

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 291**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2008 E 08716639 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2014 EP 2134850**

54 Título: **Generación de bloques de construcción químicos de biomasa vegetal por despolimerización selectiva**

30 Prioridad:

19.03.2007 DE 102007013047

12.06.2007 EP 07011507

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

08.05.2014

73 Titular/es:

**SÜD-CHEMIE IP GMBH & CO. KG (100.0%)
LENBACHPLATZ 6
80333 MÜNCHEN, DE**

72 Inventor/es:

**KOLTERMANN, ANDRE;
BRÜCK, THOMAS y
RARBACH, MARKUS**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 459 291 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

Generación de bloques de construcción químicos de biomasa vegetal por despolimerización selectiva

5 Antecedentes de la invención

La generación de bloques de construcción químicos de base biológica de recursos renovables ha atraído recientemente mayor atención debido a la limitación global de recursos petroquímicos fósiles. Las materias primas preferidas para la generación de tales productos químicos de base biológica se derivan de biomasa vegetal renovable (Kamm y col., 2006).

Los actuales procedimientos de fabricación para productos predominantemente de base biológica utilizan sustratos del mercado de los alimentos y piensos tales como aceites, azúcares y almidones. La mayoría de las materias primas de primera generación son de composición química bien definida y baja complejidad estructural. Adicionalmente, estos sustratos pueden obtenerse en pureza relativamente alta con solo cantidades menores de contaminantes acompañantes. Aunque su uso es tanto tecnológicamente como económicamente atractivo, su continuo suministro a gran escala no es seguro debido a que el uso de materias primas de primera generación en procedimientos químicos de base biológica está en una fiera competición con su demanda global cada vez mayor en la industria alimentaria.

Sustratos alternativos de las materias primas de primera generación anteriormente mencionadas se derivan de los subproductos de silvicultura de bajo coste y residuos agrícolas que constituyen el material vegetal que no tiene aplicación como fuente de alimento. Ejemplos de estas designadas materias primas de segunda generación son material vegetal residual de actividades agrícolas tales como hoja y tallo de maíz y paja de trigo, además de diversos residuos relacionados con la madera. Esta biomasa lignocelulósica (BLC) se distingue de las materias primas biológicas de primera generación por su compleja composición química y estructural. Los componentes primarios de BLC son materiales altamente poliméricos tales como celulosa (aprox. 35-50 % en peso/peso), hemicelulosa (aprox. 20-35 % en peso/peso) y ligninas (aprox. 10-25 % en peso/peso). Las proteínas, lípidos y otros compuestos constituyen fracciones menores en la mayoría de los materiales de partida de BLC (Saha, 2005), pero pueden estar presentes en mayores cantidades en residuos agrícolas especiales tales como residuos de la producción de aceite. Como la BLC está compuesta por múltiples componentes químicamente diversos, su procesamiento aguas abajo es técnicamente difícil, que a su vez limita la factibilidad económica de los actuales procedimientos biológicos basados en BLC.

El documento US 2 444 823 A se refiere a recuperación de pentosas y hexosas de licores de madera. El documento US 6 586 212 B1 se refiere a fibra de maíz para la producción de productos químicos y materiales avanzados: celulosa derivatizable y derivados de celulosa preparados a partir de la misma. El documento WO 03/093420 A se refiere a procedimientos para la hidrólisis enzimática de lignocelulosa. El documento EP 0 884 391 A se refiere a procedimiento de pretratamiento mejorado para la conversión de celulosa en etanol para combustible. El documento US 4 089 745 A se refiere al procedimiento de conversión enzimática de celulosa derivada de cáscaras de maíz en glucosa. El documento EP 0 406 617 A se refiere a la deslignificación enzimática de material lignocelulósico. El documento WO 99/11672 A se refiere al fraccionamiento de materiales hemicelulósicos. El documento US 2002/195213 A1 se refiere al progreso para producir xilooligosacárido a partir de pulpa de lignocelulosa. El documento EP 0 062 027 A se refiere al procedimiento de preparación de monosacáridos y la disposición para llevar a cabo el procedimiento. Yoon y col., *Lebensmittelwissenschaft und Technologie*, Academic Press, Londres, GB, vol. 39, nº 4, 1 de mayo de 2006, páginas 388-392, se refiere a la producción enzimática de pentosas de la fracción de hemicelulosa de residuos de maíz. Sorensen y col., *Enzyme and Microbial Technology*; Stoneham; MA; EE.UU.; vol. 40, nº 4, 16 de febrero de 2007, páginas 908-918, se refiere a mecanismos enzimáticos sinérgicos y efectos de adiciones de enzima secuenciales sobre la degradación de arabinoxilano de trigo insoluble en agua. Zhang y col., *Biotechnology and Bioengineering*; vol. 88; nº 7; 10 de noviembre de 2004, página 797-824, se refiere a un entendimiento agregado de la hidrólisis enzimática de sistemas de celulosa:celulasa no complejada.

Shang-Tian Yang, Capítulo 1 *Bioprocessing from Biotechnology to Biorefinery*, *Bioprocessing for value-added products from renewable resources: new technologies and applications*, Elsevier, NL, páginas 1 - 24, desvela una biorrefinería integrada con fermentación en estado sólido para producir xilanasa y celulasa para la hidrólisis de hemicelulosa y celulosa en xilosa y glucosa.

Hanchar y col., *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 136-140, páginas 313-325, desvelan la separación de los azúcares glucosa y pentosa por hidrólisis enzimática selectiva.

Problema técnico

Con el fin de producir valiosas sustancias químicas y bloques de construcción mediante procedimientos biológicos económicamente viables basados en materias primas de BLC, es importante tanto (i) recuperar y refinar la mayoría de sus diversos constituyentes químicos como (ii) producirlos en pureza suficiente. A diferencia de las diversas entidades y altamente poliméricas que constituyen la BLC, sus productos de procesamiento favorecidos son de bajo

peso molecular. Principalmente, los productos económicamente atractivos pueden generarse de todos los componentes de BLC: La glucosa generada a partir de celulosa es un material de partida versátil para la generación de productos intermedios químicos de alto valor tales como sorbitol. Los azúcares de pentosa tales como xilosa y arabinosa deducidas de fracciones de hemicelulosa de BLC son materiales de partida para edulcorantes poco nutritivos de alto valor y no calorigénicos tales como xilitol y arabinol. Las proteínas de BLC pueden hidrolizarse para dar L-aminoácidos puros en enantiómeros. Las ligninas pueden servir de fuente de compuestos fenólicos que sustituyen compuestos aromáticos producidos por procedimientos petroquímicos. La presente limitación tecnológica para el uso de materias primas de segunda generación está principalmente asociada con su compleja composición química.

10

Los procedimientos más actuales que usan BLC se concentran en la parte de celulosa del sustrato. Cuando se usan otros componentes normalmente se hidrolizan por etapas de procedimiento no selectivas tales como pretratamiento con ácido sulfúrico hidrolizando todas las hemicelulosas en una única etapa de procedimiento. Los productos de estas etapas de procedimiento no selectivas son generalmente de bajo valor comercial y en algunos casos negativos.

15

El procedimiento de Logen que opera presentemente para la producción fermentativa de bioetanol usa pretratamiento con corriente de ácido diluido a 200-250 °C para movilizar la fracción de hemicelulosa de BLC, que contiene una mezcla de diferentes azúcares de hexosa y pentosa. En una etapa enzimática separada, la fracción de celulosa insoluble se hidroliza a azúcares de hexosa (glucosa). Después de la licuefacción de las fracciones de hemicelulosa y celulosa, sólidos de lignina insolubles se separan físicamente de la mezcla y se queman para generar energía para el procesamiento en la dirección aguas abajo de las fracciones de BLC restantes. Las fracciones de celulosa y hemicelulosa combinadas se fermentan juntas en una única etapa para producir bioetanol. El etanol resultante se recupera posteriormente del caldo de fermentación mediante destilación. Como la mayoría de los organismos comercialmente disponibles (es decir, levadura de panadero, *Saccharomyces cerevisiae*) usados para el procedimiento de fermentación no pueden utilizar azúcares de pentosa, estos componentes de LOB, sin embargo de valor comercial significativo cuando están presentes en forma pura, se desechan en el procedimiento junto con el restante residuo de desecho (Lawford y Rousseau, 2003).

20

25

Recientemente se han hecho intentos para poner la fracción de pentosa de BLC disponible para la conversión fermentativa a bioetanol. En este diseño de procedimiento revisado, la fracción de hemicelulosa licuada se separa de los componentes restantes de BLC después de la etapa de pretratamiento. Aunque todas las fracciones de BLC restantes se procesan como se describe previamente, especialmente microorganismos manipulados (es decir, cepas manipuladas de *Zymomonas mobilis*) con la capacidad de utilizar pentosa (Lawford y Rousseau, 2003; Lynd y col., 2005), además de los azúcares de hexosa, se emplean en una etapa de fermentación separada para convertir eficazmente la hemicelulosa licuada y acondicionada en bioetanol. La mezcla de fermentación resultante se alimenta posteriormente al valor del procedimiento convencional para recuperar el bioetanol. Mientras que la producción de bioetanol a partir de complejas mezclas de pentosa parece ser comercialmente valiosa, el procesamiento selectivo de hexosa, pentosa y lignina a productos de alto valor y bloques de construcción químicos es una vía alternativa atractiva para la utilización de componentes de BLC.

40

Un problema inherente de todos los procedimientos de pretratamiento actualmente usados es la hidrólisis simultánea y no selectiva y liberación de diversos bloques de construcción químicos que constituyen los componentes de BLC (Saha, 2005). Actualmente, los procedimientos de pretratamiento comercialmente aplicados y económicamente viables emplean rigurosos tratamientos químicos o físicos, que pueden incluir una combinación de tratamientos ácidos o básicos a temperaturas elevadas (Ramos y col., 2005). Los hidrolizados de BLC resultantes contienen una variedad de subproductos no deseados derivados de la modificación química de bloques de construcción de BLC. La presencia de estos contaminantes descarta frecuentemente el procesamiento enzimático o catalítico aguas abajo o la fermentación de células completas de los productos (Saha, 2005) y, por tanto, reduce gravemente el valor comercial de corrientes de producto generadas a partir de BLC por tales procedimientos.

50

Así, el problema técnico subyacente a la presente invención es proporcionar un procedimiento para la producción de bloques de construcción químicos de biomasa vegetal renovable.

Especialmente, el problema técnico es proporcionar un procedimiento para la producción de valiosos bloques de construcción químicos de BLC, que evita las desventajas e inconvenientes de la técnica anterior.

55

Resumen de la invención

Según un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento para el tratamiento enzimático de materia prima polimérica en bruto que comprende las siguientes etapas:

60

(a) tratar la materia prima polimérica en bruto con un sistema de enzimas con el fin de liberar bloques de construcción monoméricos u oligoméricos definidos de la materia prima polimérica en bruto y (b) separar los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos definidos producidos en la etapa a) del resto de la materia prima polimérica en bruto,

65

en el que las etapas a) y b) se repiten una o más veces con diferentes sistemas de enzimas con el fin de liberar del resto de la materia prima polimérica en bruto (materia prima polimérica procesada) otros bloques de construcción monoméricos u oligoméricos solubles definidos, y en el que un bloque de construcción monomérico u oligomérico
5 definido según la etapa a) es arabinosa,

en el que el sistema de enzimas que da la mayor pureza de un bloque de construcción monomérico y oligomérico definido después del tratamiento de la materia prima polimérica en bruto y separación de la materia prima monomérica y oligomérica definida de la materia prima polimérica procesada se elige para el primer tratamiento
10 enzimático según la etapa a),

en el que el segundo sistema de enzimas según la etapa a) es el que da la mayor pureza del bloque de construcción monomérico y oligomérico definido después del tratamiento de materia prima polimérica procesada, que se obtiene por el primer tratamiento enzimático según la etapa a) y separación de la materia prima monomérica y oligomérica
15 definida de la materia prima polimérica en bruto, con el sistema de enzimas y separación de la materia prima monomérica y oligomérica definida de materia prima polimérica procesada,

y en el que cualquier etapa de tratamiento enzimático posterior se realiza con el fin de disminuir la pureza de los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos definidos después del tratamiento de la materia primera
20 procesada obtenida de la etapa de tratamiento enzimático previa con el sistema de enzimas respectivo y la separación de los bloques de construcción monoméricos y oligoméricos definidos de los procesados de la materia prima polimérica procesada,

y en el que el sistema de enzimas para liberar arabinosa contiene no más del 50 % de otras actividades enzimáticas,
25 aparte de la actividad enzimática que produce la liberación de arabinosa.

Según un aspecto preferido, las etapas a) y b) se realizan en un disolvente (medio líquido). Preferentemente, la materia prima polimérica (en bruto) se trata en presencia de un disolvente en el que es insoluble, es decir, en el que no está presente en forma disuelta. Así, la materia prima polimérica (en bruto) es preferentemente una materia prima
30 polimérica en bruto insoluble. El disolvente es preferentemente un disolvente acuoso. Adicionalmente preferido, la etapa de enzima a) libera bloques de construcción monoméricos u oligoméricos solubles de la materia prima polimérica en bruto, es decir, bloques de construcción monoméricos u oligoméricos que son solubles en el disolvente usado y así pueden disolverse en su interior. Según otro aspecto preferido, la separación de los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos definidos (disueltos) solubles producidos en la etapa a) a partir del resto
35 de la materia prima polimérica en bruto o procesada (no disuelta) insoluble (etapa b) se logra por separación sólido-líquido. Puede usarse cualquier procedimiento convencional para la separación sólido-líquido, que incluye procedimientos de filtración o centrifugación.

En cada etapa de procedimiento, los productos monoméricos u oligoméricos solubles se producen a partir de
40 materia prima polimérica en bruto o procesada insoluble por adición sucesiva de un sistema de enzimas específico seguido de la separación de los productos monoméricos u oligoméricos solubles del resto insoluble de la materia prima polimérica. Puede usarse cualquier procedimiento convencional para la separación sólido-líquido, que incluye procedimientos de filtración o centrifugación.

