

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 066**

51 Int. Cl.:

C08B 15/08	(2006.01)
C12N 9/42	(2006.01)
C12N 9/96	(2006.01)
C12P 19/02	(2006.01)
C12P 19/14	(2006.01)
C13K 1/02	(2006.01)
C13K 11/00	(2006.01)
D21C 5/00	(2006.01)
D21C 1/10	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2016 PCT/CA2016/050402**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2016 WO16161515**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2016 E 16775983 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2024 EP 3280812**

54 Título: **Métodos y composiciones para el tratamiento de biomasa celulósica y productos obtenidos con ello**

30 Prioridad:

10.04.2015 US 201562145785 P
26.10.2015 US 201562246271 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.11.2024

73 Titular/es:

COMET BIOREFINING INC. (100.0%)
P.O. Box 3325 Sarnia Main, 1475 Vidal St. S
Sarnia Ontario N7T 8G6, CA

72 Inventor/es:

RICHARD, ANDREW y
D'AGOSTINO, DENNIS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 985 066 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

Métodos y composiciones para el tratamiento de biomasa celulósica y productos obtenidos con ello

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES ANTERIORES

La presente solicitud reivindica prioridad bajo el Convenio de París de la solicitud de EE.UU. número 62/145.785, presentada el 10 de abril de 2015 y de la solicitud de EE.UU. número 62/246.271, presentada el 26 de octubre de 2015.

10

CAMPO

Esta solicitud se refiere a métodos para tratar biomasa celulósica para producir azúcares celulósicos. De acuerdo con la invención, se proporcionan métodos para activar materia prima celulósica y/o hidrólisis enzimática para producir glucosa. También se proporcionan materia prima celulósica activada y productos obtenidos a partir de hidrólisis enzimática de la materia prima celulósica activada.

15

INTRODUCCIÓN

20

La producción de azúcares tales como glucosa a partir de biomasa celulósica ha sido el foco de considerables investigaciones y desarrollo. Sin embargo, el alto costo y la baja tasa de conversión de muchos procesos han limitado la adopción generalizada de la tecnología del azúcar celulósico.

25

En la técnica se conoce un cierto número de métodos diferentes para convertir biomasa celulósica en azúcares. Estos incluyen generalmente una etapa de pretratamiento en la que la biomasa celulósica se altera física y/o químicamente para abrir la estructura de los azúcares poliméricos contenidos en la biomasa celulósica y una etapa de hidrólisis enzimática o química en la que los azúcares poliméricos se descomponen en azúcares monoméricos.

30

Si bien se han informado altos rendimientos de glucosa (> 90 %) basados en celulosa, estos rendimientos se logran normalmente a bajas concentraciones de glucosa, típicamente del 2-5 %. Métodos que dan como resultado tanto un alto rendimiento como una alta concentración de glucosa son difíciles de lograr, porque la presencia de glucosa reduce típicamente reduce la actividad de las enzimas celulasa incluso con altas cargas de enzima. La actividad de la enzima celulasa disminuye con el tiempo, lo que requiere la adición de enzima nueva a las reacciones de hidrólisis enzimática para mantener el rendimiento. Sin embargo, el elevado coste de las enzimas celulasa puede resultar prohibitivo. Las enzimas celulasa también pueden unirse con celulosa y/o lignina recalcitrantes y dejan de estar disponibles para la hidrólisis adicional de celulosa a glucosa. Esta unión no productiva también dificulta el reciclaje de enzimas, lo cual es deseable para reducir el uso de enzimas y reducir los costos operativos.

35

40

Se han desarrollado diversos procedimientos diferentes para el pretratamiento de la materia prima celulósica y se han desarrollado diversos procedimientos de hidrólisis enzimática para convertir la materia prima celulósica tratada en azúcares. Por ejemplo, Parekh (Publicación PCT N° WO2014/026154) describen un procedimiento de pretratamiento de dos etapas para biomasa lignocelulósica principalmente en condiciones ácidas. Schiffino et al. (Publicación de EE.UU. N° 2011/0250645) describen métodos para mejorar la liberación de azúcares monoméricos a partir de biomasa tratada alcalinamente. Liu et al. (Publicación de EE.UU. N° 2011/0300586) describen un procedimiento de pretratamiento de dos etapas para biomasa lignocelulósica con el objetivo de reducir la cristalinidad de la celulosa y disociar el complejo hemicelulosa-celulosa. Realizaciones incluyen un tratamiento con vapor de baja intensidad o autohidrólisis, seguido de hidrólisis con ácido diluido o agua caliente.

45

50

El documento WO 2011/046816 A1 se refiere al campo general de la producción de azúcar a partir de biomasa lignocelulósica y describe un método para la liberación de azúcares monoméricos a partir de biomasa pretratada alcalina. Más específicamente, en esta memoria se describen métodos para el procesamiento de biomasa para la producción de azúcares fermentables que implican primero tratar la biomasa con un compuesto alcalino seguido de uno o ambos de una etapa de lavado y/o secado y combinado con sacarificación enzimática en presencia de al menos un aditivo químico.

55

60

El documento WO 2010/071805 A1 se refiere a métodos de pretratamiento de biomasa lignocelulósica. En esta memoria se describe un procedimiento de pretratamiento de dos etapas que comprende un tratamiento con vapor de intensidad relativamente baja, un pretratamiento con pH controlado o autohidrólisis, seguido de hidrólisis con ácido diluido o agua caliente a una temperatura relativamente baja.

65

El documento WO 1995/020065 A1 describe un procedimiento para la producción de pulpa especial a partir de material que contiene lignocelulosa. En el procedimiento, las hemicelulosas se hidrolizan en hidrolizado y la lignina se disuelve mediante un método de cocción kraft para liberar fibras de celulosa. El procedimiento comprende prehidrolizar el material celulósico, neutralizar el material hidrolizado con líquido alcalino, retirar el hidrolizado neutralizado del digestor y deslignificar el material prehidrolizado y neutralizado con líquido de cocción alcalino que contiene hidróxido de sodio y sulfuro de sodio.

El documento US 4025389 describe un procedimiento de isomerización continua de glucosa caracterizado por bajos costos de procesamiento. El método comprende una isomerización enzimática de un jarabe de glucosa con una concentración del 30-55 % en peso de glucosa que contiene menos de aproximadamente $10^{-3}M$ de Ca^{++} , nada de Co^{++} , menos de aproximadamente $10^{-2}M$ de Mg^{++} , y preferentemente menos de $5 \times 10^{-4}M$, llevándose a cabo la conversión a pH 7,8-8,6 con un tiempo de contacto total entre la enzima y el jarabe inferior a aproximadamente 3,5 horas, preferentemente inferior a 2 horas.

SUMARIO

En las reivindicaciones independientes se recoge un método para producir una corriente de azúcar rica en glucosa a partir de celulosa activada y una corriente de azúcar rica en glucosa de acuerdo con la presente invención. Perfeccionamientos ventajosos adicionales de la presente invención se exponen en las reivindicaciones dependientes.

Este sumario pretende presentar al lector la descripción más detallada que sigue y no limitar ni definir ninguna invención reivindicada o aún no reivindicada.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para activar una materia prima celulósica con el fin de aumentar la reactividad química y/o enzimática de la celulosa en la materia prima. La celulosa activada puede luego convertirse en azúcares celulósicos, por ejemplo sometiendo la celulosa activada a hidrólisis enzimática.

De acuerdo con la presente invención, la materia prima celulósica puede someterse a una primera etapa de activación a alta temperatura, seguida de una segunda etapa de activación a una temperatura más baja en condiciones alcalinas. De acuerdo con esta realización, el método puede comprender someter la materia prima a una primera etapa de activación en la que la materia prima se trata a una temperatura superior a $190\text{ }^{\circ}C$ y una presión superior a 200 psig (13,8 bares) para producir una primera corriente de celulosa activada que comprende celulosa II y sólidos insolubles. Los sólidos insolubles pueden incluir componentes de la materia prima distintos de la celulosa tales como lignina. Posteriormente, la primera corriente de celulosa activada puede someterse a una segunda etapa de activación en la que la primera corriente de celulosa activada se trata con un álcali a una temperatura más baja que la primera etapa de activación para producir una segunda corriente de celulosa activada que comprende celulosa IV. Preferiblemente, la primera etapa de activación se realiza en presencia de agua.

Sin limitarse a teoría alguna, se cree que la primera etapa de activación altera el estado cristalino de la celulosa en la materia prima celulósica para producir una primera corriente de celulosa activada con una mayor proporción de celulosa II con respecto a la cantidad de celulosa II en la materia prima celulósica. Se cree que la segunda etapa de activación altera adicionalmente el estado cristalino de la celulosa en la primera corriente de celulosa activada para producir una segunda corriente de celulosa activada con una mayor proporción de celulosa IV con respecto a la cantidad de celulosa IV en la primera corriente de celulosa activada. En una realización, el método de activación de dos etapas descrito en esta memoria produce una mezcla de celulosa II, celulosa hidratada II y álcali-celulosa IV. Opcionalmente, el material celulósico se puede tratar, p. ej., lavar y/o filtrar, después de una o de cada una de las etapas de activación con el fin de eliminar los componentes no celulósicos solubles.

También se ha determinado que el método para activar la celulosa descrito en esta memoria da como resultado celulosa activada con un aumento en el nivel de glucano y/o una disminución en el nivel de componentes no celulósicos de la materia prima celulósica tales como lignina. Por ejemplo, en una realización los métodos descritos en esta memoria producen celulosa activada con al menos 60 %, al menos 70 % o al menos 75 % de glucano. En una realización, los métodos descritos en esta memoria producen celulosa activada con menos del 25 %, menos del 20 % o menos del 15 % de lignina.

