comparar los rendimientos de la membrana de nanofiltración y la membrana de ósmosis inversa en la producción de productos químicos, se compararon y se estudiaron los resultados de la fermentación etanólica entre el líquido que contiene azúcar preparado mediante purificación a través de la membrana de nanofiltración, el líquido que contiene azúcar preparado mediante purificación a través de la membrana de ósmosis inversa y el líquido que contiene azúcar preparado mediante purificación a través de la membrana de nanofiltración y la membrana de ósmosis inversa. Como fuentes de carbono, se utilizaron los tres tipos de líquidos que contienen azúcar purificados en el ejemplo 12 (aquellos sometidos a tratamiento con membrana de nanofiltración, tratamiento con membrana de ósmosis inversa o tratamiento con membrana de nanofiltración seguido por tratamiento con membrana de ósmosis inversa) y, como control, se utilizó glucosa de calidad analítica. Con amoníaco acuoso, 0,5 l de cada uno de los líquidos que contienen azúcar concentrados obtenidos en el ejemplo 12 se ajustó a pH 5, y los líquidos resultantes se diluyeron a una concentración de glucosa de 55 g/l, para proporcionar los líquidos que contienen azúcar E, F y G (E: tratado a través de una membrana de nanofiltración; F: tratado a través de una membrana de nanofiltración y a continuación a través de una membrana de ósmosis inversa; G: tratado a través de una membrana de ósmosis inversa). A estos líquidos que contienen azúcar, se les mezclaron medio con deficiencia selectiva sintético de levadura suplementado sin triptófano (Sigma Aldrich Japón, Tabla 34, Drop-out MX), base nitrogenada de levadura sin aminoácido y sulfato de amonio (Difco, Yeast NTbase), y sulfato de amonio de modo que se consiguió la proporción mostrada en la tabla 32 en el ejemplo de referencia 10, para proporcionar los medios de líquido que contiene azúcar purificado C a E, respectivamente. Análogamente, se preparó un medio monosacárido de calidad analítica mediante la mezcla de glucosa de calidad analítica a la proporción mostrada en la tabla 32.

Cada medio se sometió a esterilización por filtración (Millipore, Stericup 0,22  $\mu\text{m}$ ) antes de utilizarlo en la fermentación. La concentración de glucosa se cuantificó utilizando Glucose Test Wako (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). La cantidad de etanol producida en cada cultivo se midió mediante GC en las condiciones descritas en el ejemplo de referencia 1.

Según el procedimiento en el ejemplo de referencia 11, la cepa OC2 se precultivó en 5 ml del medio monosacárido de calidad analítica en un tubo de ensayo, y a continuación se llevó a cabo el cultivo principal en los medios de líquido que contiene azúcar purificado C a E y el medio monosacárido de calidad analítica. Como resultado, tal como se muestra en la tabla 43, C y D, en los que se utilizaron los líquidos que contienen azúcar purificados con la membrana de nanofiltración, mostraban cantidades de consumo de glucosa y concentraciones de etanol acumulado equivalentes a aquellas en el caso del medio monosacárido de calidad analítica. Por lo tanto, podía confirmarse que la inhibición de la fermentación se redujo en estos casos. También se confirmó que E, en el que se utilizó el líquido que contiene azúcar purificado con la membrana de ósmosis inversa, mostraba fermentación casi equivalente a aquella en el caso del medio monosacárido de calidad analítica, aunque ligeramente peor que C y D.

[Tabla 43]

Tabla 43 Resultados de fermentación etanólica (después de 48 horas de cultivo)

	Consumo de glucosa	Concentración de etanol acumulado
Medio de líquido que contiene azúcar C purificado	50 g/l	29 g/l
Medio de líquido que contiene azúcar D purificado	50 g/l	29 g/l
Medio de líquido que contiene azúcar E purificado	48 g/l	27 g/l
Medio monosacárido de calidad analítica	50 g/l	29 g/l

5 APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Mediante la presente invención, sustancias que inhiben la fermentación pueden eliminarse de una solución acuosa de azúcar derivada de una biomasa que contiene celulosa, y, por otro lado, un líquido que contiene azúcar purificado que contiene monosacáridos tales como glucosa y xilosa puede producirse a alta pureza y a alto rendimiento, de modo que la utilización del líquido que contiene azúcar purificado como materia prima de fermentación permite la mejora de las eficiencias de la producción fermentativa de diversos productos químicos.