Según un aspecto preferido, el (los) bloque(s) de construcción monomérico(s) u oligomérico(s) definido(s) liberado(s) de la materia prima polimérica en bruto o procesada en cada etapa de tratamiento a) es un "producto" específico seleccionado de la columna izquierda de la Tabla 1 más adelante. En otras palabras, solo un bloque de construcción monomérico o polimérico específico se libera de la materia prima polimérica en bruto o procesada en cada etapa de
45 tratamiento a) usando un sistema de enzimas o una combinación de sistemas de enzimas que tienen el mismo producto. Ejemplos de tales combinaciones de enzimas se enumeran en la Tabla 1.
50

Según un aspecto preferido de la invención se ha encontrado sorprendentemente que la presencia de cantidades (substanciales) de lignina es beneficiosa en el procedimiento de la invención. Así, la selectividad y, por consiguiente, la pureza de las corrientes de producto obtenidas de las etapas de tratamiento enzimático podrían elevarse
55 inesperadamente por la presencia de lignina en la materia prima polimérica. La alteración en la selectividad enzimática observada puede ser debida a propiedades superficiales alteradas en presencia de lignina, sin embargo, la invención no se limita a esta suposición de un mecanismo teórico.

Por tanto, según una realización preferida, la materia prima polimérica en bruto comprende al menos el 1 % en peso
60 de lignina, preferentemente al menos el 3 % en peso de lignina, más preferentemente al menos el 5 % en peso de lignina. Se obtienen resultados particularmente ventajosos si la materia prima polimérica en bruto comprende al menos el 10 % en peso de lignina, preferentemente al menos el 20 % en peso de lignina. La cantidad de lignina presente en la materia prima puede determinarse mediante procedimientos conocidos para el experto. Según una realización, el contenido de lignina puede calcularse según el procedimiento indicado en A. Sluiter y col.,
65 "Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass", LAP, Informe técnico NREL/TP-510-42618, enero de 2008. Según otra realización, el contenido de lignina puede calcularse según el procedimiento indicado en

Hsu y col., Journal of Animal Science, 1987. 65: pág. 244-255 para lignina detergente ácido (ADL).

En línea con el sorprendente hallazgo anterior, según otro aspecto preferido de la invención, no se realiza etapa de tratamiento enzimático ligninolítico en el procedimiento de la invención. Por tanto, se prefiere adicionalmente que el contenido de lignina en la materia prima polimérica, calculado como % en peso de la composición global de la materia prima polimérica, no se reduzca durante las etapas (a) y (b) o su repetición. El contenido de lignina puede determinarse como se explica resumidamente anteriormente.

Según un aspecto particularmente ventajoso de la invención, el procedimiento de tratamiento de la invención comprende al menos una etapa de tratamiento ("etapa de pretratamiento") antes de la etapa a) para separar (eliminar) componentes solubles de la materia prima polimérica en bruto o procesada (insoluble). Así, esta etapa se realiza antes del tratamiento enzimático de la materia prima polimérica en bruto o procesada. Se ha encontrado que la eficiencia de la(s) posterior(es) etapa(s) de tratamiento enzimático puede aumentarse sorprendentemente por tal(es) etapa(s) de pretratamiento para eliminar componentes solubles de la materia prima polimérica en bruto o procesada. Las condiciones preferidas de tal(es) etapa(s) de pretratamiento se trata(n) adicionalmente más adelante.

Según una realización preferida, el mismo disolvente o uno similar (medio líquido) como se usa para la siguiente etapa a) de tratamiento enzimático se usa en la(s) etapa(s) de pretratamiento. Etapa(s) de pretratamiento individual(es) para la eliminación de solubles se realizan preferentemente a las mismas temperaturas y más preferentemente a mayores temperaturas que la siguiente etapa a) de tratamiento enzimático para aumentar la eficiencia de extracción. Incluso más preferentemente, la extracción soluble por la(s) etapa(s) de pretratamiento se realizará a mayores temperaturas y presiones (principio de la olla a presión), pero en un tiempo de tratamiento acortado en comparación con la siguiente etapa de tratamiento enzimático. De nuevo, la materia prima polimérica en bruto o procesada es preferentemente insoluble en el disolvente usado y los componentes que van a eliminarse son solubles en ella. La separación de los componentes solubles de la materia prima polimérica en bruto o procesada insoluble se realiza preferentemente por procedimientos de separación sólido-líquido convencionales.

Según otra realización de la invención, la(s) etapa(s) de pretratamiento individual(es) para eliminar componentes solubles de la materia prima polimérica (en bruto o procesada) antes de la etapa a) puede(n) repetirse en múltiples ciclos escalonados de al menos dos etapas de pretratamiento. En una realización preferida, dichos ciclos se llevan a cabo con composiciones de disolvente, perfiles de temperatura y tiempo variables para aumentar la eficacia de la extracción soluble.

La(s) etapa(s) de pretratamiento puede(n) comprender una o más etapas de pretratamiento fisicoquímico y/o uno o más etapas de lavado como se definen en el presente documento.

En la presente invención se ha encontrado según un aspecto preferido que la separación del (de los) bloque(s) de construcción monomérico(s) u oligomérico (soluble(s)) liberado(s) de la materia prima polimérica en bruto o procesada (insoluble) después de un tratamiento definido con un sistema de enzimas proporciona ventajas significativas referentes a la generación de productos químicos de base de valor añadido químicamente puros y bloques de construcción químicos de sustratos naturales complejos tales como BLC empleando etapas de procedimiento catalíticas selectivas. Estas etapas de procedimiento catalíticas selectivas liberan componentes monoméricos u oligoméricos químicos definidos de la materia prima polimérica compleja con bajas cantidades de otros contaminantes en el producto generado por la etapa de procedimiento. Una solución técnica preferida para proporcionar tal especificidad y selectividad en la hidrólisis de BLC es el uso de etapas enzimáticas selectivas. Los productos químicos de base pueden usarse como sustituyentes para material de partida en procedimientos petroquímicos tradicionales, además de materiales de partida para vías de síntesis químicas y bioquímicas novedosas y son, por tanto, de alto valor comercial.

Otros aspectos y realizaciones preferidos se describen en detalle más adelante.

Definiciones

El término "materias primas poliméricas en bruto" significa mezclas complejas de diferentes sustratos poliméricos insolubles tales como hidratos de carbono, lípidos poliméricos, polipéptidos, polinucleótidos y fenilpropanoides poliméricos en relaciones másicas variables que se derivan normalmente de material vegetal. Además de estos sustratos poliméricos insolubles, las materias primas poliméricas en bruto normalmente contienen componentes monoméricos u oligoméricos solubles. Las materias primas poliméricas en bruto incluyen, pero no se limitan a, productos residuales de la industria de procesamiento forestal, agrícola y alimentaria, además de residuos municipales. Cuando los polímeros principales son celulosa y lignina, tales materias primas poliméricas en bruto se llaman "materias primas lignocelulósicas en bruto" o "biomasa lignocelulósica" o "BLC". Las materias primas lignocelulósicas en bruto de actividades agrícolas comprenden, pero no se limitan a, paja de trigo, hojas y tallos de maíz, estiércol de animales de rumen, bagazo de caña de azúcar, pulpa de remolacha azucarera y material herbáceo como césped de pradera, Sericea Lespedeza Serala y césped sorgo del Sudán. Las materias primas residuales derivadas de la silvicultura comprenden, pero no se limitan a, corteza de madera, astillas de madera y

madera residual. Las materias primas lignocelulósicas derivadas de la industria alimentaria engloban, pero no se limitan a, pulpa de fruta, residuo completo de agave, residuo de café y residuo de molienda del aceite tal como torta de filtro de semilla de colza y efluentes de molino. Las materias primas derivadas en bruto de la industria de la pasta y el papel incluyen, pero no se limitan a, lodo de papel y efluentes de molinos de papel. Las materias primas en bruto derivadas de residuos municipales engloban, pero no se limitan a, papel residual, residuo vegetal y residuo de frutas.

El término “materia prima polimérica procesada” como se usa en el presente documento debe significar la (el resto de la) materia prima polimérica en bruto después de al menos una etapa de tratamiento enzimático (etapa a).

10 El término “etapa de lavado” debe significar cualquier etapa de pretratamiento de la materia prima polimérica en bruto o procesada usando al menos un disolvente con el fin de extraer componentes solubles de la materia prima polimérica insoluble sin modificar o cambiar la estructura de la propia materia prima polimérica.

15 El término “etapa de tratamiento fisicoquímico” debe significar cualquier etapa de pretratamiento de la materia prima polimérica en bruto o procesada con el fin de extraer componentes solubles de la materia prima polimérica insoluble que incluyen modificar o cambiar la estructura de la propia materia prima polimérica.

20 El término “sustrato polimérico” significa sustancias compuestas de tanto un constituyente monomérico específico como una variedad limitada de constituyentes monoméricos definidos ligados covalentemente juntos en una estructura molecular lineal o parcialmente ramificada. La fracción insoluble de materias primas lignocelulósicas en bruto contiene cantidades significativas de tales sustratos poliméricos tales como celulosa, xilano, manano y galactano. Adicionalmente, también contiene sustratos poliméricos tales como lignina, arabinoxilano, glucoronoxilano, glucomanano y xiloglucano.

25 El término “sistemas de enzimas” significa entidades proteínicas que pueden convertir catalíticamente sustratos poliméricos u oligoméricos en constituyentes oligoméricos o monoméricos más pequeños (bloques de construcción). Además del uso de una única enzima para producir productos monoméricos u oligoméricos de un sustrato polimérico, el término sistema de enzimas también comprende mezclas que comprenden más de una enzima que producen un producto monomérico u oligomérico definido por acción sinérgica o paralela de una materia prima polimérica. Así, los términos “sistema de enzimas” y “mezclas de enzimas” se usan indistintamente en el presente documento y ambos pueden comprender una o más enzimas o actividad enzimática, respectivamente.

30 El término “bloques de construcción monoméricos u oligoméricos” significa productos monoméricos u oligoméricos, que se liberan de la materia prima polimérica en bruto usando un sistema de enzimas. “Oligomérico” debe incluir compuestos con dos o más unidades monoméricas.

35 El término “actividad enzimática” de una enzima se refiere a la actividad catalítica de la enzima bajo condiciones apropiadas bajo las que la enzima sirve de catalizador de proteínas, convirtiendo sustratos poliméricos o artificiales específicos en productos oligoméricos o monoméricos específicos.

40 El término “actividad enzimática contaminante” describe actividades enzimáticas de un sistema de enzimas empleado que conducen a productos oligoméricos o monoméricos distintos del (de los) producto(s) oligomérico(s) o monomérico(s) deseado(s), que se producen según la actividad enzimática prevista (principal o primera) del sistema de enzimas.

45 El término “sustrato artificial” significa una sustancia de peso molecular comúnmente bajo que después de poner en contacto el sustrato artificial con un sistema de enzimas da un cambio medible en la propiedad fisicoquímica del sustrato artificial que se correlaciona con la actividad de un sistema de enzimas seleccionado. Dichas propiedades fisicoquímicas y sustratos artificiales que dan tales cambios en propiedades fisicoquímicas después de ponerlas en contacto con un sistema de enzimas son conocidas para aquellos expertos en la materia y comprenden, pero no se limitan a, cambios en las propiedades de absorción o emisión de fluorescencia espectrofotométricamente medibles, cambios en la movilidad cromatográfica que va a determinarse por cromatógrafo de líquidos o gases y cambios en la masa molecular que va a determinarse por espectroscopía de masas.

50 Sustratos artificiales adecuados para enzimas, sistemas de enzimas y producto de reacción medibles se enumeran en la Tabla 2 más adelante.

55 El término “liberar” significa la conversión de un sustrato polimérico insoluble en un producto monomérico u oligomérico soluble por un procedimiento físico, químico o catalítico tal como hidrólisis, despolimerización oxidativa o reductora.

Descripción detallada de la invención

Parte general

65 La invención comprende según un primer aspecto un único procedimiento consolidado o una serie de etapas de

- procedimiento secuenciales para la generación de productos químicos de base o bloques de construcción químicos de una materia prima polimérica en bruto. En cada etapa de procedimiento, productos monoméricos u oligoméricos solubles (bloques de construcción) se producen a partir de materias primas poliméricas en bruto o procesadas insolubles poniendo en contacto la materia prima polimérica en bruto o procesada con un sistema de enzimas
- 5 específico, que está preferentemente esencialmente libre de actividades enzimáticas que producen otro producto de reacción previsto del distinto (bloque de construcción monomérico o polimérico), seguido de la separación del (de los) bloque(s) de construcción monomérico(s) u oligomérico(s) soluble(s) de la materia prima polimérica en bruto o procesada insoluble.
- 10 Según una realización preferida, el procedimiento comprende la separación de componentes solubles de materias primas poliméricas (insolubles) tales como BLC antes de o en combinación con el único procedimiento consolidado o antes de y en combinación con una o más etapas de una serie de etapas de procedimiento (enzimáticas) secuenciales como se define en el párrafo precedente.
- 15 Según otra realización preferida de la invención, la separación inicial de los componentes solubles de la materia prima polimérica en bruto (insoluble) antes de las etapas de tratamiento enzimático comprende al menos una etapa de pretratamiento fisicoquímico seguido de separación sólido-líquido. Dicha(s) etapa(s) de tratamiento fisicoquímico puede(n) incluir, pero no se limita(n) a, incubar la materia prima polimérica en bruto con un disolvente bajo elevada temperatura y/o elevada presión y/o poner en contacto las materias primas poliméricas en bruto con productos
- 20 químicos. Tales productos químicos incluyen, pero no se limitan a, ácidos o bases diluidos o concentrados. Preferentemente, el pretratamiento fisicoquímico se realiza a un pH de 1-13 y más preferentemente a pH de tanto 2-5 como 8-11. Según otra realización preferida, el pretratamiento fisicoquímico se combina con una o más etapas de lavado, preferentemente con el fin de reducir adicionalmente componentes solubles en la materia prima polimérica en bruto.
- 25 Según una realización preferida, la(s) etapa(s) de pretratamiento como se define(n) en el presente documento se realizan a una temperatura en el intervalo de 20 a 210 °C, preferentemente a 50-175 °C. El intervalo de presión para cada etapa de pretratamiento individual puede oscilar de 1 a 300 bar y preferencialmente estará en el intervalo de 1 a 100 bar. La duración preferida de la(s) etapa(s) de pretratamiento depende de la composición de la materia prima
- 30 polimérica en bruto o procesada y puede oscilar de algunos segundos a 1 semana. Lo más preferencialmente, el tiempo de tratamiento para cada etapa de pretratamiento individual puede no superar 1 h.
- Dicha(s) etapa(s) de lavado antes de la(s) etapa(s) de tratamiento enzimático comprenden al menos una etapa de lavado con al menos un disolvente, preferentemente al menos un disolvente acuoso. Los preferidos son, sin
- 35 limitación, agua o tampones acuosos. Preferentemente, la etapa de lavado va seguida de una separación sólido-líquido. Según una realización, la etapa de lavado se realiza en ausencia de una enzima o catalizador.
- En una realización preferida de la invención, el medio líquido usado para la(s) etapa(s) de pretratamiento individual(es), en particular la(s) etapa(s) de lavado, contiene concentraciones variables de sales inorgánicas y/u
- 40 otros componentes químicos que pueden afectar la fuerza iónica, pH y/o hidrofobia del medio para aumentar la capacidad de extracción de material soluble, preferentemente antes y después de cada etapa de tratamiento enzimático. Preferentemente, el medio líquido usado para las etapas de pretratamiento individuales se caracteriza por un pH de 1-13. Preferentemente, el medio líquido usado para las etapas de pretratamiento individuales contiene ácido inorgánico, bases y sales tales como cloruro de hidrógeno, ácido sulfúrico, amoníaco, cloruro sódico, hidróxido
- 45 sódico, sulfato de amonio, fosfato de sodio, acetato sódico, citrato de sodio, tartrato de sodio, sulfato de sodio, y/o componentes de tampón orgánico, por ejemplo, glicina, glicerol y/o Triton-X100 para la modificación de hidrofobia. Preferentemente, la fuerza iónica del medio líquido usado para las etapas de pretratamiento individuales está en el intervalo de 0,1-10M de equivalentes de sulfato de sodio (fuerza iónica I⁻ 1,7-170). En otra realización preferida, el medio líquido está libre de cualquier disolvente orgánico y/o compuesto que no sea miscible con agua.
- 50 En otra realización preferida más de la invención, la(s) etapa(s) de lavado individual(es) se aplica(n) repetidamente a la materia prima polimérica en bruto o procesada con composiciones de disolvente variables usando tiempo variable, perfiles de temperatura y presión para maximizar la extracción de un componente soluble particular.
- 55 En una realización preferida de la invención, al menos una etapa de pretratamiento fisicoquímico antes del tratamiento enzimático de la materia prima polimérica en bruto se diseña (principalmente) para eliminar lignina, resina y/o componentes proteináceos de la materia prima polimérica en bruto. Preferentemente, se usa un medio líquido con una fuerza iónica (I) superior a 1 y, en otra realización preferida, toda(s) la(s) etapa(s) de pretratamiento posterior(es), en particular etapa(s) de lavado, se realizan usando un medio líquido con menor fuerza iónica que en
- 60 la etapa de pretratamiento fisicoquímico inicial.