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan métodos y composiciones para estabilizar enzimas durante la hidrólisis enzimática, mantener la actividad enzimática y/u obtener una corriente de reciclaje de enzimas.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una mezcla de hidrólisis enzimática adecuada para uso en la hidrólisis enzimática de celulosa. En una realización preferida, la mezcla de hidrólisis enzimática se pone en contacto con celulosa activada producida de acuerdo con los métodos de la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una o más enzimas celulasa en combinación con un tensioactivo y/o un dispersante para la hidrólisis enzimática de celulosa. Sin limitarse a teoría alguna, se cree que las enzimas celulasa forman un complejo con el tensioactivo y/o dispersante que puede estabilizar las enzimas, ayudar a mantener la actividad enzimática, prevenir la degradación de las enzimas y/o facilitar la recuperación de las enzimas después de la hidrólisis enzimática. También se cree que la presencia de un dispersante tal como un oligopéptido ayuda a prevenir la unión no productiva de enzimas celulasa al interactuar con la lignina y/u otros componentes no celulósicos. En una realización preferida, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico tal como un tensioactivo de polisorbato. En otra realización preferida, el tensioactivo es una mezcla de tensioactivos, tales como Tween™, un glicérido alcoxilado y nonilfenol. En una realización, el dispersante es un oligopéptido no enzimático, opcionalmente un poliaminoácido,

opcionalmente un poliaminoácido con un peso molecular de entre 1000 y 5000 o entre 3500 y 4500. En una realización preferida, el poliaminoácido es ácido poliaspártico.

5 Los métodos y las composiciones descritos en esta memoria ofrecen un cierto número de ventajas con respecto a la activación de celulosa y/o la producción de azúcares celulósicos, que pueden obtenerse de algunas de las realizaciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el uso de los métodos y las composiciones descritos en esta memoria puede dar como resultado una corriente de azúcar rica en glucosa con más de aproximadamente 12 % de glucosa, más de aproximadamente 14 % de glucosa, más de aproximadamente 16 % de glucosa o más de aproximadamente 18 % de glucosa. Además, en estas u otras realizaciones, los métodos y las composiciones descritos en esta memoria pueden dar como resultado un alto rendimiento de azúcares monoméricos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos y las composiciones descritos en esta memoria puede dar como resultado un rendimiento de glucosa que es mayor que aproximadamente 70 % de glucosa, mayor que aproximadamente 80 % de glucosa, mayor que aproximadamente 85 % de glucosa, mayor que aproximadamente 90 % o mayor que aproximadamente 95 % de rendimiento teórico de glucosa. El rendimiento teórico de glucosa en una reacción de hidrólisis enzimática se puede determinar basándose en el contenido de glucano del material celulósico activado sometido a hidrólisis enzimática. En algunas realizaciones preferidas, los métodos y las composiciones descritos en esta memoria pueden dar como resultado una corriente de azúcar rica en glucosa tanto con un alto rendimiento como con una alta concentración de glucosa. Por ejemplo, en una realización la corriente de azúcar rica en glucosa tiene más de aproximadamente 12 % de glucosa y un rendimiento de más de 70 % o más de 14 % de glucosa y un rendimiento de más de 80 % o más de 16 % de glucosa y un rendimiento de más del 90 %.

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan métodos para la hidrólisis enzimática de celulosa activada para producir azúcares celulósicos tales como glucosa. De acuerdo con esta realización, la hidrólisis enzimática se puede realizar como un proceso discontinuo o como un proceso continuo. La hidrólisis enzimática se puede realizar utilizando la mezcla de hidrólisis enzimática y/o la celulosa activada como se describe en esta memoria.

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan métodos para tratar una corriente de azúcar rica en glucosa para eliminar las enzimas utilizadas para la hidrólisis enzimática. Eliminar y/o reciclar las enzimas utilizadas para la hidrólisis enzimática puede reducir la cantidad de enzima necesaria para la hidrólisis enzimática y, por lo tanto, los costos asociados con la producción de azúcares celulósicos. Por ejemplo, los métodos y las composiciones descritos en esta memoria se pueden utilizar para recuperar al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 85 % de la actividad de la enzima celulasa en una corriente de reciclaje de enzima después de la hidrólisis enzimática. La corriente de reciclaje de enzimas puede reciclarse para continuar tratando la celulosa activada y/o puede utilizarse para tratar celulosa activada nueva, tal como una segunda corriente de celulosa activada como se describe en esta memoria. En algunas realizaciones, la corriente de azúcar rica en glucosa se somete a múltiples tratamientos de eliminación de enzimas, ya sea el mismo tratamiento de eliminación de enzimas repetido más de una vez o diferentes tratamientos de eliminación de enzimas.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una corriente de azúcar rica en glucosa producida mediante un método como se describe en esta memoria. En una realización, la corriente de azúcar comprende más del 12 %, más del 14 %, más del 16 % o más del 18 % de glucosa. En una realización, la corriente de azúcar comprende ácido poliaspártico. En algunas realizaciones, el ácido poliaspártico está presente en una concentración entre 1 ppb y 10000 ppm.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para producir una corriente de azúcar rica en glucosa que comprende (a) proporcionar celulosa activada que comprende una mezcla de celulosa II, celulosa hidratada II y álcali-celulosa IV; y someter la celulosa activada a hidrólisis enzimática con una o más enzimas celulasa, un tensioactivo y un dispersante para producir la corriente de azúcar rica en glucosa. Opcionalmente, la celulosa activada se produce utilizando un método descrito en esta memoria.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una corriente de azúcar rica en glucosa que comprende, además, un azúcar sin glucosa, en donde el azúcar sin glucosa es uno o más de xilosa, xilo-oligosacárido y xilano. En una realización, los azúcares distintos de la glucosa comprenden aproximadamente 3-8 %, aproximadamente 4-7 % o aproximadamente 5-6 % de la materia seca de la composición. En una realización particular, la corriente de azúcar rica en glucosa comprende aproximadamente 5 % de azúcar sin glucosa.

De acuerdo con la invención, se proporciona una corriente de azúcar rica en fructosa, preparada mediante la conversión de la glucosa en la corriente de azúcar rica en glucosa de la invención en fructosa. La corriente de azúcar rica en fructosa comprende, además, un azúcar sin fructosa, en donde el azúcar sin fructosa es uno o más de xilosa, xilo-oligosacárido y xilano. En una realización, los azúcares distintos de fructosa comprenden aproximadamente 1-8 %, aproximadamente 2-7 % o aproximadamente 3-6 % de la materia seca de la composición. En una realización particular, la corriente de azúcar rica en fructosa comprende aproximadamente 5 % de azúcar sin glucosa.

Otras características y ventajas de la presente divulgación resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

DIBUJOS

Los dibujos incluidos en esta memoria son para ilustrar diversos ejemplos de métodos y composiciones de las enseñanzas de la presente memoria descriptiva y no pretenden limitar el alcance de lo que se enseña de modo alguno.

La divulgación se describirá ahora en relación con el dibujo en el que:

La Figura 1 es un diagrama de flujo esquemático del método de acuerdo con una realización preferida que incluye una activación en dos etapas de una materia prima celulósica, una hidrólisis enzimática de la materia prima activada y un tratamiento de eliminación de enzimas para obtener una corriente de reciclaje de enzimas y una sustancia rica en glucosa y corriente de azúcar pobre en enzimas.

DESCRIPCIÓN DE DIVERSAS REALIZACIONES

Con posterioridad se describirán diversos métodos y composiciones para proporcionar un ejemplo de una realización de cada invención reivindicada. Ninguna realización descrita posteriormente limita cualquier invención reivindicada y cualquier invención reivindicada puede cubrir métodos y composiciones que difieren de los descritos con posterioridad. Las invenciones reivindicadas no se limitan a métodos y composiciones que tienen todas las características de cualquier método y composición descritos posteriormente ni a características comunes a múltiples o todos los métodos y composiciones descritos más adelante. Es posible que un método o una composición descrito con posterioridad no sea una realización de invención reivindicada alguna. Cualquier invención descrita en un método o una composición descrita posteriormente que no se reivindique en este documento puede ser objeto de otro instrumento de protección, por ejemplo, una solicitud de patente continua, y la solicitante, los inventores o propietarios no tienen la intención de abandonar, renunciar o dedicar al público cualquier invención mediante su divulgación en este documento.

En esta memoria se describen diversos métodos y composiciones útiles para el tratamiento de biomasa celulósica para producir azúcares celulósicos. En una realización, se proporciona un método para activar una materia prima celulósica para producir celulosa activada. Se ha determinado que someter una materia prima celulósica a una primera etapa de activación a alta temperatura y presión, seguida de una segunda etapa de activación con un álcali a una temperatura más baja que la primera etapa de activación produce celulosa activada con propiedades químicas y/o físicas que son ventajosas para la hidrólisis de celulosa en azúcares monoméricos.

Los métodos descritos en esta memoria utilizan una materia prima celulósica 10. La materia prima celulósica 10 puede ser cualquier materia prima conocida en la técnica del azúcar celulósico. Por ejemplo, la materia prima celulósica puede comprender uno o más de paja, rastrojos de maíz, bagazo, maderas duras, maderas blandas, cultivos energéticos y similares.

La materia prima agrícola que se proporciona a una planta se puede tratar para eliminar rocas, tierra y otros materiales presentes en la materia prima agrícola y para reducir el tamaño de la materia prima agrícola o forestal que se alimenta al proceso, tal como mediante trituración, molienda o tratamiento de otro modo.

Como se ejemplifica en la Figura 1, la materia prima celulósica 10 puede alimentarse al reactor 14 en el que la materia prima celulósica 10 se somete a una primera etapa de activación para producir una primera corriente de celulosa activada 16. En la primera etapa de activación, la materia prima celulósica 10 puede tratarse a una temperatura y presión elevadas para producir la primera corriente de celulosa activada 16 que comprende celulosa II y sólidos insolubles.