DESCRIPCIÓN DE SÍMBOLOS

- 1. Tanque de líquido sin procesar
- 2. Célula equipada con membrana de nanofiltración o membrana de ósmosis inversa
- 3. Bomba de alta presión
- 4. Flujo de líquido que ha penetrado a través de la membrana
- 5. Flujo de líquido que ha sido concentrado con la membrana
- 6. Flujo de cultivo enviado por la bomba de alta presión, o permeado desde membrana de nanofiltración
- 7. Membrana de nanofiltración o membrana de ósmosis inversa
- 8. Placa de soporte

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> TORAY INDUSTRIES, INC.
- <120> Procedimiento para fabricar líquido que contiene azúcar
- <130> 09089
- <160> 20
- <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 26
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
- <400> 1
- ctcgagatgg caactctaaa ggatca 26
- <210> 2
- <211> 28
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
- <400> 2
- gcggccgctt aaaattgcag ctcccttt 28

ES 2 764 124 T3

<210> 3  
 <211> 999  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5  
 <400> 3  
 atggcaactc taaaggatca gctgatttat aatcttctaa aggaagaaca gacccccag 60  
 aataagatta cagttggttg ggttggtgct gttggcatgg cctgtgcat cagtatctta 120  
 atgaaggact tggcagatga acttgctctt gttgatgtca tcgaagaca attgaagga 180  
 gagatgatgg atctccaaca tggcagcctt ttccttagaa caccaaagat tgtctctggc 240  
 aaagactata atgtaactgc aaactccaag ctggtcatta tcacggctgg ggcacgtcag 300  
 caagagggag aaagccgtct taatttggtc cagcgtaacg tgaacatatt taaattcatc 360  
 attcctaata ttgtaaaata cagcccgaac tgcaagttgc ttattgtttc aaatccagtg 420  
 gatatcttga cctacgtggc ttggaagata agtggttttc ccaaaaaccg tgttattgga 480  
 agtggttgca atctggattc agcccgattc cgttacctga tgggggaaag gctgggagtt 540  
 caccattaa gctgtcatgg gtgggtcctt ggggaacatg gagattccag tgtgcctgta 600  
 tggagtggaa tgaatggtgc tgggtgtctct ctgaagactc tgcaccaga tttagggact 660  
 gataaagata aggaacagtg gaaagaggtt cacaagcagg tggttgagag tgcttatgag 720  
 gtgatcaaac tcaaaggcta cacatcctgg gctattggac tctctgtagc agatttggca 780  
 gagagtataa tgaagaatct taggcgggtg caccagttt ccaccatgat taagggctt 840  
 tacggaataa aggatgatgt cttccttagt gttccttgca ttttgggaca gaatggaatc 900  
 tcagaccttg tgaagtgac tctgacttct gaggaagagg cccgtttgaa gaagagtgca 960  
 gatacacttt gggggatcca aaaggagctg caattttaa 999

10  
 <210> 4  
 <211> 80  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 4  
 tctcaattat tattttctac tcataacctc acgcaaaata acacagtcaa atcaatcaaa 60  
 atggcaactc taaaggatca 80

20  
 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

25  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador



**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar utilizando una biomasa que contiene celulosa como materia prima, comprendiendo dicho procedimiento:
- 5 (1) hidrolizar una biomasa que contiene celulosa para producir una solución acuosa de azúcar; y  
(2) filtrar la solución acuosa de azúcar obtenida a través de una membrana de ósmosis inversa para recoger un líquido que contiene azúcar purificado desde el lado de alimentación, mientras se eliminan sustancias que inhiben la fermentación desde el lado del permeado;
- 10 en el que la capa o capas funcionales de dicha membrana de ósmosis inversa en la etapa (2) son poliamida o acetato de celulosa; y dicha sustancia o sustancias que inhiben la fermentación son una o más seleccionadas de ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, furfural, hidroximetilfurfural, vanilina, acetovanilina, ácido vanílico y ácido síringico.
- 15 2. Procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según la reivindicación 1, en el que el pH de dicha solución acuosa de azúcar en la etapa (2) se ajusta entre 1 y 5.
3. Procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según la reivindicación 2, en el que el pH de dicha solución acuosa de azúcar en la etapa (2) se ajusta entre 1 y 3.
- 20 4. Procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho líquido que contiene azúcar purificado en dicha etapa (2) es un líquido que contiene azúcar que contiene un monosacárido como componente principal.
- 25 5. Procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha solución acuosa de azúcar obtenida en dicha etapa (1) se filtra adicionalmente a través de una membrana de microfiltración y/o membrana de ultrafiltración para eliminar partículas finas y componentes macromoleculares antes del tratamiento de la etapa (2).
- 30 6. Procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la temperatura de dicha solución acuosa de azúcar en la etapa (2) se ajusta entre 40 y 80°C.
- 35 7. Procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha etapa (2) es una etapa de filtración de dicha solución acuosa de azúcar a través de una membrana de nanofiltración y filtración del filtrado obtenido a través de dicha membrana de ósmosis inversa.
- 40 8. Procedimiento para producir un líquido que contiene azúcar, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende, además, la etapa de fermentar el líquido que contiene azúcar obtenido de la etapa (2) para producir un producto químico.