Procedimientos para la separación de componentes solubles e insolubles son conocidos para el experto en la materia y comprenden etapas de procedimiento tales como sedimentación, decantación, filtración, microfiltración, ultrafiltración, centrifugación, evaporación de productos volátiles y extracción con disolventes orgánicos o

65 inorgánicos. Según una realización preferida, la(s) etapa(s) de pretratamiento comprende(n) un tratamiento con disolventes acuosos, disolventes orgánicos, o cualquier combinación o mezclas de éstos preferentemente con etanol

o glicerol.

Según una realización preferida de la invención, el tratamiento enzimático se realiza en un medio acuoso, los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos definidos liberados de la materia prima polimérica en bruto o procesada son solubles en el medio acuoso, y la separación según la etapa b) anterior se realiza por separación sólido-líquido de los bloques de construcción solubles en el medio acuoso de la materia prima polimérica en bruto o procesada insoluble.

Ejemplos relevantes de sustratos poliméricos, que constituyen componentes principales de materias primas poliméricas, sus productos de degradación monoméricos u oligoméricos (bloques de construcción) y sistemas de enzimas útiles para generar productos esencialmente puros a partir de cada sustrato polimérico contenido en una materia prima polimérica en bruto o procesada se enumeran en la Tabla 1 más adelante.

En las etapas de procesamiento de la invención, bloques de construcción químicos de sustratos poliméricos como hemicelulosa, celulosa, ligninas, glucanos, proteínas y lípidos son liberados poniendo en contacto la materia prima polimérica con sistemas de enzimas específicos. La descomposición enzimática de constituyentes de materia prima individuales en productos solubles esencialmente puros se basa en la aplicación de preparaciones de enzima específicas de sustrato que están, según una realización preferida, esencialmente libres de actividades que liberan otros constituyentes distintos de los productos previstos en la etapa de procedimiento respectiva.

Determinación de la composición de materia prima polimérica en bruto

La composición molecular de las materias primas en bruto que van a emplearse en los procedimientos descritos en el presente documento puede determinarse mediante procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, la composición de material lignocelulósico puede determinarse usando una combinación de pirólisis, cromatografía de gases y espectrometría de masas. Una biblioteca de procedimientos que describe posibles metodologías analíticas para la determinación de componentes de BLC se enumera bajo: http://www1.eere.energy.gov/biomass/analytical_procedures.html#samples.

Según una realización, procedimientos convencionales que comprenden varias etapas de reacción física y enzimática pueden emplearse para cuantificar empíricamente los constituyentes de la materia prima polimérica basándose en los productos de reacción obtenidos.

Para materias primas comunes, una base de datos que enumera las relaciones másicas para las clases de materia prima más comunes puede encontrarse bajo: http://www1.eere.energy.gov/biomass/feedstock_databases.html.

En una ilustración para analizar los componentes de materia prima, la materia prima polimérica en bruto tiene primero que hidrolizarse antes de que pueda realizarse análisis adicional.

Antes de la hidrólisis de la materia prima, la muestra de materia prima en bruto (1 g) debe colocarse en un crisol y secarse a 50 °C hasta que se obtenga un peso constante. El peso seco se registra a 3 cifras decimales para obtener el peso seco en estufa (ODW) de la muestra.

Para el procedimiento de hidrólisis, 1 g de materia prima finamente molida (2 µm) se coloca en un tubo de presión y se añaden 3 ml de ácido sulfúrico al 72 % v/v. El tubo de presión se coloca en un baño de agua a 30 °C y se incuba durante 1 h. Usando una varilla de agitación, la muestra tiene que agitarse cada 5 a 10 min sin sacar la muestra del baño. La agitación es esencial para garantizar ácido uniforme para la distribución de partículas. El ácido se diluye al 4 % añadiendo 84 ml de agua doble destilada (d.d.) usando una bureta y la muestra se mezcla invirtiendo los tubos varias veces para eliminar la separación de fases.

Con el fin de determinar la fracción de lignina insoluble en ácido de la materia prima, la disolución de hidrólisis esterilizada en autoclave se filtra a vacío a través de un crisol de filtración previamente pesado.

El filtrado se captura en un matraz de filtración y una alícuota de 50 ml se transfiere a una botella de almacenamiento de muestra. Esta muestra se usará en el siguiente procedimiento para determinar el contenido de lignina y de hidrato de carbono. La determinación de lignina soluble en ácido debe realizarse en el plazo de seis horas desde la hidrólisis.

Para la determinación de lignina insoluble en ácido se añade agua d.d. para transferir cuantitativamente todos los insolubles restantes fuera del tubo de presión en el crisol de filtración. Los insolubles tienen que aclararse con un mínimo de 50 ml de agua d.d. y posteriormente el crisol y los residuos insolubles en ácido tienen que secarse a 105 °C durante 4 h o hasta que se obtenga un peso constante. Después de la incubación, las muestras se sacan de la estufa y se enfrían en un desecante. El peso "w2" del crisol y el residuo seco tienen que registrarse al 0,1 mg más próximo antes de colocar el crisol y el residuo en un horno de mufla a 575 °C durante 24 h.

El crisol se saca cuidadosamente del horno y se transfiere directamente a un desecador y se enfría durante una

cantidad específica de tiempo que es igual al tiempo de enfriamiento inicial del crisol. El crisol y la ceniza se pesan (peso "w3") y se colocan de nuevo en el horno hasta que se obtiene un peso constante. El peso "w2" corregido para la ceniza restante ("w3") es igual al peso de lignina insoluble en ácido contenido en la materia prima en bruto.

- 5 A diferencia de las complejas mediciones requeridas para obtener la cantidad de lignina insoluble en ácido, la cantidad de lignina soluble en ácido puede determinarse fácilmente espectrofotométricamente. Primero se ejecuta una medición de ruido de fondo con ácido sulfúrico acuoso al 4 % v/v en un espectrofotómetro de elección. Usando el licor de hidrólisis inicial se mide la absorbancia a 320 nm y a la máxima absorbancia del hidrolizado filtrado, que es normalmente aproximadamente 198 nm. La muestra tiene que diluirse según sea necesario para llevar el intervalo de absorbancia a 0,7-1,0 unidades de A. La absorbancia de la muestra a 3 cifras decimales se usa para calcular la cantidad de lignina soluble en ácido (ASL) presente en la muestra según el siguiente cálculo:

$$\% \text{ de ASL} = (\text{UV}_{\text{abs}} * \text{Volumen}_{\text{filtrado}} * \text{factor de dilución}) / (e * \text{ODW}_{\text{muestra}}) * 100$$

- 15 ODW = peso seco en estufa de muestra de materia prima en bruto

UV_{abs} = absorbancia UV-vis promedio para la muestra a 320 nm

Filtrado de volumen = Volumen del filtrado de hidrólisis

20

E = coeficiente de extinción del licor de hidrolizado de biomasa a la máxima absorbancia de muestra (valores numéricos de los coeficientes de extinción para un gran número de materias primas poliméricas en bruto pueden encontrarse en http://www1.eere.energy.gov/biomass/analytical_procedures.html#samples)

- 25 El licor de hidrolizado de muestra también puede usarse para determinar los hidratos de carbono estructurales contenidos dentro de la fracción de hemicelulosa de la materia prima usando un procedimiento basado en HPLC.

Esta determinación requiere primero una mezcla de calibración para cada D-celobiosa, glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa. Las concentraciones preparadas para cada patrón de azúcar deben oscilar de 0,1-4 mg/ml.

- 30 Para cada conjunto de patrones de calibración debe hacerse un patrón de verificación de la calibración (CVS) independiente que se encuentra en el centro del intervalo validado de la curva de calibración (es decir, 2,5 mg/ml). El CVS debe analizarse por HPLC después de cada conjunto de calibración y a intervalos regulares durante toda la secuencia de análisis, poniendo entre paréntesis grupos de muestras. El CVS se usa para verificar la calidad y estabilidad de las curvas de calibración de cada ejecución.

35

20 ml del licor de hidrólisis obtenido de las etapas iniciales después de la hidrólisis de muestra se transfieren a un matraz Erlenmeyer de 50 ml. Se añade carbonato cálcico para neutralizar la muestra a un pH de 5-6 y después de sedimentarse de la disolución el sobrenadante puede decantarse. Después de la sedimentación la disolución tendrá aproximadamente pH neutro.

40

Los patrones de calibración de azúcar CVS y muestras son ahora conocidos para análisis de HPLC usando una columna de azúcar SP0810 Shodex® (Phenomenex) o Aminex® HPX-87P (BioRad) equipada con la precolumna apropiada.

- 45 El volumen de inyección de muestra debe estar entre 10 y 50 µl en función de la concentración y límites del detector. Las muestras se eluyeron con agua d.d. a una velocidad de flujo de 0,6 ml/min y una temperatura de la columna de 80 °C. La elución de muestras puede monitorizarse mejor usando detección del índice de refracción.

Los cromatogramas deben integrarse antes del análisis y los contenidos de azúcar individuales deben determinarse

- 50 con referencia a las curvas patrón apropiadas para cada componente de sacárido.

Sistemas de enzimas

- En las realizaciones descritas en el presente documento, las especificidades de las mezclas de enzimas aplicadas son confeccionadas a medida para obtener corrientes de producto monomérico puro (bloque(s) de construcción monomérico(s) o polimérico(s) definido(s)) derivados de diferentes clases de sustratos poliméricos.

- En una realización preferida de la presente invención, los sistemas de enzimas, aplicados a una materia prima polimérica en bruto o procesada particular, pueden contener no más del 50 % de otras actividades enzimáticas que puedan producir productos distintos del producto preferido de una materia prima polimérica designada.

- En una realización más preferida de la presente invención, las mezclas de sistemas de enzimas, aplicadas a una materia prima polimérica en bruto o procesada, pueden contener no más del (o menos del) 20 %, preferentemente no más del (o menos del) 10 %, más preferentemente no más del (o menos del) 5 %, más preferentemente no más del (o menos del) 2 %, lo más preferentemente no más del (o menos del) 1 % de otras actividades enzimáticas que pueden producir productos distintos del producto preferido de una materia prima polimérica designada.

- El porcentaje de otras actividades enzimáticas puede determinarse rutinariamente usando procedimientos convencionales para la determinación de la actividad enzimática respectiva. Así, la “principal” actividad enzimática presente en el sistema de enzimas que conduce a la liberación del bloque de construcción monomérico o polimérico definido deseado a partir de la materia prima polimérica en bruto o procesada debe representar al menos el 50 %, preferentemente al menos el 60 %, más preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 98 %, más preferentemente al menos el 99 % de todas las actividades enzimáticas presentes en el sistema de enzimas.
- 10 Las actividades enzimáticas pueden determinarse según procedimientos convencionales como conoce el experto y como se describe en el presente documento.

- Según una realización preferida, los porcentajes anteriores pueden determinarse simplemente tratando la materia prima polimérica en bruto con el sistema de enzimas según la etapa a) anterior y analizando los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos solubles liberados después de la separación sólido-líquido de la materia prima polimérica en bruto insoluble según la etapa b). Así, si los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos liberados comprenden más del 50 % en moles del bloque de construcción deseado específico (basado en el contenido de sólido total), las otras actividades enzimáticas presentes en el sistema de enzimas se consideran que son inferiores al 50 %. Similarmente, si los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos liberados comprenden más del 80, 90, 95, 98 o el 99 % en moles del bloque de construcción deseado específico, se considera que las otras actividades enzimáticas presentes en el sistema de enzimas son inferiores al 20, 10, 5, 2 o el 1 % en moles, respectivamente. Correspondientemente, la “principal” actividad enzimática presente en el sistema de enzimas y que conduce a la liberación del bloque de construcción monomérico u oligomérico definido deseado de la materia prima polimérica en bruto se considera en este caso que representa al menos el 50 %, preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 98 %, más preferentemente al menos el 99 %, de todas las actividades enzimáticas presentes en el sistema de enzimas. Según otra realización, el “% en moles” está sustituido por “% en peso de” en la determinación anteriormente mencionada del porcentaje de actividad enzimática (actividades).

- 30 Según una realización, las actividades enzimáticas pueden determinarse midiendo la tasa de conversión de un sustrato polimérico elegido como se ha definido anteriormente. En una realización alternativa, las actividades enzimáticas presentes en el sistema de enzimas pueden determinarse usando sustratos artificiales. Dependiendo de la facilidad y fiabilidad de los procedimientos de detección aplicados puede tanto medirse la conversión de un sustrato por sí mismo como alternativamente la formación de un producto específico resultante de la reacción enzimáticamente catalizada. En casos especiales, el producto intermedio catalítico de la propia enzima (es decir, oxidorreductasas) puede detectarse espectrofotométricamente.