El reactor 14 puede ser un reactor discontinuo o un reactor de proceso continuo. En el caso de un reactor discontinuo, se puede alimentar materia prima celulósica 10 al reactor 14 y el reactor, que puede ser un reactor de tanque agitado, se puede elevar a las condiciones operativas durante un tiempo deseado. Si el reactor 14 es un reactor de flujo continuo, entonces puede ser un reactor de exposición al vapor como se conoce en la técnica y puede mantenerse en las condiciones operativas deseadas.

La primera etapa de activación se puede realizar en condiciones que aumentan la cantidad de celulosa II en la primera corriente de celulosa activada con respecto a la cantidad de celulosa II en la materia prima.

La temperatura puede ser superior a 190 °C y, opcionalmente, superior a 210 °C, preferiblemente superior a 220 °C y puede ser inferior a aproximadamente 250 °C. Por consiguiente, el proceso se puede realizar a una temperatura en el intervalo de 190 °C - 250 °C, 210 °C - 250 °C, 220 °C - 240 °C o 222 °C - 230 °C.

La presión puede ser superior a 200 psig (13,8 bares) y opcionalmente inferior a 500 psig (34,5 bares). La presión en el reactor corresponde como mínimo a la temperatura de acuerdo con la termodinámica del vapor saturado. En una realización, la presión se puede aumentar por encima de ese valor añadiendo un gas presurizado o añadiendo sobrecalentamiento.

La materia prima celulósica 10 puede someterse a la primera etapa de activación durante menos de 30 minutos, menos de 20 minutos, menos de 10 minutos o menos de 5 minutos. La duración del tiempo de tratamiento variará dependiendo de muchos factores, incluida la intensidad de la etapa de activación, p. ej., la temperatura y presión del reactor 14.

5 Se apreciará que las temperaturas, presiones y la duración del tratamiento se pueden combinar en cualquier combinación deseada. Por consiguiente, por ejemplo, la primera etapa de activación puede comprender someter la materia prima a una presión entre 200 y 500 psig (13,8 y 34,5 bares) y una temperatura entre 200 y 250 °C durante 1 a 30 minutos, o una presión entre 200 y 500 psig (13,8 y 34,5 bares) y una temperatura entre 190 y 215 °C durante menos de 4 minutos.

10 Opcionalmente, la primera etapa de activación se realiza en presencia de agua. Se puede introducir agua en el reactor 14 estando presente en la materia prima celulósica 10, estando presente en el reactor 14 cuando la materia prima celulósica se introduce en el reactor 14 y siendo introducida por la corriente de alimentación 12. La cantidad total de humedad que se introduce en el reactor puede ser al menos del 30 % y puede llegar hasta el 90 %. En una realización particular, un 50 % de humedad entra en el reactor.

15 El agua que está presente en el reactor 14 puede estar en forma de vapor o agua líquida y preferiblemente está en forma de agua líquida. Se apreciará que la temperatura y presión de la primera etapa de activación se pueden seleccionar de manera que haya agua líquida presente en el reactor 14.

20 La primera corriente de celulosa activada 16 puede tener un contenido de sólidos de entre aproximadamente 30 % y 50 % de sólidos en peso. Los sólidos comprenderán principalmente celulosa que podrá someterse posteriormente a una segunda etapa de activación. Los sólidos pueden comprender, además, lignina, hemicelulosa y componentes menores tales como cenizas, proteínas o extractos.

25 Opcionalmente, el material celulósico puede someterse a una o más etapas de lavado, ya sea en las mismas condiciones o en condiciones diferentes, después de la primera y/o segunda etapa de activación. Con este fin, la primera corriente de celulosa activada 16 puede someterse a una o más etapas de lavado antes de la segunda etapa de activación con el fin de eliminar componentes no celulósicos solubles tales como hemicelulosa y algunas cenizas, extractos y lignina. El primer lavado elimina estos componentes solubles y, debido a que los componentes solubles tienen un pH ácido, la etapa de lavado también reduce el requisito de álcali en la segunda etapa de activación alcalina.

30 Como se ejemplifica en la Figura 1, la primera corriente de celulosa activada 16 y el agua de lavado 20 pueden introducirse en el reactor de lavado 18 para producir agua residual 22 y una primera corriente de celulosa activada 24 lavada.

35 El agua de lavado 20 puede ser agua caliente, tal como agua a una temperatura entre aproximadamente 40 °C y 100 °C o entre aproximadamente 50 °C y 95 °C. La corriente de agua residual 22 puede tratarse y reciclarse en el proceso o en otro lugar o desecharse.

40 El reactor de lavado 18 puede tener cualquier diseño conocido en la técnica. Opcionalmente, el reactor de lavado 18 puede funcionar en contracorriente y puede ser un filtro de cinta en contracorriente. Se pueden utilizar otros métodos de filtración o separación, tales como un filtro prensa, una prensa de doble alambre, una prensa de doble rodillo, un filtro de vacío giratorio o una centrífuga.

45 Como se ejemplifica en la Figura 1, la primera corriente de celulosa activada 24 lavada puede alimentarse al reactor 26 en el que la primera corriente de celulosa activada 24 lavada se somete a una segunda etapa de activación para producir una segunda corriente de celulosa activada 30. En realizaciones alternativas, algo o toda la primera corriente de celulosa activada se puede introducir en el reactor 26. La siguiente descripción se basa en la Figura 1, que ejemplifica el uso de una primera etapa de lavado. En la segunda etapa de activación, la primera corriente de celulosa activada 24 lavada puede tratarse con un álcali a una temperatura más baja que la primera etapa de activación para producir una segunda corriente de celulosa activada que comprende celulosa IV.

50 El reactor 26 puede ser un reactor discontinuo o un reactor de proceso continuo. En el caso de un reactor discontinuo, la primera corriente de celulosa activada 24 lavada se puede alimentar al reactor 26 y el reactor, que puede ser un reactor de tanque agitado, se puede elevar a las condiciones operativas durante un tiempo deseado. Si el reactor 26 es un reactor de flujo continuo, entonces puede ser un reactor de exposición al vapor como se conoce en la técnica y puede mantenerse en las condiciones operativas deseadas.

55 La segunda etapa de activación se puede realizar en condiciones que aumentan la cantidad de celulosa IV en la segunda corriente de celulosa activada con respecto a la cantidad de celulosa IV en la primera corriente de celulosa activada 24 lavada.

60 La temperatura es opcionalmente superior a 60 °C, y puede ser inferior a aproximadamente 180 °C, inferior a aproximadamente 160 °C, inferior a aproximadamente 140 °C, inferior a aproximadamente 120 °C, inferior a

aproximadamente 100 °C o inferior a aproximadamente 80 °C. Por consiguiente, el procedimiento se puede realizar a una temperatura en el intervalo de 60 °C - 180 °C, 60 °C - 160 °C, 60 °C - 140 °C, 60 °C - 120 °C, 60 °C - 100 °C o 60 °C - 80 °C.

5 Opcionalmente, la segunda etapa de activación se realiza a presión superatmosférica. Por ejemplo, la presión superatmosférica puede ser una presión entre aproximadamente 0,1 y 400 psig (0,007 y 27,6 bares).

10 La primera corriente de celulosa activada 24 lavada puede someterse a la segunda etapa de activación durante menos de 180 minutos, menos de 120 minutos, menos de 90 minutos o menos de 60 minutos y, opcionalmente, más de 15 minutos, más de 30 minutos o más de 45 minutos. La duración del tiempo de tratamiento variará dependiendo de muchos factores, incluida la intensidad de la etapa de activación, p. ej., la temperatura y presión del reactor 26.

15 Se apreciará que las temperaturas, presiones y la duración del tratamiento se pueden combinar en cualquier combinación deseada. Por consiguiente, por ejemplo, la segunda etapa de activación puede comprender someter la primera corriente de celulosa activada a una temperatura entre 60 y 240 °C durante 15 a 120 minutos a una presión de 0 a 500 psig (0 a 34,5 bares) o una temperatura entre 80 y 150 °C durante al menos al menos 60 minutos a una presión de 0 a 300 psig (0 a 20,7 bares).

20 Como se ejemplifica en la Figura 1, la segunda etapa de activación comprende preferiblemente tratar la primera corriente de celulosa activada en presencia de un álcali. El álcali puede introducirse en el reactor 26 de cualquier manera. Por ejemplo, como se ejemplifica, la corriente alcalina 28 se introduce por separado en el reactor 26. Se apreciará que la corriente alcalina 28 puede introducirse en el reactor 26 antes, simultáneamente con o después de la introducción de la primera corriente de celulosa activada 24 lavada en el reactor 26. Alternativamente, se puede introducir una corriente alcalina 28 en la primera corriente de celulosa activada 24 lavada y después introducir una corriente combinada en el reactor 26.

25 El álcali puede comprender uno o más de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de magnesio y amoníaco. En una realización, el álcali es hidróxido de sodio. En una realización, el álcali se carga entre aproximadamente el 10 % y el 1 %, entre aproximadamente el 7 % y el 2 % o preferiblemente menos del 6 % del total de sólidos insolubles en la primera corriente de celulosa activada 24. El álcali hincha la celulosa y, además, la rompe enlaces hidrógeno intermoleculares e intramoleculares de la celulosa, modificando así adicionalmente la estructura cristalina.

30 Opcionalmente, la segunda etapa de activación se puede realizar en presencia de un agente oxidante y/o una enzima tal como una lacasa y/o una enzima modificadora de lignina.