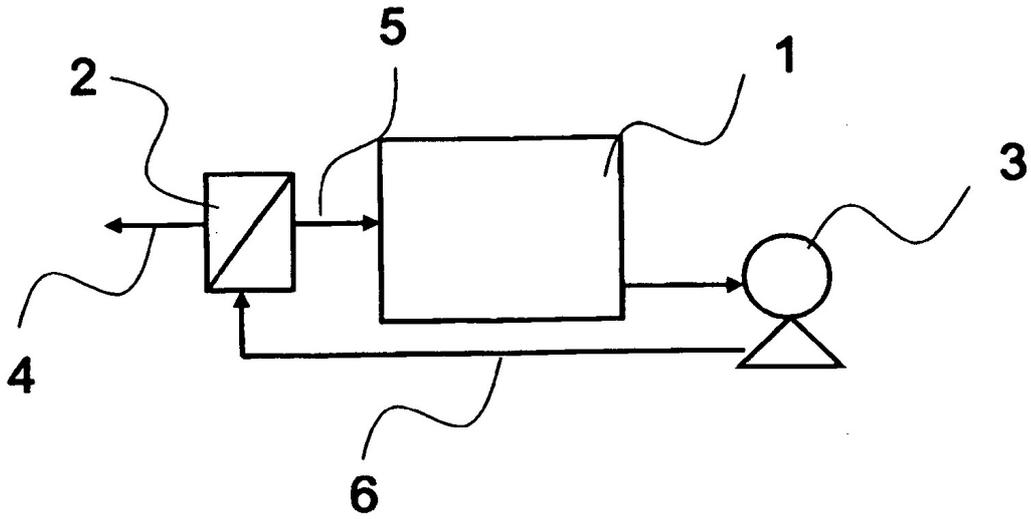


Fig.1

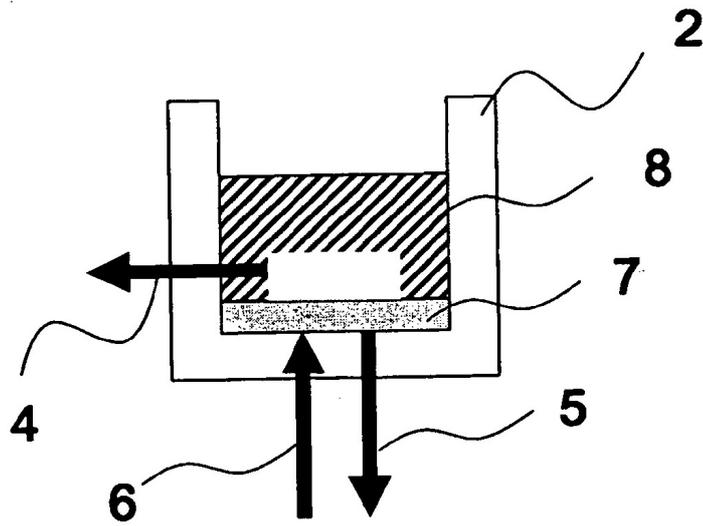