- La prueba de mezclas de enzimas formuladas para actividades enzimáticas es conocida para aquellos expertos en la materia. Una biblioteca de pruebas adecuadas para actividades enzimáticas específicas se enumera bajo:
- 40 http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Key_Resources/Assay_Library/Assays_by_Enzyme_Name.html

Ejemplos de pruebas específicas para determinar las actividades enzimáticas de clases de enzimas particulares se enumeran a continuación.

- 45 En un caso particular, puede medirse la actividad de tanto endo- como exo-celulosa en 0,5 ml de un tampón de reacción MES 50 mM (pH 6) que contiene CaCl₂ 10 mM, p-nitrofenil-beta-D-celobiósido 4 mM y 200 µl de una disolución enzimática diluida. La reacción debe entonces incubarse a 50 °C durante 30 min. Se añade tampón glicina (100 mM, pH 4) para detener la reacción. La actividad enzimática podría entonces determinarse midiendo la cantidad de p-nitrofenol liberado espectrofotométricamente a 430 nm. Los valores de absorbancia de p-nitrofenol se traducen a micromoles de nitrofenol usando una gráfica patrón referente a micromoles de nitrofenol con respecto a absorbancia. Una unidad de actividad de celulosa es la cantidad de enzima requerida para liberar 1 µmol de p-nitrofenol/min en las condiciones del ensayo (Wood, T.M. y Bhat, K., 1988).

- 55 En otro caso particular, la actividad de arabinofuranosidasa puede determinarse en 1 ml de fosfato de sodio 50 mM (pH 7) que contiene 4-nitrofenil-alfa-L-arabinofuranósido 4-100 µM (pNP-Araf) y disolución enzimática diluida (4 nM-8 µM). La reacción puede incubarse a 37 °C y la cantidad de 4-nitrofenol liberada se mide a 400 nm. La actividad enzimática puede calcularse usando el coeficiente de extinción 10500 M⁻¹cm⁻¹ de 4-nitrofenol a 400 nm (Taylor y col., 2006).

- 60 En otro caso particular, la actividad de xilosidasa puede determinarse usando un beta-D-xilopiranosido sustituido con o-nitrofenol (ONP-beta-D-xilopiranosido) como sustrato (Chen y col., 1986). La disolución madre de sustrato (10 mM) se prepara en tampón citrato 100 mM (pH 5). La disolución enzimática diluida que va a probarse se prepara en agua d.d. La reacción contiene cantidades molares iguales de sustrato y disolución de enzima en un tampón borato 200 mM a 25 °C y pH 9,8. Para determinar la actividad enzimática, la liberación del o-nitrofenol se registra espectrofotométricamente a una longitud de onda de 410 nm. La actividad enzimática en unidades/mg de enzima es

proporcional a la cantidad liberada de o-nitrofenol y puede calcularse como se describe para la actividad de celulasas.

- En otro caso particular, la actividad de lacasa se determina usando el ensayo de oxidación de guayacol. Una disolución madre de guayacol 10 mM se prepara recientemente en tampón citrato 50 mM (pH 4,3, 40 °C). La reacción se lleva a cabo en 2 ml de tampón citrato 50 mM usando 10 µl de disolución madre de enzima diluida (1-3 nM) y cantidades variables de sustrato (5-20 µl). La tasa de oxidación de guayacol se mide entonces espectrofotométricamente a 465 nm. La tasa de oxidación de guayacol puede determinarse usando el coeficiente de extinción de 5200 M⁻¹cm⁻¹ para productos de oxidación de guayacol (Smirnov y col. 2001).
- 10 En otro caso particular, la actividad de manganoso peroxidasa (MnP) puede medirse en tampón tartrato 50 mM (pH 3, 25 °C) mediante la adición de H₂O₂ 100 µM a una mezcla de reacción que contiene 0,5 µM/ml de MnP y 5-200 µM de Mn²⁺. La formación de Mn³⁺ se monitoriza espectrofotométricamente a 238 nm (Kmaitisuiji y col., 2005).

15 Para determinar si un sistema de enzimas particular (como se enumera en la Tabla 1) útil para producir un producto deseado contiene actividades no deseadas de cualquier otro sistema de enzimas (como se enumera en la Tabla 1) que produce un producto no deseado diferente del mismo sustrato polimérico o un sustrato polimérico diferente, puede probarse esta actividad usando un sustrato polimérico específico o sustrato artificial como se ha descrito anteriormente usando cualquiera de los procedimientos como se ha descrito anteriormente.

20 Por ejemplo, si se sospecha que un sistema de enzimas particular que contiene celulasas como se enumera en la Tabla 1 contiene actividad de xilosidasa no deseada (como se enumera en la Tabla 1), la actividad de celulasa primaria puede probarse primero usando un sustrato de celulosa artificial y determinando la cantidad de glucosa liberada después de la adición de una cantidad definida del sistema de enzimas en una unidad de tiempo. Una vez se ha determinado la actividad de celulasa de la preparación, la misma preparación enzimática puede probarse para actividad de xilosidasa poniendo en contacto el sistema de enzimas con un sustrato de xilano artificial y posteriormente midiendo la cantidad de xilosa liberada por una cantidad de enzima definida por unidad de tiempo. Midiendo las velocidades de conversión relativas durante un periodo de tiempo definido con tanto los sustratos de celulosa como xilosidasa usando una cantidad enzimática definida pueden calcularse las actividades específicas para cada clase de sustrato.

30 Sustratos útiles para la determinación de cualquier actividad enzimática como se enumeran en la Tabla 1 se enumeran en la Tabla 2.

35 En una realización alternativa, un enfoque para determinar si un sistema de enzimas contiene cualquier actividad enzimática contaminante independiente es separar los componentes de dicha preparación mediante procedimientos tales como electroforesis o cromatografía. Los componentes individuales de la preparación pueden detectarse usando procedimientos específicos tales como tinción colorimétrica o detección de constituyentes por absorbancia u otros procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia. El % de distribución relativa de constituyentes proteínicos puede determinarse usando procedimientos cuantitativos tales como densitometría o cualquier otro procedimiento equivalente conocido para aquellos expertos en la materia conjuntamente con cálculos matemáticos apropiados.

Determinación de secuencia

45 Antes de las etapas de tratamiento enzimático individuales o en serie requeridas para liberar productos monoméricos u oligoméricos definidos (bloques de construcción) de una materia prima polimérica en bruto o procesada, los componentes solubles de la materia prima polimérica en bruto se separan preferentemente por una o varias etapas de pretratamiento.

50 En una realización preferida de la invención, la(s) etapa(s) de pretratamiento para separar los componentes solubles de la materia prima polimérica en bruto o procesada antes del tratamiento enzimático es (son) una combinación de al menos una etapa de pretratamiento fisicoquímico y una o más etapas de lavado. Según otra realización preferida de la invención, la(s) etapa(s) de lavado para separar los componentes solubles de la materia prima polimérica en bruto o procesada antes del tratamiento enzimático se realiza(n) preferencialmente con disolvente(s) hidrófilo(s), preferentemente disolvente(s) acuoso(s) tal(es) como agua. Como se ha establecido anteriormente, se ha encontrado que la(s) etapa(s) de lavado y etapa(s) de pretratamiento fisicoquímico potencian la eficiencia de la(s) posterior(es) etapa(s) de tratamiento enzimático.

60 Según otra realización preferida, una etapa de pretratamiento fisicoquímico solo se emplea antes de la primera etapa de tratamiento enzimático (etapa a) de la materia prima polimérica en bruto. Tal etapa de pretratamiento fisicoquímico puede combinarse con al menos una etapa de lavado antes de la primera etapa de tratamiento enzimático (etapa a) de la materia prima polimérica en bruto. Más preferido, las etapas de pretratamiento de la materia prima polimérica procesada solo comprenden al menos una etapa de lavado, pero ninguna etapa de pretratamiento fisicoquímico más.

65 Etapas de pretratamiento fisicoquímico para materias primas poliméricas pueden incluir, sin limitación, extracción

con agua caliente, exposición a vapor de baja temperatura, explosión por vapor ácido, explosión por vapor de amoníaco y sonicación. Pueden usarse para modificar físicamente sustratos poliméricos en bruto con el fin de aumentar la accesibilidad superficial de fibras vegetales y disminuir la cristalinidad de la fracción de celulosa (Puls y col., 1985; Ramos y col., 2005; Kinley y col., 2005). Preferencialmente, las etapas de pretratamiento anteriormente mencionadas alteran las propiedades físicas de la estructura del sustrato polimérico en bruto de forma que se hace el sustrato más accesible a las posteriores etapas enzimáticas, pero liberan tanto cantidades limitadas como ninguno de sus bloques de construcción químicos. Además, pueden usarse para eliminar adicionalmente sustancias solubles contenidas en la materia prima polimérica en bruto, antes de poner en contacto la materia prima polimérica en bruto con un sistema de enzimas para prevenir la contaminación de los productos de esta etapa de procedimiento enzimática por sustancias solubles contenidas en la materia prima.

Cuando dos o más etapas de procedimiento se emplean secuencialmente, la secuencia de estas etapas de procedimiento y así la secuencia de añadir mezclas enzimáticas como se describe en la Tabla 1 depende de la composición de materia prima polimérica en bruto específica usada. La secuencia de etapas de procedimiento y sistemas de enzimas se elige de forma que se minimice la dosificación y costes de catalizadores enzimáticos, además del tiempo de contacto de la materia prima que conduce a la liberación de los productos deseados. Adicionalmente, las etapas de secuencia elegidas deben optimizar la pureza, además de la rentabilidad de los productos de reacción monoméricos u oligoméricos liberados del sustrato polimérico. La secuencia de etapas de procedimiento es, por tanto, dependiente de la materia prima y producto.

Según una realización preferida, la secuencia específica de tratamientos enzimáticos necesarios para la descomposición de una materia prima particular en sus constituyentes unitarios puede determinarse empíricamente, aunque la composición de la materia prima sea desconocida. Por tanto, es posible digerir la materia prima polimérica en bruto en etapas de tratamiento separadas con varias mezclas de enzimas de diferentes productos como se enumera en la Tabla 1. Para cada una de las etapas de tratamiento, la pureza y composición de la corriente de producto resultante se mide usando procedimientos analíticos conocidos para el experto en la materia que comprenden, pero no se limitan a, procedimientos espectroscópicos y cromatográficos como se describen previamente para el análisis de la composición de materia prima y para determinar la actividad enzimática.

Usando los resultados de estas mediciones, entonces es posible seleccionar la mezcla enzimática cinéticamente favorable que produce las corrientes de producto más puras como etapa de tratamiento de materia prima primaria. Después del lavado repetido de los insolubles de los restos insolubles resultantes de este tratamiento enzimático particular, los restos se procesan de nuevo con otro número de mezclas de enzimas, excepto con la mezcla de enzimas seleccionada para el tratamiento primario. Para todos estos tratamientos enzimáticos, la composición de producto resultante se determina mediante procedimientos como se describe previamente. La mezcla de enzimas que produce la corriente de producto más pura se selecciona como la etapa de tratamiento secundaria de una materia prima particular. El material insoluble restante derivada del segundo procesamiento se lava de nuevo minuciosamente y se prueba de nuevo con todos los sistemas de enzimas restantes como se ha descrito anteriormente. Este procedimiento de determinar analíticamente y seleccionar las corrientes de producto más puras resultantes de cada una de las mezclas de enzimas restantes en la Tabla 1 se repite preferentemente hasta que la materia prima tanto se descompone completamente como los residuos de materia prima insolubles restantes después de los tratamientos enzimáticos repetidos no planteen una ganancia económica importante al operario en comparación con el coste de otras opciones de tratamiento.

Según la invención, el sistema de enzimas que da la mayor pureza de los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos solubles definidos después del tratamiento de la materia prima polimérica en bruto con el sistema de enzimas y separación de los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos solubles definidos del resto de la materia prima polimérica en bruto (materia prima polimérica procesada) se elige para la primera etapa de tratamiento enzimático según la etapa a).

El segundo sistema de enzimas elegido para la segunda etapa de tratamiento enzimático según la etapa a) es el que da la mayor pureza de los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos solubles definidos después del tratamiento de la materia prima polimérica procesada (obtenidos como resto de la etapa de tratamiento enzimático previa) con el sistema de enzimas y separación de los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos solubles definidos de la materia prima polimérica en bruto.

Cualquier etapa de tratamiento enzimático posterior se realiza con el fin de disminuir la pureza de los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos solubles definidos obtenidos después del tratamiento de la materia prima polimérica procesada (obtenida de la etapa de tratamiento enzimático previa) con el sistema de enzimas respectivo y separación de los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos solubles definidos de la materia prima polimérica procesada.

En otra opción, la composición de materia prima se determina por los procedimientos analíticos anteriormente mencionados antes de la selección de secuencias para las opciones de tratamiento enzimático. Así, según una realización preferida de la invención, los sistemas de enzimas que van a emplearse y su secuencia de uso se determinan analizando primero la materia prima polimérica en bruto.

Una realización preferida tal de la invención se refiere a un procedimiento, en particular para determinar los sistemas de enzimas que van a usarse y su secuencia, en el que, preferentemente después de separar los componentes solubles del sustrato polimérico en bruto como se ha descrito anteriormente, la materia prima polimérica en bruto
5 insoluble

(a) se trata primero en tratamientos enzimáticos separados con cada uno de una pluralidad de sistemas de enzimas (mezclas) tal como se enumeran en la Tabla 1 (seleccionados preferentemente de aquellos que liberan bloques de construcción de sacáridos monoméricos u oligoméricos solubles de la materia prima polimérica);

10

(b) para cada tratamiento enzimático, los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos definidos liberados de la materia prima polimérica en bruto se analizan para pureza de los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos definidos, preferentemente después de la separación sólido-líquido de los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos (solubles) definidos de la materia prima polimérica en bruto (insoluble);

15

(c) el sistema de enzimas que da la mayor pureza se elige para la primera etapa de tratamiento enzimático según la etapa a) de la reivindicación 1;

(d) opcionalmente, la secuencia de etapas a) a c) se repite con el resto de la materia prima polimérica en bruto o
20 procesada con el fin de determinar el sistema de enzimas que va a usarse en la posterior etapa de tratamiento enzimático.