35 Ejemplos de agentes oxidantes adecuados para uso en la segunda etapa de activación incluyen, pero no se limitan a peróxido de hidrógeno (H₂O₂). En una realización, el agente oxidante se carga en menos de aproximadamente el 2 % y/o más de aproximadamente el 0,0001 % del total de sólidos insolubles en la primera corriente de celulosa activada 16/24. En una realización, el agente oxidante se carga a menos de aproximadamente el 1 %, menos de aproximadamente el 0,1 % o menos de aproximadamente el 0,001 % del total de sólidos insolubles en la primera corriente de celulosa activada 16/24, opcionalmente entre aproximadamente el 1 % y el 0,0001 %.

40 Ejemplos de enzimas adecuadas para uso en la segunda etapa de activación incluyen, pero no se limitan a enzimas modificadoras de lignina tales como la enzima oxidante de lacasa.

45 La segunda corriente de celulosa activada 30 puede tener un contenido de sólidos de entre aproximadamente 5 % y 50 % de sólidos en peso, preferiblemente entre aproximadamente 20 % y 35 % de sólidos. Los sólidos comprenderán principalmente celulosa que opcionalmente puede recuperarse y reciclarse. Otros componentes serán hemicelulosa y lignina, ambas inferiores al 20 %.

50 Opcionalmente, la segunda corriente de celulosa activada 30 puede someterse a una o más etapas de lavado después de la activación para eliminar el álcali y la lignina solubilizada.

55 La segunda corriente de celulosa activada 30 y el agua de lavado 34 pueden introducirse en el reactor de lavado 32 para producir agua residual 36 y una segunda corriente de celulosa activada 38 lavada. El reactor de lavado 32 se puede hacer funcionar de manera similar al reactor de lavado 18 o de manera diferente.

60 El agua de lavado 34 puede ser agua caliente, tal como agua a una temperatura entre aproximadamente 50 °C y 95 °C o entre aproximadamente 60 °C y 95 °C. La corriente de agua residual 36 puede tratarse y reciclarse en el proceso o en otro lugar o desecharse.

65 El reactor de lavado 32 puede tener cualquier diseño conocido en la técnica. Opcionalmente, el reactor de lavado 32 puede funcionar en contracorriente y puede ser un filtro de cinta en contracorriente. Se pueden utilizar otros métodos de filtración o separación, tales como un filtro prensa, una prensa de doble alambre, una prensa de doble rodillo, un filtro de vacío giratorio o una centrifuga.

Se ha demostrado que una ventaja de someter una materia prima celulósica a una primera etapa de activación a alta temperatura seguido de una segunda etapa de activación a una temperatura más baja en condiciones alcalinas aumenta el nivel de glicano y disminuye el nivel de lignina en la segunda corriente de celulosa activada 30 con respecto a una materia prima sometida únicamente a una primera etapa de activación a alta temperatura. Sin limitarse a teoría alguna, se cree que el procedimiento de activación de dos etapas descrito en esta memoria altera la cristalinidad de la celulosa en la materia prima y mejora las características físicas y/o químicas de la celulosa para la hidrólisis enzimática. En una realización, el procedimiento de activación de dos etapas da como resultado celulosa activada que comprende celulosa II y álcali-celulosa IV.

Una persona experta apreciará que la celulosa existe en varias estructuras cristalinas diferentes, correspondientes a la ubicación de los enlaces hidrógeno entre y dentro de las cadenas. Por ejemplo, la celulosa natural que se encuentra en la biomasa celulósica es celulosa I, con estructuras I_α e I_β. La celulosa en las fibras de celulosa regenerada es típicamente celulosa II. Las fibras de celulosa regenerada se refieren a fibras producidas mediante el proceso de viscosa para la producción de viscosa de celofán o rayón. La conversión de celulosa I en celulosa II es irreversible. Las estructuras de celulosa III y celulosa IV se pueden producir mediante diversos tratamientos químicos. Las diferentes formas cristalinas de celulosa pueden identificarse mediante patrones característicos de difracción de rayos X. Celulosa y las diferentes estructuras cristalinas de celulosa se describen con más detalle en Perez y Samain, "Structure and Engineering of Cellulose" Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 64, Elsevier (2010),

La segunda corriente de celulosa activada 38 lavada se puede someter a hidrólisis enzimática en el reactor 40 de hidrólisis enzimática con una o más enzimas celulasa 42 para producir una corriente 44 de azúcar rica en glucosa. Se apreciará que parte o la totalidad de la segunda corriente de celulosa activada 30 se puede someter a hidrólisis enzimática y, por consiguiente, solo una parte o nada de la segunda corriente de celulosa activada 30 se puede someter a lavado. La siguiente descripción puede aplicarse a la segunda corriente de celulosa activada 30, esté o no sometida a una etapa de lavado.

Sorprendentemente se ha determinado que la celulosa activada que contiene celulosa II (que puede ser una combinación de celulosa II y celulosa hidratada II) y celulosa IV (que puede ser álcali-celulosa IV) que puede producirse mediante el procedimiento de activación de dos etapas descrito en esta memoria es particularmente susceptible a la hidrólisis enzimática. En particular, la celulosa activada ha mostrado una capacidad sorprendente para adsorber enzimas celulasa. Poner en contacto la celulosa activada con una o más enzimas celulasa en una corriente de azúcar rica en glucosa puede dar como resultado inicialmente que las enzimas sean adsorbidas en la celulosa activada. Luego, la celulosa puede eliminarse de la corriente de azúcar rica en glucosa y, opcionalmente, introducirse en el reactor de hidrólisis enzimática 40.

Por lo tanto, la celulosa activada producida mediante cualquier método descrito en esta memoria puede someterse a hidrólisis enzimática para descomponer la celulosa en azúcares celulósicos tales como glucosa. Alternativamente, el proceso de hidrólisis enzimática descrito en esta memoria se puede utilizar con cualquier materia prima celulósica para hidrólisis enzimática convencional.

Por consiguiente, la celulosa activada, opcionalmente una segunda corriente de celulosa activada como se describe en esta memoria, se puede poner en contacto con una o más enzimas celulasa para producir la corriente de azúcar rica en glucosa. Como se ejemplifica en la Figura 1, la segunda corriente de celulosa activada 30 lavada y la corriente de enzima 42 se introducen en el reactor de hidrólisis enzimática 40 para producir la corriente de azúcar rica en glucosa 44. La segunda corriente de celulosa activada 30 lavada se puede introducir en el reactor de hidrólisis enzimática 40 antes de, simultáneamente con o después de la introducción de la corriente de enzima 42 en el reactor 40. Alternativamente, o además, la corriente de enzima 42 se puede introducir en la segunda corriente de celulosa activada lavada 30 y la corriente combinada se puede introducir en el reactor de hidrólisis enzimática 40.

El reactor de hidrólisis enzimática 40 puede ser cualquier reactor de hidrólisis enzimática conocido en la técnica y puede funcionar de forma discontinua o continua. El reactor de hidrólisis enzimática 40 puede funcionar a cualquier temperatura y presión convencionales, carga de celulosa, carga de enzimas y similares. Por ejemplo, el reactor de hidrólisis enzimática 40 puede funcionar a un intervalo de temperaturas de 40 °C a 55 °C.

Las enzimas celulasa pueden seleccionarse para descomponer la celulosa en azúcares monoméricos. Por ejemplo, las enzimas celulasa pueden seleccionarse para hidrolizar enlaces 1,4-beta-D-glicosídicos en monosacáridos. La una o más enzimas celulasa pueden comprender una enzima con al menos una de entre actividad celobiohidrolasa, endoglucanasa y beta-glucosidasa. Si bien las preparaciones de enzima celulasa pueden aislarse de un cierto número de fuentes tales como cultivos naturales de bacterias, levaduras u hongos, un experto en la técnica apreciará el uso de enzimas producidas usando técnicas recombinantes. Ejemplos de enzimas disponibles comercialmente adecuadas para uso con los métodos descritos en esta memoria incluyen, pero no se limitan a Novozymes Ctec 2 o 3, AB Enzymes Rohament.

La una o más enzimas celulasa se pueden añadir con una carga de 0,1 a 120 mg, 0,2 a 60 mg o 1 a 30 mg de proteína enzimática por gramo de glucano. En una realización, las enzimas celulasa se añaden a una carga de 0,1 a 5 mg de

5 proteína enzimática por gramo de glucano en la celulosa activada. En una realización, la una o más enzimas celulasa se añaden a la celulosa activada con una carga de aproximadamente 2 a aproximadamente 60 unidades de papel de filtro (UPF)/g de glucano u, opcionalmente, con una carga de aproximadamente 2 a 30 o 1 a 15 UPF/g de glucano. La una o más enzimas celulasa se pueden añadir por separado a la celulosa activada directamente o se pueden combinar primero con un tensioactivo y/o dispersante como se describe posteriormente.

10 La una o más enzimas celulasa se pueden poner en contacto con la celulosa activada durante un período de tiempo adecuado (p. ej., entre 24-144 horas, entre 48-144 horas, entre 48-60 horas o entre 24 y 72 horas) para convertir la celulosa en azúcares monoméricos mediante hidrólisis enzimática.

15 En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % del rendimiento teórico de glucosa basado en el contenido de glucano de la celulosa activada se convierte en glucosa durante la hidrólisis enzimática para producir una corriente de azúcar rica en glucosa. En algunas realizaciones, la hidrólisis enzimática se realiza durante un período de tiempo predeterminado o hasta que se obtiene un rendimiento predeterminado de glucosa. Después de un cierto período de tiempo, la tasa de producción de glucosa a partir de la hidrólisis enzimática de celulosa puede disminuir a medida que el sustrato de celulosa se agota o la presencia de glucosa inhibe la actividad de las enzimas celulasa.

20 Opcionalmente, se puede poner en contacto una celulosa activada con una o más enzimas celulasa en presencia de un tensioactivo y/o un dispersante. En una realización preferida, el dispersante es ácido poliaspártico.