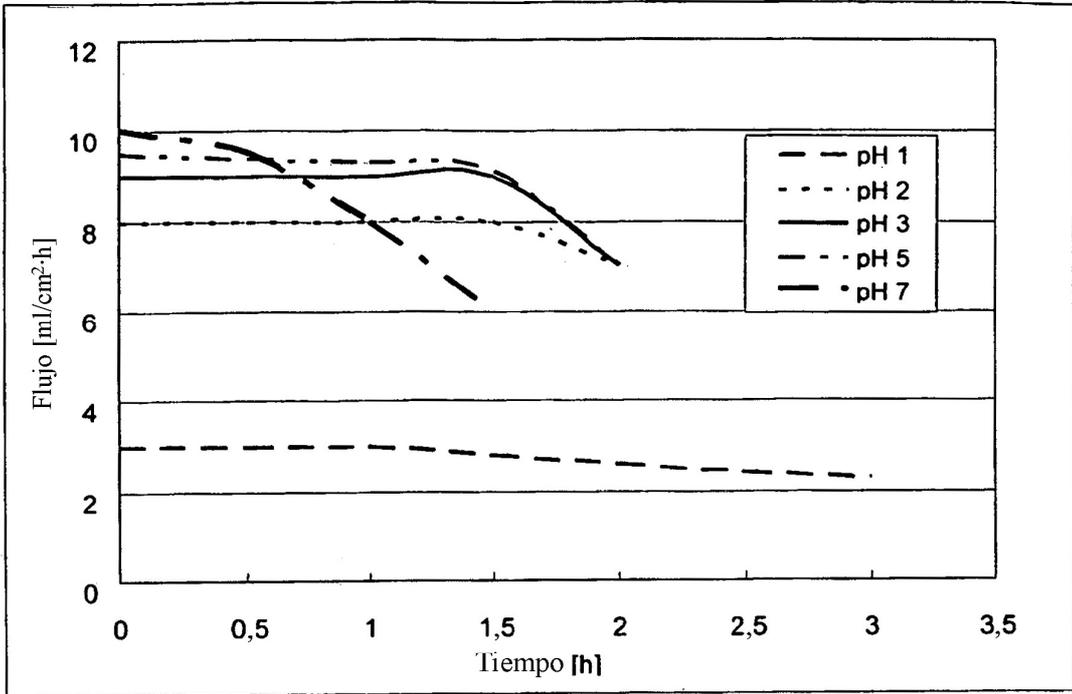
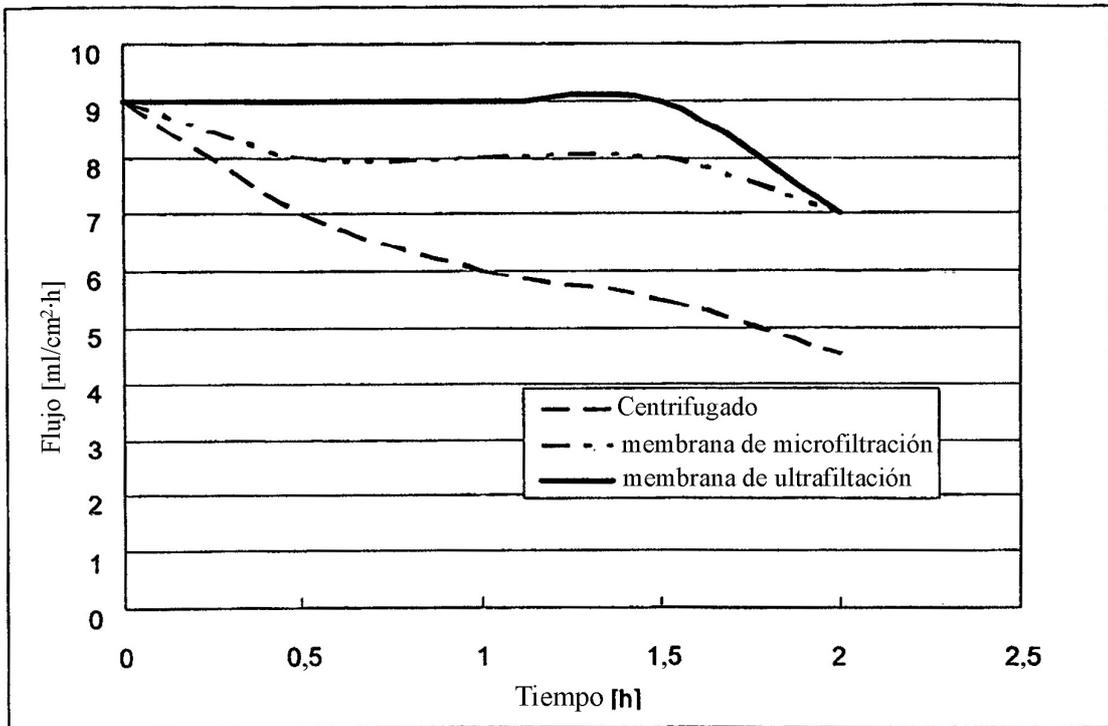