En una realización alternativa, después de separar componentes solubles de la materia prima polimérica en bruto o procesada como se ha descrito anteriormente, mezclas de enzimas selectivas como se enumeran en la Tabla 1 se
25 aplican para elegir como diana la materia prima constituyente que contribuye a la mayor relación másica con respecto a la composición de materia prima. Después del tratamiento enzimático, la pureza de la corriente de producto resultante tiene que determinarse como se describe previamente para la determinación analítica de los componentes de la materia prima. Se desea, según una realización preferida, que la pureza sea tal que más del 75 % en peso, preferentemente más del 90 % en peso, más preferentemente más del 95 % en peso, más
30 preferentemente más del 99 % en peso del contenido de sólido total (preferentemente de la fracción soluble) consista en los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos definidos.

Si la descomposición enzimática del componente de materia prima de mayor masa produce una corriente de producto puro (como se ha definido anteriormente), este tratamiento puede aplicarse como etapa primaria para el
35 procesamiento de materia prima. El lavado de la mezcla insoluble resultante y posterior separación sólido-líquido de la partícula del sobrenadante se preparará para las siguientes etapas de procesamiento. Los insolubles restantes derivados del tratamiento de materia prima primario se tratarán con sistemas de enzimas específicos, tales como los sistemas de enzimas enumerados en la Tabla 1, que eligen como diana los constituyentes de materia prima que constituyen la segunda mayor relación másica con respecto a la composición de materia prima. La corriente de
40 producto resultante tiene de nuevo que analizarse por dichos procedimientos analíticos para determinar la pureza de producto antes de que pueda determinarse el tratamiento enzimático seleccionado como la segunda opción de tratamiento para el procesamiento de materia prima. Los residuos insolubles resultantes del tratamiento enzimático secundario pueden entonces lavarse y procesarse como se describe previamente. Mediante tratamientos iterativos con sistemas de enzimas específicos enumerados en la Tabla 1, que siempre eligen como diana el sustrato
45 polimérico que constituye el constituyente de mayor relación másica en el residuo de materia prima insoluble restante resultante de ciclos de tratamiento enzimático previos, la materia prima puede descomponerse secuencialmente en sus constituyentes unitarios.

Otro aspecto preferido de la invención se refiere a un procedimiento, en particular para determinar los sistemas de
50 enzimas que van a usarse y su secuencia, en el que, preferentemente después de separar componentes solubles de la materia prima polimérica en bruto como se ha descrito anteriormente, la materia prima polimérica en bruto insoluble

(a) se trata primero en tratamientos enzimáticos separados con cada uno de una pluralidad de sistemas de enzimas
55 (mezclas) tal como se enumeran en la Tabla 1 (seleccionados preferentemente de aquellos que liberan bloques de construcción de sacáridos monoméricos u oligoméricos solubles de la materia prima polimérica) para determinar los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos que contribuyen a la mayor relación másica en la materia prima polimérica en bruto;

(b) los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos definidos que contribuyen a la mayor relación másica en la materia prima polimérica en bruto se analizan para pureza, preferentemente después de la separación de la materia prima polimérica en bruto;

(c) si la pureza como se determina es de forma que más del 75 % en peso, preferentemente más del 90 % en peso,
65 más preferentemente más del 95 % en peso, más preferentemente más del 99 % en del contenido de sólido total consiste en los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos definidos, el sistema de enzimas respectivo se

elige para la primera etapa de tratamiento enzimático según la etapa a) de la reivindicación 1;

(d) si la pureza determinada según la etapa b) es inferior a la requerida según la etapa c), los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos definidos que contribuyen a la siguiente mayor relación másica en la materia prima polimérica en bruto se analizan para pureza, preferentemente después de la separación sólido-líquido de la materia prima polimérica en bruto (insoluble) en consecuencia, hasta que la pureza satisfaga el requisito según la etapa c) y el sistema de enzimas respectivo se elija para la primera etapa de tratamiento enzimático según la etapa a) de la reivindicación 1;

10 (e) opcionalmente, la secuencia de etapas a) a d) se repite con el resto de la materia prima polimérica en bruto o procesada con el fin de determinar el sistema de enzimas que va a usarse en la posterior etapa de tratamiento enzimático.

15 Todavía otro aspecto preferido de la invención se refiere a un procedimiento, en particular para determinar los sistemas de enzimas que van a usarse y su secuencia, en el que la materia prima polimérica en bruto

(a) se trata primero en tratamientos enzimáticos separados con cada uno de una pluralidad de enzima o sistemas de enzimas (mezclas) tal como se enumeran en la Tabla 1 (seleccionados preferentemente de aquellos que liberan bloques de construcción de sacáridos monoméricos u oligoméricos solubles de la materia prima polimérica) para 20 determinar el tratamiento enzimático que conduce al mayor rendimiento de bloques de construcción monoméricos u oligoméricos contenidos en la materia prima polimérica en bruto;

(b) se seleccionan aquellos tratamientos enzimáticos que dan un producto monomérico u oligomérico definido con una pureza de más del 75 % en peso, preferentemente más del 90 % en peso, más preferentemente más del 95 % 25 en peso, más preferentemente más del 99 % en peso de los sólidos totales (preferentemente después de la separación de la materia prima polimérica en bruto insoluble o procesada);

(c) entre los restantes tratamientos enzimáticos se determina el tratamiento con el mayor rendimiento de producto monomérico u oligomérico;

30 (d) opcionalmente se repite la secuencia de etapas a) a c) con el resto de la materia prima polimérica en bruto o procesada con el fin de determinar el sistema de enzimas que va a usarse en la posterior etapa de tratamiento enzimático.

35 Según otro aspecto preferido de la invención, los sistemas de enzimas usados en la etapas de tratamiento enzimático se emplean en una secuencia según la secuencia obtenible según los procedimientos anteriores de determinar los sistemas de enzimas que van a usarse.

Según otro aspecto preferido de la invención, los sistemas de enzimas para los que anteriormente se ha tratado una 40 determinación de la ventajosa secuencia de aplicación comprenden o consisten en enzimas que liberan bloques de construcción de sacáridos monoméricos u oligoméricos solubles de la materia prima polimérica (en bruto). Según otra realización preferida de la invención, las enzimas y sistemas de enzimas respectivos son aquellos que tienen una actividad (principal) dirigida a la degradación de oligo o polisacáridos y/o que liberan bloques de construcción de sacáridos monoméricos u oligoméricos solubles de la materia prima polimérica en bruto o procesada.

45 Según una realización, para la determinación del rendimiento o pureza de los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos solubles definidos (producto) obtenidos en un tratamiento enzimático particular tras la separación de los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos solubles definidos de la materia prima polimérica en bruto o procesada (restante insoluble) después de la incubación de enzimas, la suspensión de hidrólisis (con la enzima y la materia prima polimérica) se centrifugó a 10.000 g durante 15 min. El sobrenadante (que comprende los bloques 50 de construcción monoméricos u oligoméricos solubles definidos) se procesó como se describe en lo sucesivo en los ejemplos y se sometió a análisis de HPAE-PAD (Dionex, Ca., USA, 6) para determinar su composición de azúcares y ácido urónico.

55 Como se ha establecido anteriormente, según un aspecto preferido de la invención, los sistemas de enzimas empleados deben ser bajos en o esencialmente carecer de otras actividades enzimáticas o actividades enzimáticas contaminantes que liberan bloques de construcción monoméricos u oligoméricos distintos de los previstos de la materia prima polimérica en bruto o procesada.

60 Así, según una realización preferida, el sistema de enzimas usado en una etapa de tratamiento enzimático particular contiene no más del 50 %, preferentemente no más del 20 %, más preferentemente no más del 10 %, más preferentemente no más del 5 %, más preferentemente no más del 2 %, más preferentemente no más del 1 % de (otras) actividades enzimáticas contaminantes, que no se han empleado en una etapa de tratamiento enzimático previa usando un sistema de enzimas diferente o que pueden producir la liberación de otros bloques de construcción 65 monoméricos u oligoméricos definidos que no se han liberado en etapas de tratamiento enzimático previas, o, según una realización adicional, que pueden solo producir la liberación de productos de sustratos poliméricos que están

inicialmente esencialmente ausentes de la materia prima polimérica. El porcentaje de otras actividades enzimáticas o actividades enzimáticas contaminantes en el sistema de enzimas puede calcularse como se explica anteriormente. "Esencialmente ausente de", según una realización preferida, significa menos del 20 % en peso, preferentemente menos del 10 % en peso, preferentemente menos del 5 % en peso, preferentemente menos del 2 % en peso, 5 preferentemente menos del 1 % en peso de la materia prima polimérica total.

Sin embargo, según una realización ventajosa y preferida de la invención, el sistema de enzimas empleado en una etapa de tratamiento enzimático particular contiene como actividades enzimáticas contaminantes una o más de tales actividades enzimáticas, que se han empleado en una etapa de tratamiento enzimático previa usando un sistema de 10 enzimas diferente, o, según otra realización, sistemas de enzimas, que pueden solo producir la liberación de otros bloques de construcción monoméricos u oligoméricos de sustratos poliméricos que están inicialmente esencialmente ausentes en la materia prima polimérica en bruto o procesada. En otras palabras, se ha encontrado que cuando un bloque de construcción monomérico u oligomérico particular se ha liberado previamente de la materia prima polimérica en bruto o procesada en una etapa de tratamiento enzimático previa (o no estaba presente en la materia 15 prima polimérica en bruto desde el principio), no es esencial que el sistema de enzimas usado en una etapa posterior esté esencialmente libre de la actividad enzimática respectiva usada como principal actividad en cualquiera de la etapa de tratamiento enzimático previa. Una ventaja de esta realización es que pueden usarse sistemas de enzimas menos puros y así menos costosos en la segunda y siguiente etapas de tratamiento enzimático.

20 Adicionalmente, según otra realización preferida de la invención, los sistemas de enzimas usados para procesar un constituyente de materia prima polimérica en bruto o procesada particular pueden contener (otras) actividades enzimáticas contaminantes si éstas actúan sobre productos intermedios de reacción específicos resultantes de las anteriores reacciones enzimáticas y si los productos finales son idénticos. En otras palabras, otra realización preferida de la invención se refiere a un procedimiento en el que el sistema de enzimas usado en una etapa de 25 tratamiento enzimático particular tiene una actividad enzimática principal (como se ha descrito anteriormente) y contiene al menos una actividad enzimática adicional que conduce al (a los) mismo(s) bloque(s) de construcción monomérico(s) u oligomérico(s) definido(s) de la materia prima polimérica en bruto o procesada como la principal actividad enzimática del sistema de enzimas, en particular de un sustrato polimérico diferente presente en la materia prima polimérica en bruto o procesada.

30 Según una realización preferida, la materia prima es una materia prima rica en pectina de arabinano y la enzima o sistema de enzimas usado en la primera etapa a) de tratamiento enzimático está seleccionado del grupo de enzimas que liberan arabinosa o sistemas de enzimas según la Tabla 1, y el bloque de construcción monomérico u oligomérico soluble definido es arabinosa, y la enzima o sistema de enzimas usado en la segunda etapa a) de 35 tratamiento enzimático está seleccionado del grupo de enzimas que liberan ácido urónico o sistemas de enzimas según la Tabla 1, y el bloque de construcción monomérico u oligomérico soluble definido es ácido urónico. En esta realización se prefiere adicionalmente que la enzima o sistema de enzimas usado en la primera etapa a) esté seleccionado del grupo: Endoarabinasa de *A. niger*; arabinofucosidasa de *A. niger* y la enzima o sistema de enzimas usado en la segunda etapa a) está seleccionado del grupo: Pectinasa (pectato liasa, poligalacturonasa) de *A.* 40 *aculeatus*, *A. niger* o *C. japonicus*.

Según otra realización preferida, la materia prima es una materia prima rica en arabinano-pectina-celulosa y la enzima o sistema de enzimas usado en la primera etapa a) de tratamiento enzimático está seleccionado del grupo de enzimas que liberan arabinosa o sistemas de enzimas según la Tabla 1, y el bloque de construcción monomérico 45 u oligomérico soluble definido es arabinosa, la enzima o sistema de enzimas usado en la segunda etapa a) de tratamiento enzimático está seleccionado del grupo de enzimas que liberan glucosa o sistemas de enzimas según la Tabla 1, y el bloque de construcción monomérico u oligomérico soluble definido es glucosa, y la enzima o sistema de enzimas usado en la tercera etapa a) de tratamiento enzimático está seleccionado del grupo de enzimas que liberan ácido urónico o sistemas de enzimas según la Tabla 1, y el bloque de construcción monomérico u oligomérico 50 soluble definido es ácido urónico. En esta realización se prefiere adicionalmente que la enzima o sistema de enzimas usado en la primera etapa a) se seleccione del grupo: Endoarabinasa de *A. niger*; arabinofucosidasa de *A. niger*, la enzima o sistema de enzimas usado en la segunda etapa a) está seleccionado del grupo: Beta-glucosidasa de *A. niger* o de *T. reesei*; celobiohidrolasa I-II de *T. reesei*; endo-beta-1-4-D-glucanasa I-V de *T. reesei*, y la enzima o sistema de enzimas usado en la tercera etapa a) está seleccionado del grupo: Pectinasa (pectato liasa, 55 poligalacturonasa) de *A. aculeatus*, *A. niger* o *C. japonicus*.

Lo siguiente son otras realizaciones preferidas de la invención, que indican una secuencia de etapas de tratamiento enzimático dependiendo de la naturaleza o composición de la materia prima polimérica en bruto usada.