25 Sorprendentemente se ha determinado que someter la celulosa activada, particularmente la celulosa activada descrita en esta memoria, a hidrólisis enzimática en presencia de un tensioactivo y/o un dispersante tal como ácido poliaspártico ofrece un cierto número de ventajas para la producción de azúcares monoméricos. Por ejemplo, la presencia del tensioactivo y/o dispersante puede aumentar la estabilidad de la enzima celulasa, ayudar a proteger las enzimas celulasa de la degradación, prevenir la unión irreversible y/o mejorar la actividad de la enzima celulasa. También se cree que la presencia del tensioactivo y/o dispersante mejora la recuperación de enzimas celulasa en una corriente de reciclaje de enzimas después de la hidrólisis enzimática. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las enzimas celulasa pueden utilizarse para la hidrólisis enzimática de celulosa activada, eliminarse de la corriente de azúcar rica en glucosa resultante y reciclarse al reactor de hidrólisis enzimática 40 o ponerse en contacto con celulosa activada nueva para hidrólisis enzimática adicional. En algunas realizaciones, las enzimas celulasa se pueden utilizar y reciclar en al menos 3 o 4 rondas de hidrólisis enzimática, durando cada ciclo entre 48 y 72 horas.

35 El tensioactivo es un tensioactivo no iónico, opcionalmente un tensioactivo de polisorbato tal como Tween. El tensioactivo también puede ser una mezcla de tensioactivos. En una realización preferida, el tensioactivo es una mezcla de Tween 80, un glicérido alcoxilado y nonilfenol. En una realización, el tensioactivo está presente en una carga inferior a aproximadamente el 2 % y/o superior a aproximadamente el 0,01 %. En una realización, el tensioactivo está presente en una carga de entre 1 % y 0,01 %, entre 0,5 % y 0,05 % o entre aproximadamente 0,1 % y 0,2 % del peso del contenido de celulosa en la celulosa activada.

40 El dispersante puede ser un oligopéptido, opcionalmente un polipéptido no enzimático con un peso molecular entre 1000 y 5000. El oligopéptido es ácido poliaspártico. El ácido poliaspártico tiene un peso molecular entre 1000 y 5000 o entre 3500 y 4500. El ácido poliaspártico puede estar presente en una carga inferior a aproximadamente el 2 % y/o superior a aproximadamente el 0,001 % del peso del contenido de celulosa en la celulosa activada. En algunas realizaciones, el ácido poliaspártico está presente en una carga de entre el 1 % y el 0,001 %, entre el 0,25 % y el 0,025 %, o aproximadamente el 0,1 % del peso del contenido de celulosa en la celulosa activada.

50 Opcionalmente, la relación de tensioactivo a dispersante (p. ej., ácido poliaspártico) en la mezcla de hidrólisis enzimática es de 0,5:1 a 2:1.

55 Por consiguiente, una mezcla de hidrólisis enzimática que comprende una o más enzimas celulasa, uno o más tensioactivos y uno o más dispersantes se puede utilizar en cualquier procedimiento de hidrólisis enzimática o se puede utilizar en asociación con cualquiera de los procedimientos de activación e hidrólisis enzimática descritos en esta memoria. La mezcla de hidrólisis enzimática es particularmente adecuada para la hidrólisis enzimática de celulosa activada que comprende celulosa II y celulosa IV como se describe en esta memoria.

60 La una o más enzimas celulasa, el tensioactivo y el dispersante pueden introducirse individualmente o en combinaciones o subcombinaciones en el reactor de hidrólisis enzimática 40. Por ejemplo, cada uno de ellos puede combinarse por separado con la celulosa activada (p. ej., cada uno puede añadirse secuencialmente a la corriente 38 o la corriente 38 se puede dividir en 3 corrientes y las enzimas celulasa, el tensioactivo y el dispersante se pueden añadir cada uno a una de las corrientes divididas) antes de introducir la corriente 38 en el reactor 40. Alternativamente, la una o más corrientes de enzimas celulasa, el tensioactivo y el dispersante se pueden combinar juntos para formar la corriente 42 antes de combinar la mezcla con la celulosa activada (p. ej., introduciendo la corriente 42 en el reactor 40 o introduciendo la corriente 42 en la corriente 38 antes de introducir la corriente 38 en el reactor 40). Se cree que combinar las enzimas, el tensioactivo y el dispersante antes de poner en contacto la celulosa activada facilita la formación de un complejo ternario que ayuda a estabilizar la enzima y prevenir la degradación de la enzima. Por

consiguiente, la una o más enzimas celulasa se pueden combinar con el tensioactivo y el dispersante antes de someter la celulosa activada a hidrólisis enzimática. Por ejemplo, la una o más enzimas celulasa se pueden combinar con el tensioactivo y el dispersante durante al menos 5 segundos, al menos 10 segundos, al menos 30 segundos o al menos 1 minuto antes de ponerlos en contacto con la celulosa activada (p. ej., corriente 38) o antes de someter la celulosa activada a hidrólisis enzimática.

Como se ejemplifica en la Figura 1, la corriente de azúcar rica en glucosa 44 puede someterse a una etapa de eliminación de enzimas para obtener una corriente de azúcar 48 rica en glucosa y pobre en enzimas y una corriente de reciclaje de enzimas 50. La etapa de eliminación de enzimas puede ser cualquier etapa de eliminación de enzimas conocida en la técnica y puede realizarse en cualquier equipo conocido en la técnica. Opcionalmente, la etapa de eliminación de enzimas comprende poner en contacto la corriente de azúcar rica en glucosa 44, p. ej., durante un tiempo limitado, con celulosa, que puede ser una celulosa activada producida mediante cualquier método descrito en esta memoria.

Por ejemplo, la etapa de eliminación de enzimas puede comprender:

(a) poner en contacto la corriente de azúcar rica en glucosa, incluyendo enzimas, con celulosa y obtener celulosa con las enzimas adsorbidas en ella; y

(b) someter la corriente de azúcar rica en glucosa a una etapa de eliminación de celulosa para obtener la corriente de azúcar rica en glucosa y pobre en enzimas que tiene un nivel reducido de celulosa y la corriente de reciclaje de enzimas.

Opcionalmente, la etapa (a) comprende poner en contacto la corriente de azúcar rica en glucosa con celulosa activada, opcionalmente una segunda corriente de celulosa activada producida de acuerdo con la presente invención.

Sin limitarse a teoría alguna, se cree que las enzimas en la corriente de azúcar rica en glucosa se adsorben sobre la celulosa de manera que la eliminación de la celulosa de la corriente de azúcar rica en glucosa elimina las enzimas de la corriente y da como resultado una corriente de azúcar 48 rica en glucosa y pobre en enzimas y una corriente de reciclaje de enzimas 50. En una realización particularmente preferida, las enzimas celulasa en la corriente de azúcar rica en glucosa están en presencia de un tensioactivo y un dispersante y las enzimas en la corriente de azúcar rica en glucosa 44 se eliminan poniendo en contacto la corriente de azúcar rica en glucosa 44 con celulosa activada 16, 24, 30, 38 producida utilizando los métodos descritos en esta memoria.

Por consiguiente, se puede introducir una corriente de celulosa 52 en el reactor 46. El reactor 46 puede comprender cualquier reactor que pueda permitir que la corriente de azúcar rica en glucosa 44 y la celulosa entren en contacto entre sí para eliminar enzimas de la solución y separar la celulosa con las enzimas absorbidas a la misma. Por consiguiente, por ejemplo, el reactor 46 puede comprender un reactor de tanque agitado o un reactor de flujo pistón para mezclar la corriente de azúcar rica en glucosa y celulosa para producir una corriente mixta 54.

La corriente de azúcar rica en glucosa y la celulosa pueden ponerse en contacto juntas durante menos de aproximadamente 2 horas, menos de aproximadamente 90 minutos o menos de aproximadamente 60 minutos y pueden ponerse en contacto juntas durante entre aproximadamente 10 minutos y 60 minutos, o entre aproximadamente 30 minutos y 90 minutos.

Posteriormente, la corriente mixta 54 se somete a una etapa de separación sólido-líquido en un separador 56. El separador 56 puede ser cualquier separador conocido en la técnica. El separador 56 puede utilizar cualquier técnica de separación conocida en la técnica, tal como filtración, decantación, separación por gravedad, centrifugación o uso de una prensa. Por ejemplo, el separador 56 puede comprender un filtro, una prensa, opcionalmente una prensa de doble tornillo, una prensa de doble alambre o una prensa de doble rodillo.

La corriente de reciclaje de enzima 50 puede ser una corriente con alto contenido de sólidos. Por ejemplo, la corriente de reciclaje de enzimas puede comprender más de aproximadamente el 30 %, más de aproximadamente el 40 % o más de aproximadamente el 50 % de sólidos celulósicos.

La corriente de reciclaje de enzimas 50 se puede utilizar para realizar hidrólisis enzimática en celulosa activada nueva. Alternativamente, la corriente de reciclaje de enzimas 50 se puede reciclar al reactor 40. Por consiguiente, si el reactor 40 se hace funcionar sobre una base discontinua, se puede retirar una corriente de purga de una corriente de azúcar rica en glucosa y tratarla para obtener la corriente de reciclaje 50. Sorprendentemente, se ha determinado que las enzimas recicladas por este procedimiento generalmente mantienen su actividad después de ser recicladas una, dos, tres o incluso cuatro veces. Como resultado, la corriente de azúcar rica en glucosa 48 puede comprender más de aproximadamente un 12 % de glucosa, más de aproximadamente un 14 % de glucosa, más de aproximadamente un 16 % de glucosa o más de aproximadamente un 18 % de glucosa. Además, se puede obtener un rendimiento de glucosa que es superior a aproximadamente el 70 %, superior a aproximadamente el 80 %, superior a aproximadamente el 85 %, superior a aproximadamente el 90 % o superior a aproximadamente el 95 % de un rendimiento teórico de glucosa.