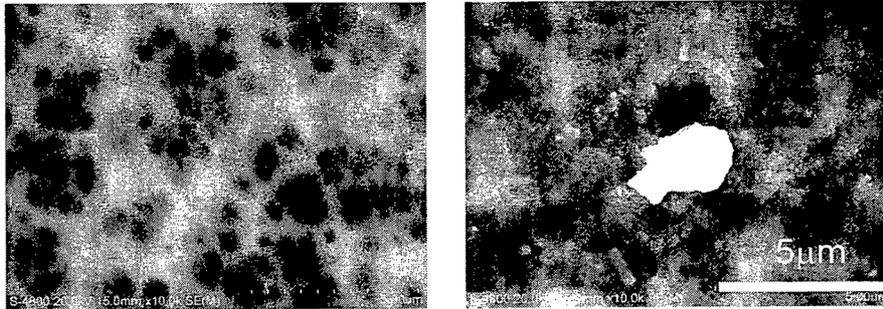
Fig.2



**Fig.3**

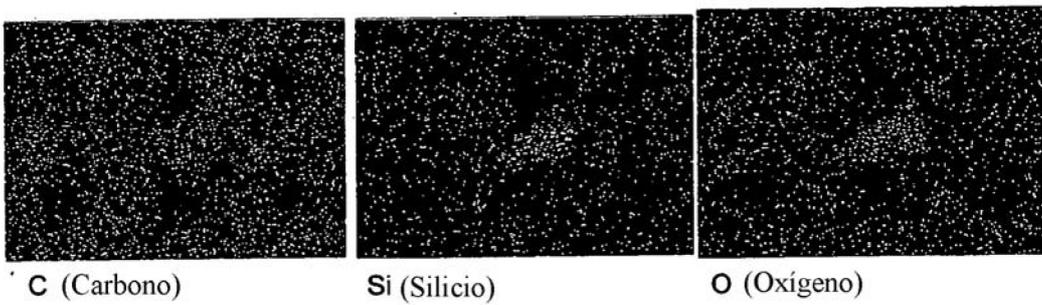


**Fig.4**

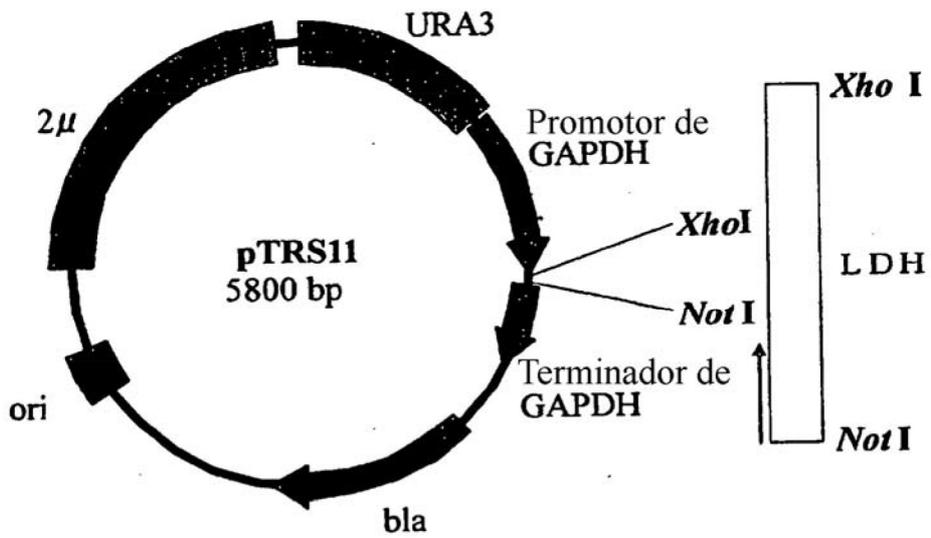


Membrana de microfiltración antes del tratamiento Membrana de microfiltración después del tratamiento

**Fig.5**



**Fig.6**



**Fig.7**

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

5 *Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.*

**Documentos de patentes citados en la descripción**

10

- JP 11506934 PCT
- JP 2005229821 A
- JP 2003212888 A
- JP 2001095597 A
- JP 3041380 B
- JP 2004187650 A
- JP 2001511418 PCT
- JP 2005270056 A
- WO 2009110374 A
- JP 2008161125 A
- JP 2008535664 A
- JP 62201606 A
- WO 2007097260 A
- JP 2004222569 A
- JP 2007074939 A

**Literatura no patente citada en la descripción**

- **A. ADEN et al.** Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover. *NREL Technical Report*, 2002
- **M. ALFRED et al.** Effect of pH, time and temperature of overliming on detoxification of dilute-acid hydrolyzates for fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, 2002, vol. 38, 515-522
- **S. LIU et al.** *J. Biobased Materials and Bioenergy*, 2008, vol. 2, 121-134
- The curve obtained by plotting the molecular weights of solutes along the abscissa and the blocking rates along the ordinate is called the molecular weight cutoff curve. The molecular weight with which the blocking rate reaches 90% is called the molecular weight cutoff. Membrane Experiment Series. Kyoritsu Shuppan Co., Ltd, 1993, vol. III, 92