60 1. Para materia primera rica en arabinano / pectina (por ejemplo, remolacha), es decir, materias primas con >15 % en peso de arabinano, >10 % en peso de pectina, <10 % en peso de celulosa y <10 % en peso de xilano se emplea preferentemente la siguiente secuencia de etapas de tratamiento enzimático:

1.) despolimerización/degradación de arabinano

65 2.) despolimerización/degradación de pectina

2. Para materias primas ricas en arabinano/ pectina/ celulosa, es decir, materias primas con >15% en peso de arabinano, >10 % en peso de pectina, >10 % en peso de celulosa y <10 % en peso de xilano se emplea preferentemente la siguiente secuencia de etapas de tratamiento enzimático:

5 1.) despolimerización/degradación de arabinano

2.) despolimerización/degradación de celulosa

3.) despolimerización/degradación de pectina

10

3. Para materias primas ricas en arabinano/ xilano/pectina/ celulosa, es decir, materias primas con >15 % en peso de arabinano, > 10 % en peso de xilano, >10 % en peso de pectina y >10 % en peso de celulosa se emplea preferentemente la siguiente secuencia de etapas de tratamiento enzimático:

15 1.) despolimerización/degradación de arabinano

2.) despolimerización/degradación de xilano

3.) despolimerización/degradación de celulosa

20

4.) despolimerización/degradación de pectina

4. Para materia prima rica en manano/ xilano/ arabinano (por ejemplo, cáscaras del grano del café), es decir, materias primas con > 15 % en peso de manano, > 10 % en peso de xilano, >15 % en peso de arabinano y <10 % en peso de celulosa se emplea preferentemente la siguiente secuencia de etapas de tratamiento enzimático:

25 1.) arabinano

2.) despolimerización/degradación de xilano

30

3.) despolimerización/degradación de manano

5. Para materia prima rica en galactano (por ejemplo, arabinogalactano de madera de alerce; galactomanano de guar), es decir, materias primas con >10 % en peso de galactano, <10 % en peso de pectina y <10 % en peso de xilano se emplea preferentemente la siguiente secuencia de etapas de tratamiento enzimático:

35

1.) despolimerización/degradación de galactano

2.) xilano o arabinano dependiendo de la composición de materia prima

40

3.) despolimerización/degradación de manano

En el caso preferido, dichas mezclas de enzimas aplicadas tienen que estar esencialmente libres de actividades enzimáticas específicas que producirían la contaminación de la corriente de producto resultante.

45

En otro caso específico en el que la arabinosa y la xilosa son productos de interés y la materia prima polimérica en bruto contiene sustratos poliméricos que comprenden polímeros de hemicelulosa heterogéneos tales como arabinoxilano, una mezcla de enzimas designada en la Tabla 1 para la conversión y movilización de unidades de arabinosa ramificada se aplica primero. Posteriormente, las unidades de arabinosa solubles se separan de la restante materia prima insoluble antes de aplicar una segunda mezcla de enzimas designada en la Tabla 1 para movilizar las unidades de xilosa contenidas en polímeros de xilano. Entonces, las unidades de xilosa solubles también se separan de la restante materia prima insoluble.

50

Las etapas de procedimiento enzimático pueden combinarse con una o más etapas de pretratamiento. Tal(es) etapa(s) de pretratamiento puede(n) ser no selectivas para extraer componentes de bajo valor comercial que de otro modo contaminarían las corrientes de producto de alto valor del procedimiento. Así, según una realización, una o más de las etapas de pretratamiento se usan para extraer o de otro modo eliminar componentes definidos. Alternativamente, pueden usarse una o más etapas de pretratamiento selectivas que proporcionan una selectividad comparable a etapas de procedimiento enzimáticas en solubilizar componentes químicos individuales de los sustratos poliméricos en bruto. Así, según una realización, una o más etapas de pretratamiento se usan para aumentar la selectividad de las posteriores etapas de tratamiento enzimático. Ejemplos de tales etapas de procedimiento serían solubilización de la fracción de lignina de BLC por disolventes orgánicos tales como etanol o glicerol (Itoh y col., 2003; Demirbas, A., 1998). Estas etapas de pretratamiento individuales y condiciones son conocidas para el experto en la materia. En una alternativa adicional, dichas etapas de pretratamiento no selectivas se aplican a residuos insolubles, que se han liberado de contaminantes por etapas de procedimiento selectivas previas. Un ejemplo de una etapa de procedimiento tal es la hidrólisis completa de la fracción de proteínas por

65

tratamiento ácido después de la solubilización selectiva de la hemicelulosa, celulosa y fracción de lignina de BLC por las etapas de procedimiento selectivas anteriormente dichas.

Otro ejemplo específico para una realización de la invención se facilita en la Figura 1. Así, la Figura 1 muestra un flujo de procedimiento para el procesamiento enzimático secuencial de BLC.

En esta ilustración (véase la Fig. 1) de procesamiento de un sustrato rico en celulosa, hemicelulosa y ligninas y con bajas cantidades de proteínas y lípidos como paja de trigo, hojas y tallos de maíz o madera blanda, la solubilización de los diversos componentes de pentosa contenidos en la fracción de hemicelulosa se logra por tratamiento secuencial con las enzimas xilanasas, arabinasas y mananasas, que liberan específicamente los azúcares xilosa, arabinosa y manosa, respectivamente. Enzimas adecuadas y condiciones de procedimiento para proporcionar condiciones de procedimiento óptimas para las enzimas son conocidas para el experto en la materia. La fracción soluble se elimina después de cada etapa de procedimiento y los insolubles se ponen en contacto con la posterior enzima. Después del procesamiento de la fracción de pentosa, una etapa de procedimiento similar se añade para convertir celulosa en glucosa usando una mezcla de exo- y endocelulasas opcionalmente en combinación con celobiasa o beta-glucosidasa para liberar glucosa y celobiosa de la fracción celulósica del sustrato de BLC. Estos productos de reacción solubles se eliminan de la mezcla de reacción con el sobrenadante. Similarmente, la fracción de lignina que queda en la fase insoluble se convierte en sus diversos bloques de construcción fenólicos usando sistemas de enzimas específicos, tales como lacasas y lignina peroxidasas. Estos compuestos fenólicos y oligofenólicos se extraen entonces de la mezcla de reacción con el sobrenadante o por extracción con disolvente. Las condiciones de procedimiento para realizar esta etapa de procedimiento son conocidas para el experto en la materia. Cada uno de los productos resultantes individuales de conversión enzimática de hemicelulosa, celulosa, lignina, u otros constituyentes de BLC, podrían aislarse después de cada ronda sucesiva de aplicación de enzimas (véase la Fig. 1). Los bloques de construcción químicos esencialmente puros resultantes de fenólicos, azúcares de pentosa y hexosa podrían entonces procesarse adicionalmente a productos comerciales de alto valor (véase la Fig. 1). En general, según una realización, los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos definidos liberados de la materia prima polimérica en bruto o procesada se purifican y opcionalmente se procesan adicionalmente.

En un caso, los productos de interés son arabinosa, xilosa, glucosa, oligofenilpropanoides, monolignoles y/o monofenólicos y estos productos se producen por conversión de la materia prima polimérica paja de trigo en sus constituyentes componentes por una conversión enzimática secuencial.

En la etapa primaria de un procedimiento secuencial tal, paja de trigo finamente molida (1 kg de peso, 0,2 µm) con un contenido de humedad aproximado del 5 % en peso/peso se dispone en un recipiente de acero. Se añade una cantidad mínima de 2 l de agua y se mezcla con la materia prima. La suspensión resultante se deja en remojo durante 4 h a temperatura ambiente. El líquido en exceso se elimina para dejar aproximadamente 200 ml de la disolución. El recipiente se cierra y se calienta durante 1 h a 121 °C a 10 bar de presión en un sistema de autoclave esterilizante convencional (Puls y col., 1985; Harms, 1989; Foody y col., 1998). La presión del recipiente se libera rápidamente y el contenido se deja enfriar a temperatura ambiente. Bajo estas condiciones, el estado de polimerización de los componentes de la materia prima se reduce, pero solo una fracción mínima de sus componentes se libera en forma soluble. La fase líquida resultante (que contiene sales y cantidades menores de diversos componentes solubles) y la fase insoluble (que contiene sustratos poliméricos insolubles tales como celulosa, hemicelulosa y lignina) se separan a modo de filtración, tamizado o centrifugación, y la fase insoluble se procesa adicionalmente.

En la siguiente etapa, con el fin de movilizar componentes de arabinosa contenidos en la fracción de hemicelulosa insoluble, se aplica una mezcla de alfa-L-arabinofuranosidasas. Todas las reacciones mencionadas más adelante se realizan como mínimo de 40 °C durante 24 h en tampón fosfato 50 mM que tiene un pH de 5-7. 0,08-1 g de GH51 alfa-L-arabinofuranosidasa de *Clostridium thermocellum* / kg de materia prima se añaden para hidrolizar los restos de alfa-1,2/1,3-arabinofuranosilo de arabinano y xilano (Taylor y col., 2006). Posteriormente, 0,08-1 g de GH43 alfa-L-arabinofuranosidasa de *Humicola insolens* / kg de materia prima se añaden para hidrolizar las unidades de alfa-1,5-arabinofuranosilo (Sorensen y col., 2006). Debido a la especificidad de la mezcla de enzimas, la fase líquida resultante contiene principalmente arabinosa. Las unidades de arabinosa liberadas y solubles se separan de la mezcla insoluble filtrando o por centrifugación. La fracción insoluble restante se retiene para procesamiento adicional.

En la siguiente etapa, con el fin de convertir constituyentes de xilano insolubles en unidades de xilosa solubles, se aplica una mezcla de xilanasas y xilosidasas. Todas las reacciones se realizan como mínimo de 40 °C durante 24 h en tampón fosfato 50 mM que tiene un pH de 5-7. 0,08-1 g de endo-1,4-beta-xilanasas (GH10 ó 11) de *Humicola insolens* / kg de materia prima y 0,08-1 g de beta-xilosidasa (GH3) de *Trichoderma reesei* / kg de materia prima se añaden para liberar xilo-oligosacáridos y unidades de xilanosas, respectivamente. Debido a la especificidad de la mezcla de enzimas, la fase líquida resultante contiene principalmente xilosa. La xilosa soluble se separa de los restos de materia prima insoluble filtrando o por centrifugación.

En la siguiente etapa, con el fin de movilizar azúcares de hexosa que quedan en hemicelulosa y fracciones celulósicas, los insolubles respectivos se ponen en contacto con una mezcla de enzimas optimizada que contiene

endo- y exocelulasas. Todas las reacciones se llevan a cabo como mínimo de 50 °C durante 16 h en tampón acetato de sodio 50 mM (pH 5-6). Las mezclas de cada uno de 0,005-1 g de 1,4-beta-endoglucanasas (Cel5A, Cel7B, Cel12A, Cel61A) y 1,4-beta-celobiohidrolasas (Cel7A, Cel6A) de *Trichoderma reesei* / kg de materia prima insoluble se añaden para movilizar azúcares de hexosa (Irwin y col., 1993, Kim y col., 1998). La eficacia y cinética de la conversión de celulosa a unidades de azúcar monomérico se potencia opcionalmente mediante la adición de 0,0005-0,01 g de celobiosa deshidrogenasa de *Phanerochaete chrysosporium* en combinación con 0,05-1 g de ferrocianuro y 0,0005-0,1 g de beta-glucosidasa (10 % en peso de mezcla de enzimas) de *Aspergillus niger* / kg de materia prima (Igarashi y col., 1998, Rosgaard y col., 2006). Debido a la especificidad de la mezcla de enzimas, la fase líquida resultante contiene principalmente hexosas, que consisten predominantemente en glucosa. Éstas se separan adicionalmente a modo de filtración o centrifugación de los restos de partículas finas de la materia prima.

En la siguiente etapa, la lignina insoluble que queda después de los tratamientos enzimáticos previos se convierte en sus constituyentes por contacto secuencial con sistemas de enzimas de lignina peroxidasa y lacasa. Las reacciones con lignina peroxidasa se llevan a cabo en un mínimo de tartrato de sodio 50 mM (pH 3,5) y a una temperatura máxima de 32 °C. Las ligninas insolubles altamente poliméricas se descomponen oxidativamente poniendo en contacto con cada uno de 0,5-1 g de lignina peroxidasa (LIP) de *Phanerochaete chrysosporium* / kg de materia prima (Ward y col., 2003). Para prevenir la inactivación catalítica de LIP (formación del compuesto III, Wariishi y Gold 1990) debido a la presencia de exceso de H₂O₂ en la mezcla de reacción, se usa un sistema de generación de H₂O₂ enzimático soluble para proporcionar un entorno controlado y continuo para la formación de H₂O₂. Puede emplearse la potencia generadora de H₂O₂ de glioxal oxidasa (GLOX), una enzima accesoria natural que funciona en sinergia con lignina peroxidasa (Kersten 1990). La reacción de GLOX requiere el mismo pH, fuerza iónica y perfil de temperatura que se describe para LIP. La generación de H₂O₂ se induce mediante la adición de 0,05-1 g de GLOX y 0,1-1 g del sustrato de GLOX metilglioxal / kg de materia prima. Con el fin de inducir y potenciar la descomposición oxidativa de lignina polimérica por LIP, el mediador rédox alcohol veratrílico (alcohol 3,4-dimetoxibencilico) se añade para continuar hasta la completitud (Ferafontova y col., 2006). Una degradación más eficaz de lignina insoluble puede lograrse añadiendo 2 g de alcohol veratrílico / kg de materia prima (Barr y col., 1993). Los principales productos de reacción de la descomposición oxidativa catalizada por LIP de lignina insoluble son oligofenilpropanoides, mientras que los monolignoles son solo componentes minoritarios de la mezcla de productos.

Con el fin de aumentar la cantidad de monofenólicos en la mezcla de productos, la mezcla de productos derivada de LIP se hace reaccionar adicionalmente con lacasa (d'Acunzo y col., 2002). La reacción se lleva a cabo como mínimo de 40 °C durante 6 h en tampón fosfato 100 mM que tiene un pH de 5-6. Se añaden 0,0004 g de lacasa de *Trametes versicolor* y 0,0005 g de 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-iloxi (TEMPO) como mediador rédox / kg de materia prima (Arias y col., 2003) para oxidar oligofenólicos a unidades de lignina monofenólicas. Debido a la especificidad de la mezcla de enzimas, la fase líquida resultante contiene principalmente unidades de lignina monofenólicas. La mezcla de productos resultantes se separa de la mezcla restante por filtración en membrana y centrifugación simple.

Los siguientes ejemplos muestran la influencia de la secuencia de etapas de tratamiento enzimático con diferentes materias primas lignocelulósicas. Los ejemplos en el presente documento pretenden ilustrar adicionalmente la invención, pero no debe interpretarse que limitan de ningún modo el alcance de la invención.

Preparación de sustrato:

Paja de trigo pretratada: Se molió paja de trigo seca a 120 µm. Entonces, 2 g de paja molida se suspendieron en 39,6 ml de agua d.d. y 0,4 ml de H₂SO₄ 12 N (1 % v/v). La suspensión se esterilizó en autoclave a 135 °C durante 30 min. La mezcla se enfrió a TA y se centrifugó a 10.000 g durante 15 min. El sobrenadante resultante se desechó. El sedimento restante se procesó con tres ciclos de lavado/ centrifugación intermedios (10.000 g/ 15 min) usando tampón acetato sódico 50 mM (pH 5). Después de la etapa de centrifugación final, el sólido se resuspendió en 35 ml de acetato sódico 50 mM (pH 5) dando una disolución madre de sustrato al 5 % en peso/peso (40 g totales).