Opcionalmente, la corriente de azúcar rica en glucosa 48 puede comprender un nivel detectable de ácido poliaspártico. En una realización, la corriente de azúcar comprende entre aproximadamente 1 ppb y 10000 ppm de ácido poliaspártico.

5 Sorprendentemente, se ha encontrado que la corriente de azúcar rica en glucosa resultante de la hidrólisis enzimática de la celulosa activada descrita en esta memoria contiene aproximadamente un 5 % de azúcares no glucosa que son uno o más de xilosa, oligómeros de xilosa (xilo-oligosacárido) y xilano. Los xilo-oligosacáridos como se describen en esta memoria se refieren a polímeros de xilosa que tienen un grado de polimerización (dp) de aproximadamente 2 a
10 aproximadamente 10. El xilano como se describe en esta memoria se refiere a polímeros de xilosa que tienen un grado de polimerización (dp) de >10.

De acuerdo con la presente invención, la hidrólisis enzimática de la celulosa activada se puede llevar a cabo usando la mezcla de hidrólisis como se describe en esta memoria. De acuerdo con la presente invención, la corriente de
15 azúcar rica en glucosa se prepara utilizando el método de activación de celulosa y/o el método de hidrólisis enzimática descrito en esta memoria.

También se sabe que la glucosa obtenida de fuentes tales como el maíz utilizando métodos estándares tiene aproximadamente un 5 % de azúcares distintos de la glucosa. Sin embargo, los azúcares distintos de la glucosa que se encuentran en la glucosa del maíz son azúcares de mayor índice glucémico, tales como maltosa, maltotriosa y
20 sacáridos superiores de dextrosa.

En una realización, los azúcares distintos de glucosa que se encuentran en la corriente de azúcar rica en glucosa descrita en esta memoria comprenden aproximadamente el 1-8 %, aproximadamente el 2-7 % o aproximadamente el
25 3-6 % de la materia seca de la composición y son uno o más de xilosa, xilo-oligosacáridos y xilano. En una realización particular, se encontró que la materia seca de la corriente de azúcar rica en glucosa comprendía 95 % de glucosa, 4 % de xilosa y 1 % de xilo-oligosacáridos.

La glucosa obtenida a partir de los métodos descritos en esta memoria se puede convertir en fructosa utilizando métodos conocidos tales como isomerización de glucosa a fructosa como se describe, por ejemplo, por S.Z. Dziedzic
30 et al., "Handbook of starch hydrolysis products and their derivatives" 31 de diciembre de 1995, páginas 55-58. Se ha encontrado que la fructosa obtenida a partir de la conversión de la glucosa obtenida mediante los métodos descritos en esta memoria también contiene aproximadamente 3-5 % de azúcar no glucosa, en donde el azúcar no glucosa es xilosa y/u oligómeros de xilosa.

De acuerdo con la invención, se proporciona una corriente de azúcar rica en fructosa, preparada mediante la conversión de la glucosa en la corriente de azúcar rica en glucosa descrita en esta memoria en fructosa. La corriente de
35 azúcar rica en fructosa comprende también un azúcar no fructosa, en donde el azúcar no fructosa es uno o más de xilosa, xilo-oligosacárido y xilano. En una realización, los azúcares distintos de fructosa comprenden aproximadamente 1-8 %, aproximadamente 2-7 % o aproximadamente 3-6 % de la materia seca de la composición.

De acuerdo con la presente invención, la invención proporciona un producto de glucosa con índice glucémico más bajo o un producto de fructosa con índice glucémico más bajo, en donde el producto de glucosa o el producto de fructosa comprende aproximadamente 1-8 %, aproximadamente 2-7 % o aproximadamente 3-6 %, preferiblemente
45 5 % de azúcar no glucosa o no fructosa y en donde el azúcar no glucosa o no fructosa es uno o más de xilosa, xilo-oligosacáridos y xilano.

De acuerdo con la invención, el índice glucémico del producto de glucosa o del producto de fructosa es menor que el índice glucémico del jarabe de glucosa o fructosa convencional producido de manera convencional. El índice glucémico (IG) se puede medir utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo como se describe en "In vitro
50 method for predicting glycemic index of foods using simulated digestion and an artificial neural network" R. L. Magaletta et al., Cereal Chemistry vol. 87, nº 4, 2010.

El producto de glucosa o el producto de fructosa obtenido mediante los métodos descritos en esta memoria se puede sustituir por glucosa o fructosa con un índice glucémico más alto en la producción de diversos alimentos y bebidas para proporcionar un producto con un índice glucémico más bajo. Los alimentos y bebidas con un índice glucémico más bajo pueden proporcionar ventajas para la salud en el control de los niveles de azúcar e insulina en la sangre, lo que a su vez puede reducir el riesgo de enfermedades cardíacas y/o diabetes. Los alimentos que tienen un índice glucémico más bajo también pueden ser útiles para controlar el apetito y la pérdida de peso.
60

Se apreciará que una o más de las realizaciones descritas en esta memoria para la activación de una materia prima celulósica se pueden utilizar junto con una o más realizaciones descritas en esta memoria para la hidrólisis enzimática de celulosa con el fin de producir azúcares celulósicos a partir de una materia prima celulósica.

Lo que se ha descrito anteriormente ha pretendido ser ilustrativo de la invención y no limitativo y se entenderá por personas expertas en la técnica que se pueden realizar otras variantes y modificaciones sin apartarse del alcance de
65

la invención tal como se define en las reivindicaciones. El alcance de las reivindicaciones no debe limitarse por las realizaciones y ejemplos preferidos, sino que se le debe dar la interpretación más amplia coherente con la descripción en su conjunto.

5 Si bien la divulgación anterior describe en general la presente solicitud, se puede obtener una comprensión más completa haciendo referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la divulgación. Se contemplan cambios de forma y sustitución de equivalentes según lo sugieran las circunstancias o lo hagan conveniente siempre que estén dentro del alcance de las reivindicaciones. Aunque en esta memoria se han empleado expresiones y términos específicos, dicha expresiones y términos tienen un sentido descriptivo y no tienen fines de limitación.

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la presente divulgación:

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Tratamiento de Bagazo de Caña de Azúcar para Activar Celulosa

Se investigaron diversos métodos para activar la celulosa utilizando bagazo de caña de azúcar. El bagazo de caña de azúcar se sometió a una primera etapa de tratamiento con vapor a 220 °C, un tiempo de permanencia de 5 minutos, seguido de un lavado con agua caliente a 80°C o un primer tratamiento con vapor seguido de un tratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino. Lavado alcalino a 90 °C, 60 minutos o 120 minutos, y carga de peróxido al 1 % sobre sólidos.

Como se muestra en la Tabla 1, el uso del tratamiento de dos etapas con una etapa de tratamiento con vapor, seguida de peróxido de hidrógeno alcalino aumentó significativamente el nivel de glucano y disminuyó la cantidad de lignina en relación con el tratamiento con vapor y un lavado con agua caliente.

Tabla 1: Influencia del tratamiento con peróxido alcalino en la composición química del componente insoluble en agua del bagazo de caña de azúcar pretratado con vapor y posteriormente lavado con agua caliente* (% de peso seco). AHP-60 y AHP-120 se refieren a tratamientos de 60 y 120 minutos.

	Pretratado con vapor y lavado con agua caliente	AHP - 60*	AHP - 120**
Arabinano	BDL****	BDL	BDL
Galactano	BDL	BDL	BDL
Glucano	48,3 (0,7)	79,3 (1,4)	78,2 (0,7)
Xilano	3,6 (0,1)	3,7 (0,1)	3,7 (0,1)
Manano	BDL	BDL	BDL
Lignina (insoluble en ácidos)**	41,6 (1,6)	12,9 (0,3)	12,9 (0,3)
Lignina soluble en ácidos	0,7 (0,0)	0,6 (0,0)	0,5 (0,0)
Cenizas	3,2 (0,4)	1,7 (0,4)	1,9 (0,7)
* Tratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino			
** Tratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino			
***Una fracción menor de la lignina puede contener componentes de ceniza.			
****Por debajo del nivel detectable			

Ejemplo 2: Hidrólisis Enzimática de Bagazo de Caña de Azúcar Activado

Los componentes celulósicos insolubles en agua preparados en el Ejemplo 1 se sometieron luego a hidrólisis enzimática durante 72 horas. También se añadió el aditivo Comet S-001, que comprende una mezcla de un tensioactivo Tween 80 y un ácido poliaspártico dispersante con un PM de 3500-4500 en una relación de 1:1 a la mezcla de hidrólisis enzimática para el bagazo de caña de azúcar tratado con álcali.

Como se muestra en la Tabla 2, la hidrólisis enzimática del bagazo de azúcar tratado con álcali en presencia del aditivo Comet S-001 dio como resultado un rendimiento de glucosa de 105,1 gramos de glucosa por gramo de glucano, acercándose al rendimiento teórico de ~110 gramos de glucosa por gramo de glucano.

- 5 Tabla 2: Rendimiento de glucosa monomérica después de 72 horas de hidrólisis enzimática del componente celulósico insoluble en agua de bagazo de caña de azúcar pretratado con vapor y posteriormente tratado con peróxido alcalino (expresado como g por 100 g de glucano**).

Sustrato	Rendimiento de glucosa
Bagazo de caña de azúcar lavado con agua caliente	79,1 (2,6)***
Bagazo de caña de azúcar tratado con álcali + aditivo Comet-S-001	105,1 (1,5)
* Carga de celulosa: 31 mg de proteína por g de glucano	
**En teoría, 100 g de glucano deberían liberar ~110 g de glucosa.	
***Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándares de triplicados	

- 10 Además, como se muestra en la Tabla 3, la hidrólisis enzimática en presencia del aditivo Comet S-001 no alteró el rendimiento de xilosa monomérica en comparación con el bagazo de caña de azúcar tratado con álcali sometido a hidrólisis enzimática sin el aditivo. Por consiguiente, el aditivo no afectó negativamente al rendimiento.

- 15 Tabla 3: Rendimiento de xilosa monomérica después de 72 horas de hidrólisis enzimática* del componente celulósico insoluble en agua de bagazo de caña de azúcar pretratado con vapor y posteriormente tratado con peróxido alcalino (expresado como g por 100 g de sustrato**).

Sustrato	Rendimiento de xilosa
Bagazo de caña de azúcar tratado con álcalis	2,7 (0,2)***
Bagazo de caña de azúcar tratado con álcalis + aditivo Comet-S-001	2,7 (0,1)
*Véase la Tabla 2 para conocer las condiciones de hidrólisis enzimática	
**En teoría, 100 g de sustrato deberían liberar en teoría 4,1 g de xilosa (véase la Tabla 1 para conocer el contenido de xilano).	
***Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándares de triplicados	

- 20 El análisis de la fracción del contenido de proteína total presente en el sobrenadante después de 72 horas de hidrólisis enzimática se muestra en la Tabla 4. El uso del aditivo Comet S-001 dio como resultado una fracción más alta de proteína total, indicativo de los niveles más altos de enzimas dentro el sobrenadante y la estabilidad enzimática mejorada.

- 25 Tabla 4: Fracción de la proteína total presente en el sobrenadante después de 72 horas (expresada en g por cada 100 g de proteína añadida**).

	Fracción del total de proteínas en el líquido
Bagazo de caña de azúcar lavado con agua caliente	-
Bagazo de caña de azúcar tratado con álcalis	61,2 (2,2)
Bagazo de caña de azúcar tratado con álcalis + aditivo Comet-S001	77,2 (1,1)**
** Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándares de triplicados	

- 30 El bagazo de caña de azúcar tratado con álcali se sometió a múltiples rondas de hidrólisis de reciclaje en presencia del aditivo Comet S-001. Como se muestra en la Tabla 5, la hidrólisis de reciclaje fue capaz de producir un alto rendimiento y una alta concentración de glucosa con una pérdida mínima de enzimas a lo largo de rondas repetidas de hidrólisis enzimática.

Tabla 5: Resultados de la hidrólisis de reciclaje (Total 16 % de glucano)* del componente celulósico insoluble en agua del bagazo de caña de azúcar pretratado con vapor y posteriormente tratado con peróxido alcalino.

Intervalo de hidrólisis y adición de sustrato	Rendimiento de glucosa (%)	Concentración de glucosa (% p/v)	Rendimiento de xilosa***	Sólidos disueltos (p/p)	Fracción de las proteínas en el sobrenadante*****
Después de 48 horas**	83,9 (1,4)****	16,1 (0,3)	1,9 (0,2)	19,1 (0,2)	58,4 (1,3)
Después de las siguientes 48 horas	83,1 (0,9)	15,9 (0,2)	2,2 (0,0)	18,8 (0,2)	60,1 (2,4)
Después de las siguientes 48 horas	90,9 (0,3)	18,2 (0,1)	2,5 (0,0)	20,9 (0,1)	64,2 (0,8)
Después de las siguientes 48 horas	92,3 (2,1)	18,1 (0,4)	2,3 (0,1)	20,7 (0,5)	67,7 (1,5)
*16% de carga de glucano (~ 20% de carga de sólidos) del sustrato tratado con álcalis. La reacción se llevó a cabo a una escala total de 20 L.					
"Carga de celulosa: 31 mg de proteína por g de glucano añadido al comienzo de la hidrólisis. 0,2 % de S-001 en la mezcla de reacción, 6 mg de proteína enzimática complementaria por reciclaje					
***expresado como g/100 g de sustrato. 100 g de sustrato deberían liberar en teoría 41 g de xilosa (véase la Tabla 1 para conocer el contenido de xilano).					
**** Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándares de triplicados					
*****No tiene en cuenta la enzima adsorbida en el sustrato					

5

Ejemplo 3: Tratamiento de Paja de Trigo para Activar la Celulosa

10 Se investigaron métodos para activar una materia prima de celulosa utilizando paja de trigo. La paja de trigo se sometió a una primera etapa de tratamiento con vapor a 220 °C, tiempo de permanencia de 5 minutos, seguido de un lavado con agua caliente a 80 °C, seguido de un lavado alcalino a 90 °C durante 60 minutos y una carga de peróxido al 1 % sobre sólidos.

15 Como se muestra en la Tabla 6, el uso del tratamiento de dos etapas con peróxido de hidrógeno alcalino dio como resultado componentes insolubles en agua con una alta concentración de glucano (75,1 %).

Tabla 6: Composición química del componente insoluble en agua de la paja de trigo pretratada con vapor y posteriormente tratada con peróxido alcalino* (% de peso seco)

Arabinano	BDL***
Galactano	BDL
Glucano	75,1 (0,6)
Xilano	8,1 (0,1)
Manano	BDL
Lignina (insoluble en ácidos)**	13,5 (0,4)
Lignina soluble en ácidos	0,4 (0,0)
Cenizas	1,2 (0,3)
*El rendimiento de sólidos después del tratamiento con peróxido fue de 75,7. El tratamiento con peróxido alcalino se realizó con una consistencia del 10 %, pH 11,5 y una solución de peróxido al 1 %, 80 °C durante 2 horas.	
** Una fracción menor de la lignina puede contener componentes de ceniza	
*** Por debajo del nivel detectable	

5

Ejemplo 4: Hidrólisis Enzimática de Paja de Trigo Activada

Los componentes celulósicos insolubles en agua de la paja de trigo tratada con vapor o de la paja de trigo tratada con vapor y posteriormente tratada con álcalis se sometieron a hidrólisis enzimática como se muestra en las Tablas 7-9. También se añadió el tensioactivo Tween 80, como se indica en la tabla.

10

Tabla 7: Rendimiento de glucosa monomérica durante la hidrólisis enzimática (10 % de carga de glucano)* del componente celulósico insoluble en agua de paja de trigo pretratada con vapor y posteriormente tratada con peróxido alcalino (expresada como g por cada 100 g de glucano**).

15

	24 horas	72 horas
Paja de trigo lavada con agua caliente	----****	85,0 (2,1)
Paja de trigo lavada con agua caliente + Tween 80***	----	89,1 (0,5)
Paja de trigo tratada con peróxido	83,7 (1,1)*****	97,0 (0,3)
Paja de trigo tratada con peróxido + Tween 80	90,4 (0,1)	102,3 (2,9)
*13,3 % de carga de sólidos para sustrato tratado con peróxido y 17,9 % de carga de sólidos para paja de trigo pretratada con vapor para obtener un 10 % de carga de glucano. Carga de celulasa: 31 mg de proteína (CTec 2) por g de glucano		
**En teoría, 100 g de glucano deberían liberar ~110 g de glucosa.		
***0,2 % de Tween 80 en la mezcla de reacción		
****no se licuó lo suficiente como para obtener una muestra representativa para el análisis		
***** Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándares		

Tabla 8: Rendimiento de xilosa monomérica después de 72 horas de hidrólisis enzimática*** (10 % de carga de glucano)* del componente celulósico insoluble en agua de paja de trigo pretratada con vapor y posteriormente tratada con peróxido alcalino (expresada como g por cada 100 g de sustrato**)

20

	Rendimiento de xilosa
Paja de trigo lavada con agua caliente	6,1 (0,0)
Paja de trigo lavada con agua caliente + Tween 80	6,3 (0,2)
Paja de trigo tratada con peróxido alcalino	5,8 (0,0)
Paja de trigo tratada con peróxido alcalino + Tween 80	6,0 (0,1)

Tabla 9: Sólidos disueltos presentes en el hidrolizado enzimático de 72 horas de paja de trigo pretratada con vapor y posteriormente tratada con peróxido alcalino (% p/p)

	Sólidos disueltos (% p/p)
Paja de trigo lavada con agua caliente	13,8 (0,1)
Paja de trigo lavada con agua caliente + Tween 80	12,3 (0,0)
Paja de trigo tratada con peróxido alcalino	14,1 (0,2)
Paja de trigo tratada con peróxido alcalino + Tween 80	13,9 (0,1)

5

Se realizaron investigaciones adicionales de la hidrólisis enzimática de paja de trigo tratada con vapor y posteriormente tratada con peróxido alcalino con la adición de un tensioactivo (Tween 80) como se establece en las Tablas 10-12.

10 Tabla 10: Rendimiento de glucosa monomérica durante la hidrólisis enzimática por lotes alimentados (carga de glucano al 10%)* del componente celulósico insoluble en agua de paja de trigo pretratada con vapor y posteriormente tratada con peróxido alcalino con la adición de Tween 80 (expresada como g por 100 g de glucano total**).

	Después de las primeras 36 horas	Después de las siguientes 24 horas	Después de las siguientes 24 horas	Después de las siguientes 24 horas
Rendimiento de glucosa**	93,4 (0,5)***	72,7 (1,3)	61,5 (0,7)	49,7 (2,8)
Sólidos disueltos	12,9 (0,1)	10,0 (0,1)	8,4 (0,0)	6,9 (0,3)
*13,3 % de carga de sólidos para el sustrato tratado con peróxido para obtener una carga de 10 % de glucano. 0,2 % de Tween 80 en la mezcla de reacción solo al principio. Carga de celulosa: 31 mg de proteína (CTec 2) por g de glucano y 3,1 mg/g de glucano antes de añadir cada lote nuevo de los sustratos.				
**En teoría, 100 g de glucano deberían liberar ~110 g de glucosa.				
*** Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándares				

15 Tabla 11: Rendimiento de xilosa monomérica durante la hidrólisis enzimática por lotes alimentados (carga de glucano al 10%) del componente celulósico insoluble en agua de paja de trigo pretratada con vapor y posteriormente tratada con peróxido alcalino expresada como g por 100 g de sustrato total utilizado para la hidrólisis en cada etapa.