Paja de trigo sin tratar, pulpa de remolacha azucarera, xilano de espelta de avena, arabinoxilano de centeno: Muestras secas de paja de trigo (producción agrícola local), pulpa de remolacha azucarera (aditivo para piensos animales), xilano de espelta de avena (Sigma, Weilheim, Alemania, n° de cat: X0627) se molieron a 120 µm. Para la preparación de disoluciones madres de sustrato individuales, 2 g de cada material molido se colocaron en un tubo Flacon. El tubo se llenó entonces con tampón acetato sódico 50 mM (pH 5) hasta la marca de 40 g dando una suspensión de sustrato final del 5 % (peso/peso).

Se suministró arabinoxilano de centeno (Megazymes, Irlanda, n° de cat: P-RAXY) como polvo fino blanco. Para la preparación de la disolución madre de sustrato, 0,2 g se pesaron en un tubo Flacon (15 ml). El tubo se llenó entonces con tampón acetato sódico 50 mM hasta la marca de 40 g dando una disolución madre final del 5 % (peso/peso).

Preparación de enzimas:

Arabinasa (Ara, fuente: *A. niger*, cat.: E-EARAB), arabinofucosidasa (Arafus, fuente: *A. niger*, cat.: E-AFASE),

celobiohidrolasa I (CBH I, fuente: *Trichoderma sp.*, cat.: E-CBH1), endo- β -D-glucanasa (EGII, fuente: *Trichoderma sp.*, cat.: E-CELTR), endo- β -mananasa (Man, fuente: *A. niger*, cat.: E-BMANN), xilanasa (Xil 1, fuente: *T. viride*; cat.: E-XYTRI), poligalacturonasa (Poli, fuente: *A. aculeatus*, cat.: E-PGALUSP) se suministraron por Megazymes Inc., Irlanda, como precipitados en sulfato de amonio (volumen total: 1 ml). Estas preparaciones de enzima se desalaron y se concentraron con 45 ml de tampón acetato sódico (50 mM, pH 5) usando 50 ml de dispositivos de ultrafiltración centrífuga Amicon (corte de 10 kDa; Millipore, Maidstone, RU).

Una mezcla de celulasa comercial (Worth. Cel., cat.: Cel; 108 U/mg de DW) que contiene actividades de celobiohidrolasa (CBH I y CBH II), endocelulasa (EG 1, EG II), β -glucosidasa (BGL) y endo-xilanasa se suministró por Worthington Biochemical Corp. (NJ., EE.UU.) como un polvo blanco seco. Las disoluciones madre de esta preparación de celulasa (0,5 mg/ml) se prepararon en 10 ml de tampón acetato sódico (50 mM, pH 5).

Se suministró pectinasa (Pec, actividades: pectato liasa, poligalacturonasa; cat.: Pectinex Ultra SP-L) de *A. aculeatus* y β -glucosidasa de *A. niger* (BGL, cat.: Novo 188) como una disolución concentrada lista para su uso por Novozymes, Dinamarca.

Una actividad de endo-xilanasa adicional (Xil 2, referencia de BLAST: AAZ56956/ gi:71917054; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) de la cepa YX de *Thermobifida fusca* se expresó recombinantemente en *S. cerevisiae*. La actividad enzimática se obtuvo de caldo de fermentación clarificado y concentrado usando dispositivos de ultrafiltración centrífuga Amicon (Millipore, Maidstone, RU).

Las concentraciones de proteína se determinaron por el procedimiento de Bradford (Bradford, M., 1976).

Preparación de lignina para hidrólisis:

Se pretrató paja de trigo (300 g) usando una metodología de explosión por vapor convencional (25 bar de vapor/ 5 min con liberación de presión repentina) en presencia de 1 % (peso/volumen) de H₂SO₄ 12 N. La suspensión resultante se centrifugó a 10.000 g (15 min) y el sobrenadante se decantó. El sólido restante se lavó/ neutralizó tres veces con 40 ml de tampón acetato sódico (50 mM, pH 5) antes de secarse a vacío y posteriormente se molió a 120 μ m dando un polvo fino. Para preparar una suspensión al 5 % (peso/peso), 2 g del polvo de paja se mezclaron con 35 ml de tampón acetato sódico (50 mM, pH 5) dando un volumen total de 40 ml. La suspensión de paja de 40 ml se mezcló con 4 % (peso/peso de sustrato) de mezcla de celulasa de Worthington y 0,5 % (peso/peso) de actividad de β -glucosidasa de *Aspergillus niger* (Novo 188, Novozymes). La mezcla resultante se incubó a 45 °C (250 rpm) durante 48 h en una mezcladora giratoria Eppendorf. Después del periodo inicial de incubación, la suspensión se centrifugó a 12.000 g (15 min) y el sobrenadante resultante se decantó. El sólido restante se lavó dos veces con agua d.d., se centrifugó (12.000 g/15 min) y se resuspendió en tampón acetato sódico (50 mM, pH 5) dando un volumen final de 40 ml. La suspensión se mezcló de nuevo con 4 % (peso/peso de sustrato) de mezcla de celulasa de Worthington y 0,5 % (peso/peso) de β -glucosidasa de *Aspergillus niger* (Novo 188, Novozymes) antes de incubarse durante un periodo de 24 h adicionales a 45 °C. Después de este periodo de incubación secundario, el sólido se separó por centrifugación como se ha descrito previamente. El sólido se lavó de nuevo dos veces con agua d.d. y posteriormente se centrifugó (10.000 g/15 min) para separar fases líquidas y sólidas. El sólido resultante se secó entonces a vacío durante 24 h dando la fracción de lignina de hidrólisis (374 mg) usada para los siguientes conjuntos experimentales. Para garantizar que la lignina obtenida por esta metodología no retuvo ningún azúcar residual, 50 mg del sólido obtenido se sometieron a hidrólisis catalizada por ácido total según protocolos publicados por NREL (5). La presencia de posibles componentes de azúcar se probó por cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento combinada con análisis de detección amperométrica pulsada (HPAE-PAD) (Dionex, Ca., EE.UU., 6). Aunque esta metodología es más sensible (~ 1000 veces) que los protocolos de HPLC convencionales, no pudieron detectarse azúcares residuales en el residuo de lignina de hidrólisis obtenido aquí.

Experimentos de hidrólisis enzimática secuenciales:

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 0,5 ml con un sistema de tampón acetato sódico (50 mM, pH 5). Los controles positivos consistieron en una única etapa de hidrólisis enzimática para cada sustrato (2,5 % en peso/volumen = 25 mg/ml) usando la mezcla de celulasa de Worthington (1 % en peso/peso de sustrato = 0,25 mg/ml). Se llevaron a cabo las siguientes reacciones de hidrólisis secuenciales de diversos sustratos en dos etapas independientes.

La concentración de sustrato inicial para las reacciones de hidrólisis primaria fue 2,5 % (peso/volumen), mientras que la concentración de enzima total fue 1 % (peso/peso de sustrato) mantenida constante en cada reacción. La distribución másica de componentes del azúcar en el sustrato individual es evidente de la Tabla 1A. Cada reacción enzimática se incubó a 45 °C/ 250 rpm durante 48 h en una mezcladora giratoria Eppendorf. Después de la hidrólisis primaria, la suspensión se centrifugó a 10.000 g durante 15 min. El sobrenadante se decantó, se filtró (0,2 μ m) y se sometió a análisis de HPAE-PAD (Dionex, Ca., EE.UU., 6) para determinar su composición de azúcar y ácido urónico.

65

ES 2 459 291 T3

El sedimento que quedó después de la hidrólisis primaria se resuspendió en 1 ml de agua y se centrifugó (10.000 g/15 min). Después de la centrifugación, el lavado de agua se desechó y el sedimento (~ 100 ml de volumen) se usó para los experimentos de hidrólisis secundaria. La concentración de enzima añadida en el sistema de hidrólisis secundaria fue del 1 % en peso/peso (0,25 mg/ml) con respecto a la concentración de sustrato inicial. Después de la adición de enzima, el volumen de reacción se enrasó a 0,5 ml con tampón acetato sódico. Para la etapa de hidrólisis secundaria se usaron diferentes actividades enzimáticas a las de la etapa de reacción primaria. Sin embargo, en los casos en los que se usaron mezclas de enzimas industriales, pudo tolerarse la actividad de enzimas minoritarias, que fueron equivalentes a la etapa de reacción primaria. Después del periodo de incubación de 48 h, la suspensión de hidrólisis se centrifugó a 10.000 g durante 15 min. El sobrenadante se procesó como se describe previamente y se sometió a análisis de HPAE-PAD (Dionex, Ca., EE.UU., 6) para determinar su composición de azúcar y ácido urónico.

Las combinaciones exactas de enzimas y sustratos usados para la etapa de hidrólisis primaria y secundaria para cada sustrato se enumeran en la Tabla 2A.

La siguiente lista contiene concentraciones/ combinaciones de enzima para reacciones individuales:

- 1.) Arabinasa (Ara: 0,2 mg/ml) + arabinofucosidasa (Arafus: 0,05 mg/ml)
- 2.) CBH I (0,175 mg/ml) + EG II (0,005) + BGL (0,025 mg/ml)
- 3.) Mananasa (Man: 0,25 mg/ml)
- 4.) Poligalacturonasa (Poli: 0,25 mg/ml)
- 5.) Pectinasa (Pec: 0,25 mg/ml)
- 6.) Xilanasa (Xil 1 o Xil 2: 0,25 mg/ml)
- 7.) Xilanasa (Xil 1 o Xil 2: 0,2 mg/ml) + β -glucosidasa (BGL: 0,05 mg/ml)
- 8.) Worthington (0,25 mg/ml)

Para reacciones llevadas a cabo con paja y pulpa de remolacha pretratadas, las etapas de hidrólisis primaria o secundaria de xilanasa apropiadas se llevaron a cabo exclusivamente con Xil 1 derivada de *Trichoderma viride*.

Por el contrario, todas las otras etapas de hidrólisis se llevaron a cabo con Xil 2 derivada de la cepa YX de *Thermobifida fusca*.

Tabla 1A: Distribución másica (%) de componentes de sustrato determinada después de la hidrólisis ácida cuantitativa (1-4)

| Sustrato | Glucosa | Arabinosa | Xilosa | Otros componentes | | | | | | |
|----------------------------|-----------|-----------|----------------|-------------------|-----------|-----------|---------------------|---------------|----------|-------------------|
| Xilano de espelta de avena | 15 | 10 | 70 | 5 | | | | | | |
| | Arabinosa | Xilosa | Otros azúcares | | | | | | | |
| Arabinoxilano de centeno | 38 | 59 | 3 | | | | | | | |
| | Extractos | Ceniza | Lignina total | Ácido urónico | Arabinano | Xilano | Manano | Galactano | Celulosa | Otros componentes |
| Paja sin tratar | 12,95 | 10,22 | 16,85 | 2,24 | 2,35 | 19,22 | 0,31 | 0,75 | 32,64 | 2,47 |
| | Glucosa | Galactosa | Manosa | Ramnosa | Xilosa | Arabinosa | Ácido galacturónico | Ácido acético | Lignina | Otros componentes |
| Pulpa de remolacha | 25 | 7 | 1 | 3 | 2 | 25 | 23 | 4 | 1,5 | 8,5 |
| | Glucosa | Xilosa | Lignina | Otros componentes | | | | | | |
| Paja pretratada | 70 | 3 | 21 | 6 | | | | | | |

Tabla 2A: Etapas de hidrólisis secuenciales llevadas a cabo con diversos sustratos

| Paja sin tratar | | distribución relativa de analito (%) | | | | | |
|------------------------------------|-----------|--------------------------------------|-----------|-----------|---------------|----------------|--|
| Conjunto experimental | Glucosa | Xilosa | Arabinosa | Galactosa | Oligosacárido | Ácido urónico | |
| 1.1.1 Ara+Arafus | 0,766 | 1,278 | 93,888 | 0,000 | 1,066 | 3,002 | |
| 1.1.2 CBH I+EG II+BGL | 95,031 | 1,589 | 0,067 | 1,064 | 0,294 | 1,954 | |
| 1.2.1 CBH I+EG II+BGL | 74,930 | 14,601 | 10,507 | 0,469 | 0,047 | 0,063 | |
| 1.2.2 Ara+Arafus | 8,213 | 4,710 | 85,583 | 0,000 | 1,095 | 0,399 | |
| Control positivo | 83,855 | 12,193 | 0,118 | 1,044 | 1,588 | 1,201 | |
| Arabinoxilano de centeno | | distribución relativa de analito (%) | | | | | |
| Conjunto experimental | Glucosa | Xilosa | Arabinosa | Galactosa | Oligosacárido | Ácido urónico | |
| 2.1.1 Ara+Arafus | 0,000 | 20,476 | 79,524 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | |
| 2.1.2 Xil 2 | 0,000 | 92,973 | 2,341 | 0,000 | 0,403 | 4,279 | |
| 2.2.1 Xil 2 | 1,670 | 70,141 | 26,330 | 0,609 | 1,189 | 0,053 | |
| 2.2.2 Ara+Arafus | 0,000 | 20,476 | 79,524 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | |
| Control positivo | 0,000 | 54,305 | 30,022 | 0,000 | 0,414 | 15,259 | |
| Muestras de remolacha | | distribución relativa de analito (%) | | | | | |
| Conjunto experimental | Arabinosa | Galactosa | Glucosa | Xilosa | Manosa | Oligosacáridos | |
| 3.1.1 Ara+Arafus | 76,956 | 1,000 | 1,044 | 0,000 | 0,000 | 19,660 | |
| 3.1.2 CBH I+EG II+BGL | 1,604 | 1,354 | 83,458 | 3,772 | 8,050 | 0,517 | |
| 3.2.1 Ara+Arafus | 76,956 | 1,000 | 1,044 | 0,000 | 0,000 | 19,640 | |
| 3.2.2 Mezcla de Worth Cel. | 1,725 | 0,967 | 89,233 | 3,783 | 2,977 | 0,357 | |
| 3.3.1 CBH I+EG II+BGL | 3,886 | 2,094 | 61,191 | 32,108 | 0,406 | 0,006 | |
| 3.3.2 Ara+Arafus | 61,827 | 0,000 | 34,127 | 1,457 | 0,000 | 0,135 | |
| Control positivo | 2,347 | 0,000 | 85,252 | 4,229 | 0,160 | 1,310 | |
| Muestras de paja pretratada | | distribución relativa de analito (%) | | | | | |
| Conjunto experimental | Arabinosa | Galactosa | Glucosa | Xilosa | Manosa | Oligosacáridos | |
| 4.1.1 Xil 1 | 0,735 | 1,907 | 6,842 | 87,328 | 0,000 | 3,120 | |
| 4.1.2 CBH I+EG II+BGL | 0,000 | 0,364 | 95,398 | 3,076 | 0,439 | 0,721 | |
| 4.2.1 Xil 1 | 0,735 | 1,907 | 6,842 | 87,328 | 0,000 | 3,150 | |
| 4.2.2 Pectinasa | 0,000 | 1,700 | 93,490 | 1,991 | 2,508 | 0,310 | |
| 4.3.1 Xil 1 | 0,735 | 1,907 | 6,842 | 87,328 | 0,000 | 3,110 | |
| 4.3.2 Ara+Arafus | 0,000 | 0,000 | 94,849 | 5,153 | 0,000 | 0,000 | |
| 4.4.1 CBH I+EG II+BGL | 0,500 | 0,435 | 74,398 | 16,676 | 1,339 | 6,042 | |
| 4.2.1 Xil 1 | 0,040 | 0,364 | 22,398 | 73,076 | 0,439 | 3,721 | |
| Control positivo | 0,000 | 0,000 | 89,136 | 3,684 | 0,000 | 5,452 | |

Como control positivo: se usó Worthington (Worth. Cel.).