Después de las primeras 36 horas de hidrólisis enzimática	5,5 (0,1)
Después de las siguientes 24 horas	4,3 (0,0)
Después de las siguientes 24 horas	3,6 (0,1)
Después de las siguientes 24 horas	2,9 (0,0)

20 Tabla 12: Fracción de la proteína total presente en el sobrenadante antes de la adición de cada lote de sustratos y enzimas nuevos (expresada como % de la proteína total añadida**).

	Hidrólisis por lotes alimentados*				Hidrólisis por lotes**
	Después de las primeras 36 horas	Después de las siguientes 24 horas	Después de las siguientes 24 horas	Después de las siguientes 24 horas	Al final de las 72 horas
Fracción del total de proteínas en el líquido	61,6 (1,1)	63,3 (0,5)	63,1 (1,7)	66,2 (2,4)	72,7 (2,8)

Hidrólisis por lotes alimentados*				Hidrólisis por lotes**
Después de las primeras 36 horas	Después de las siguientes 24 horas	Después de las siguientes 24 horas	Después de las siguientes 24 horas	Al final de las 72 horas
*31,1 mg de carga de proteína/g de celulosa al comienzo del primer lote de hidrólisis y 3,1 mg de proteína/g de celulosa antes de la adición de cada nuevo lote de sustratos. Consistencia de glucano al 10 % en las primeras 36 horas, seguido de la adición de glucano al 10 % cada 24 horas siguientes. **Carga de proteína 31,1 mg/g de celulosa y consistencia de glucano al 10%				

Ejemplo 5

5 Se preparó un producto de glucosa celulósica obtenido mediante los métodos de activación y conversión enzimática descritos en esta memoria y se determinó que tenía las siguientes especificaciones:

Datos Químicos y Físicos

10 Sólidos totales 50-70 %

Humedad 30-50 %

Composición (base de materia seca):

15

Glucosa	95 %
Xilosa	4 %
Xilo-oligosacáridos	1 %
Cenizas	< 0,01 %
pH:	3-5
Conductividad:	(30 % DS) 50 µs/cm
Gravedad específica:	1,2
Aspecto:	solución transparente
Olor:	dulce

Contenido de Cenizas Minerales (PPM)

Cloruro	16
Sulfato	< 1
Calcio	5
Potasio	< 1
Magnesio	< 1
Sodio	2
Fósforo	2

20

Datos del Índice Glucémico

25 Se encontró que el producto de glucosa celulósica que tiene la composición arriba descrita tiene un índice glucémico (GI) de 72. En comparación, se sabe que la glucosa sola tiene un índice glucémico de 100. También se sabe que dextrosa tiene un índice glucémico de 100, mientras que se sabe que maltosa y maltodextrina tienen índices glucémicos de 105 y 110, respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una corriente de azúcar rica en glucosa a partir de celulosa activada, comprendiendo el método someter la celulosa activada a hidrólisis enzimática con una o más enzimas celulasa, un tensioactivo y ácido poliaspártico para producir la corriente de azúcar rica en glucosa,
 5 en el que el tensioactivo es un tensioactivo no iónico, en el que el ácido poliaspártico tiene un peso molecular entre 1000 y 5000 y en el que la relación de tensioactivo a ácido poliaspártico es de 0,5: 1 a 2:1.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la una o más enzimas celulasa se seleccionan para hidrolizar enlaces 1,4-beta-D-glicosídicos en monosacáridos, preferiblemente en el que la una o más enzimas celulasa comprenden una enzima con al menos uno de celobiohidrolasa, endoglucanasa y actividad beta-glucosidasa.
- 15 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la una o más enzimas celulasa forman un complejo ternario con el tensioactivo y el ácido poliaspártico.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la una o más enzimas celulasa están presentes en una carga de 0,1 a 5 mg de proteína enzimática por g de glucano, preferiblemente la una o más enzimas celulasa están presentes en una carga de 2 a 60 UPF/g de glucano.
- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende, además, someter la corriente de azúcar rica en glucosa a un tratamiento de eliminación de enzimas y obtener una corriente de azúcar rica en glucosa y pobre en enzimas y una corriente de reciclaje de enzimas, reciclar la corriente de reciclaje de enzimas a la hidrólisis enzimática.
- 30 6. El método de la reivindicación 5, que comprende:
 (a) poner en contacto la corriente de azúcar rica en glucosa con celulosa y obtener celulosa con las enzimas adsorbidas en ella; y
 (b) someter la corriente de azúcar rica en glucosa a una etapa de eliminación de celulosa para obtener la corriente de azúcar rica en glucosa y pobre en enzimas que tiene un nivel reducido de celulosa y la corriente de reciclaje de enzimas.
- 35 7. El método de la reivindicación 1, que comprende:
 (a) proporcionar celulosa activada que comprende una mezcla de celulosa II, celulosa hidratada II y álcali-celulosa IV;
 (b) someter la celulosa activada a hidrólisis enzimática con una o más enzimas celulasa, Tween y ácido poliaspártico para producir la corriente de azúcar rica en glucosa.
- 40 8. El método de la reivindicación 7, en el que la celulosa activada se produce mediante un método de dos etapas para activar una materia prima celulósica que comprende:
 (a) someter la materia prima a una primera etapa de activación en la que la materia prima se trata a una temperatura superior a 190 °C y una presión superior a 200 psig (13,8 bares) para producir una primera corriente de celulosa activada que comprende celulosa II y sólidos insolubles; y
 (b) someter la primera corriente de celulosa activada a una segunda etapa de activación en la que la primera corriente de celulosa activada se trata con un álcali a una temperatura más baja que la primera etapa de activación para producir una segunda corriente de celulosa activada que comprende celulosa IV.
- 45 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, que comprende, además, someter la corriente de azúcar rica en glucosa a un tratamiento de eliminación de enzimas y obtener una corriente de azúcar rica en glucosa y pobre en enzimas y una corriente de reciclaje de enzimas.
- 50 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la corriente de azúcar rica en glucosa comprende más del 12 % de glucosa, más del 14 % de glucosa, más del 16 % de glucosa o más del 18 % de glucosa.
- 55 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en el que el rendimiento de glucosa es superior al 70 %, superior al 80 %, superior al 85 %, superior al 90 % o superior al 95 %.
- 60 12. Una corriente de azúcar rica en glucosa producida mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en donde la corriente de azúcar comprende ácido poliaspártico y en donde la materia seca de la corriente de azúcar rica en glucosa comprende 95 % de glucosa y 5 % de azúcares no glucosa.
13. La corriente de azúcar rica en glucosa de la reivindicación 12, en donde los azúcares no glucosa son uno o más de xilosa, xilo-oligosacáridos o xilano.

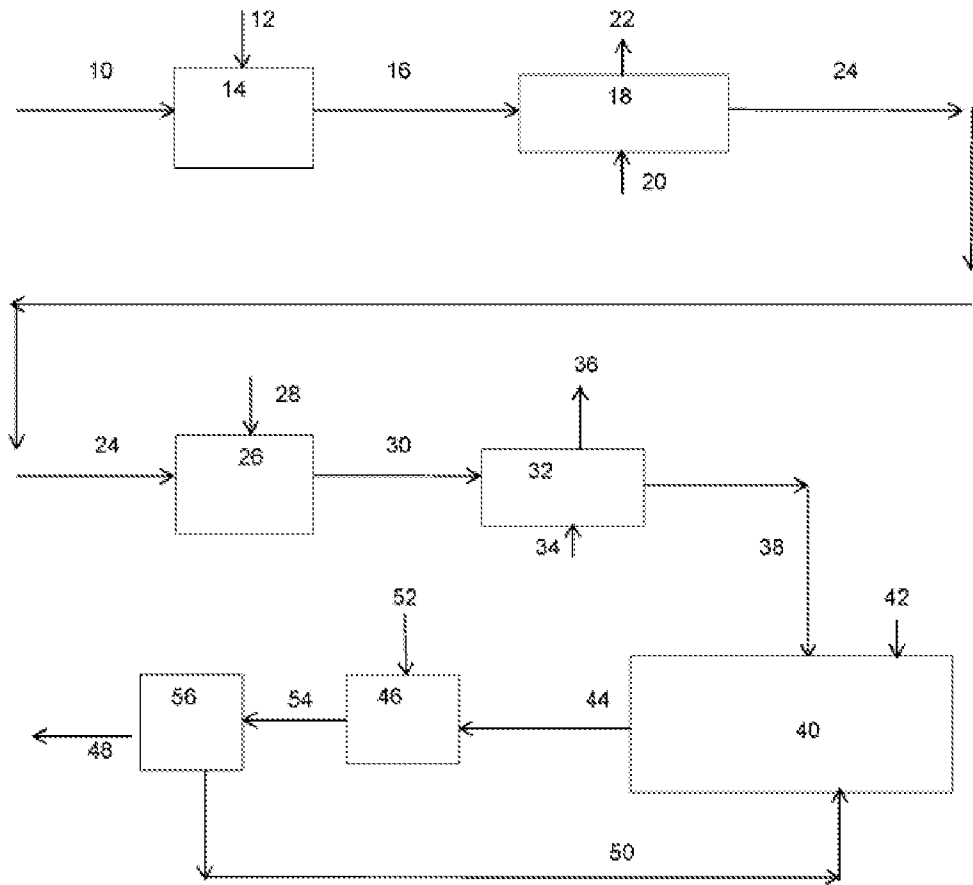


FIGURA 1