5

Comparando los datos en la Tabla 2A es evidente que eligiendo la combinación adecuada de etapas enzimáticas pueden obtenerse corrientes de producto de azúcar puras en más del 80 % (peso/peso) a partir de la hidrólisis de sustratos lignocelulósicos.

10 También es evidente que la secuencia de actividades enzimáticas aplicada a un sustrato de hidrólisis específico tiene una profunda influencia en la composición y pureza de las corrientes de producto resultantes.

En otro conjunto de experimentos se investigó la influencia de la presencia de lignina en la materia prima sobre las etapas de tratamiento enzimático:

15

Hidrólisis enzimática selectiva en ausencia/ presencia de lignina de hidrólisis:

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 0,5 ml con un sistema de tampón acetato sódico (50 mM, pH 5) en tubos Eppendorf de 1 ml. Las suspensiones que contenían 2,5 % (peso/volumen) de paja de trigo sin tratar (25 mg/ml) o arabinoxilano de centeno (0,25 mg/ml) se hidrolizaron con 1 % (peso/peso de sustrato= 0,25 mg/ml) de tanto endo-arabinasa (Ara), endo-poligalacturonasa (Poli) como endo-xilanasa (Xil 2). Cada reacción se llevó a cabo tanto en ausencia como en presencia de 2,5 % (25 mg/ml) de lignina de hidrólisis adicional. Por tanto, la relación de sustrato con respecto a lignina en las reacciones respectivas fue 1:1. Todas las reacciones se incubaron durante 48 h a 45 °C (250 rpm) en una mezcladora giratoria Eppendorf. Después del periodo de incubación, las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 15 min. El sobrenadante resultante se sacó por pipeteado para determinar su composición de azúcar y ácido urónico usando la metodología de HPAE-PAD (6). Los resultados mostrados en la Tabla 3 solo se concentran en cambios en los patrones de hidrólisis de los principales componentes de azúcar monoméricos.

Tabla 3: Hidrólisis selectiva de arabinoxilano y paja sin tratar en ausencia/presencia de lignina adicional.

a.) Resultados obtenidos para arabinoxilano

| Conjunto experimental | distribución rel. (%) | | |
|-----------------------|-----------------------|--------|-----------|
| | Glucosa | Xilosa | Arabinosa |
| Xil 2+Lignina | 0,12 | 95,83 | 4,27 |
| Xil 2-Lignina | 0,28 | 78,09 | 21,65 |

b.) Resultados obtenidos para paja sin tratar

| Conjunto experimental | distribución rel. (%) | | |
|-----------------------|-----------------------|--------|-----------|
| | Glucosa | Xilosa | Arabinosa |
| Xil 2 +Lignina | 0,19 | 97,50 | 2,16 |
| Xil 2 -Lignina | 4,31 | 84,50 | 12,10 |

15

Los presentes inventores han elegido arabinoxilano de centeno (contenido de lignina endógena < 0,2 % en peso/peso) y paja de trigo sin tratar (contenido de lignina endógena ~ 17 % en peso/peso) como sustratos de hidrólisis para estudiar los efectos de la adición de lignina exógena, ya que estos sustratos se diferencian significativamente en su contenido de lignina endógena.

20

En presencia de lignina exógena, la hidrólisis de arabinoxilano y trigo sin tratar por endo-xilanasa 2 (Xil 2) produjo un aumento de la selectividad de producto significativa. Para ambos sustratos, la actividad del lado de la endo-arabinasa de Xil 2 se redujo en presencia de lignina.

25 Citaciones:

1.) <http://www.eere.energy.gov/biomass/progs/search2.cgi?4669>

2.) Michel, F. y col. (2006), J. of the Science of Food and Agriculture 42 (1), pág. 77-85

30

3.)

<http://secure.megazyme.com/Dynamic.aspx?control=CSViewProduct&categoryName=Polysaccharides&productId=P-RAXY>

35 4.) www.sigma.com

5.) <http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42618.pdf>

6.) <http://www.dionex.com.cn/technic/Afiles/AN92.PDF>

40

Bibliografía

Hamsen, G. y col. (1989) Process for the treatment of biomass with steam, product thereby obtained and its use and reactor. EP 0187422A2

45

Chen, W.P., Matsuo, M., Yasui, T. (1986) Agric. Biol. Chem., 50, pág. 1183-1194

Arias, M.E., Arenas, M., Rodriguez, J., Solviveri, J., Ball, A.S., Hernandez, M. (2003) Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a non-phenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. Appl. Envir. Microbiol. 69, pág. 1953-1958

50

D'Acunzo, F. Galli, C., Masci, B. (2002) Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems. Solubility and steric issues. Eur. J. Biochem. 269, pág. 5330-5335

55 Barr, D., Sha, M. M., Aust, S.D. (1993) Veratryl alcohol-dependent production of molecular oxygen by Lignin peroxidase. J. Biol. Chem. 268, pág. 241-244

- Currie, H.A., Perry, C.C. (2006) Resolution of complex monosaccharide mixtures from plant cell wall isolates by high pH anion exchange chromatography. *J. Chromatography*. 1128 (1-2), pág. 90-96
- 5 Demirbas, A. (1998) Aqueous glycerol delignification of wood chips and ground wood. *Bioresource Technol.* 63 (2), pág. 179-185
- Irwin, D.C., Spezio, M., Walker, L.P., Wilson, D.B. (1993) *Biotech. Bioengineer.* 42, pág. 1002-1013.
- 10 Itoh, H., Wada, M., Honda, Y., Kuwahara, M., Watanabe, T. (2003) Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. *J. Biotechnol.* 103, pág. 273-280
- Igarashi, K., Samejima, M., Eriksson, K.-L. (1998) Cellobiose dehydrogenase enhances *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase I activity by relieving product inhibition. *Eur. J. Biochem.* 253, pág. 101-106
- 15 Ferapontova, E.E., Castillo, J., Gorton, L. (2006) Bioelectrocatalytic properties of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in reactions with phenols, catechols and lignin-model compounds. *Biochem. Biophys. Acta* 1760 (9), pág. 1343-54
- 20 Foody, B. y col. (1998) Pretreatment process for the conversion of cellulose to fuel ethanol. US 6.090.595
- Kamm, B., Gruber, P.R., Kamm, M. (2006) Industrial processes and products Status quo and future direction. *Biorefineries* 1, pág. 1-39
- 25 Kamitsuiji, H., Watanabe, T., Honda, Y., Kuwahara, M. (2005) Direct oxidation of polymeric substrates by multifunctional manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus* without redox mediators. *Biochem. J.* 386, pág. 387-393.
- Kaschemekat, J. Klose, M. (1985) Trennung der Komponenten eines Flüssigkeitsgemisches. DE 3410155C1
- 30 Kersten, P. J. (1990) Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: its characterization and activation by Ligninperoxidase *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, pág. 2936-2940
- Kim, E., Irwin, D.C., Walker, L.O., Wilson, D.B. (1998) Factorial optimisation of a six-cellulase mixture. *Biotech. Bioengineer.* 58(5), pág. 494-501
- 35 Kinley, M.T, Krohn, B. Biomass conversion to alcohol using ultrasonic energy. US 200570136520A1
- Lawford, H.G., Rousseau, J.D. (2003) Cellulosic fuel ethanol. *Appl. Biochem and Biotechnol.* 105, pág. 457-469
- 40 Lawford, H.G., Rousseau, J.D. (2003) Cellulosic fuel ethanol. Alternative fermentation process designs with wild-type and recombinant *Zymomonas mobilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 105, pág. 457-469
- Lynd, L.R., van Zyl, W.H.v., McBride, J.E., Laser, M. (2005) Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, pág. 577-583
- 45 Mammela, P. (2001) Phenolics in selected European hardwood species by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst* 126(9), pág. 1535-1538
- Palla, G. (1981) C18 reversed-phase liquid chromatography determination of invert sugar, sucrose and raffinose. *Anal. Chem.* 53, pág. 1966-1967
- 50 Puls, J., Poutanen, K., Kömer, H.-U., Viikari, L. (1985) Biotechnological utilization of wood carbohydrates after steaming pretreatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, pág. 416-423
- 55 Ramos, L.P., Silva, T.A., Martins, L.F., Satyanarayana, K.G. (2005) Conversion of lignocellulosics to fuels, chemicals and environmentally-friendly materials. *Metals and Processes* 117, pág. 299-318
- Rosgaard, L., Peterson, S., Cherry, J.R., Harris, P., Meyer, A.S. (2006) Efficiency of new fungal cellulose systems in boosting enzymatic degradation of barley straw lignocellulose. *Biotechnol. Prog.* 22(2), pág. 493-498
- 60 Saha, B.C., Enzymes as biocatalysts for conversion of lignocellulosic biomass to fermentable sugars (2005) in *Handbook of industrial biocatalysis*, ed. Ching T. Hou, CRC Press, Chapter 24, pág. 1-12
- Smirnov, S.A., Korovela, O.V., Gavrilova, V.P., Belova, A.B., Klyachko, N.L. (2001) Laccases for basidiomycetes: Physicochemical characteristics and substrate specificity towards methoxyphenolic compounds. *Biochem.(Moscow)* 66(7), pág. 774-779
- 65

Sorensen, H., Pederson, S., Viksoe-Nielsen, A. *et al.* (2006) Hydrolysis of arabinoxylan. WO 2006114095A1

Taylor, E. Smith, N., Turkenburg, J. y col. (2006) Structural insights into the ligand specificity of a thermostable family 51 arabinofuranosidase, Araf51, from *Clostridium thermocellum*. *Biochem. J.* 395, pág. 31-37

5

Ward, G., Hadar, Y., Bilkis, I., Dosoretz, C. (2003) Mechanistic features of lignin peroxidase-catalysed oxidation of substituted phenols and 1,2-dimethoxyarenes. *J. Biol. Chem.* 278, pág. 39726-39734

10 Wariishi, H., Gold, M.H. (1990) Lignin Peroxidase Compound III. Mechanism of formation and decomposition. *J. Biol. Chem.* 265, pág. 2070-2077

Wood, T.M. and Baht, K.M., Methods for measuring cellulose activities. *Methods in Enzymology.* 160, pág. 87-112

Tabla 1 Sistemas de enzimas

15

| Producto | Sustrato polimérico | Actividad enzimática | Números de mezclas de enzimas |
|---|--|-------------------------------|-------------------------------|
| 1-Aciliglicerofosfocolina | Fosfatidilcolina | Fosfolipasa | 1 |
| 1,5-Anhidro-D-fructosa + D-glucosa | Alfa-glucano | Exo-alfa-1,4-D-glucano liasa | 1 |
| Alcohol + acetato | Xiloglucano | Acetilesterasa | 1 |
| | Ramnogalacturonano | | |
| Aminoácidos | Proteínas | Proteasa | 1 |
| Arabinosa | Arabinano | Arabinofuranosidasa | 2,5 |
| | Arabinoxilano | Endo-alfa-1,3-L-arabinanasa | 1,3,4 |
| | Xiloglucano | Endo-alfa-1,5-L-arabinanasa | 1 |
| | | Exo-alfa-1,3-L-arabinanasa | 1,2,3 |
| | | Exo-alfa-1,5-L-arabinanasa | 1,2,5 |
| Colina | Ésteres acéticos | Acetilcolinesterasa | 1,2 |
| | Ésteres de colina | Colinesterasa | 1,3 |
| D-Xilonato | Xilono-1,4-lactona | Xilono-1,4-lactonasa | 1 |
| Diacilglicerol | Éster de triglicéridos | Triacilglicerol lipasa | 1 |
| Fucosa | Xiloglucano | Endo-alfa-1,2-L-fucosidasa | 1,2 |
| | | Exo-alfa-1,2-L-fucosidasa | 1,2,3,4 |
| | Pectina | Pectinasa | 1,3 |
| Galactosa | Galactano | Endo-beta-1,4-D-galactosidasa | 1 |
| | Galactomanano | Exo-beta-1,4-D-galactosidasa | 1,2 |
| | Xiloglucano | | |
| Galato | Digalato | Acilglicerol lipasa | 1,3 |
| | Monoésteres de glicerol de ácidos grasos de cadena larga | Tanasa | 1,2 |
| Glucosa | Celulosa | Celulasa | 1,2,3,4,5,6,7,8 |
| | Glucomanano | Alfa-amilasa | 1,2,3,4,6 |
| | Glucoronoxilano | Beta-amilasa | 1,2,3,5,6 |
| | Xiloglucano | Beta-glucosidasa | 1,2,3,4,6 |
| | | Celobiohidrolasa I | 1,3,4,6,7 |
| | | Celobiohidrolasa II | 2,3,4,6,8 |
| | | Endo-beta-1-4-D-glucanasa | 1,2,3,4,5,6 |
| | | Endoglucanasa I | 1,2,4,6 |
| | | Endoglucanasa II | 1,2,4,5,6 |
| | | Endoglucanasa III | 1,2,3,5,6 |
| | | Endoglucanasa IV | 1,2,3,5,6 |
| | | Endoglucanasa V | 1,3,4,6 |
| | | Endoglucanasa VI | 1,3,4,6 |
| | | Endoglucanasa VII | 1,3,4,6 |
| | | Exo-beta-1,4-D-glucanasa | 1,2,3,4,5,6,7,8 |
| | | Glucohidrolasa | 1,2,3,4,6 |
| Glucosa | Almidón | Alfa-amilasas | 1,2 |
| | | Beta-amilasas | 1,3 |
| Glicerofosfocolina | 2-Lisofosfatidilcolina | Lisofosfolipasa | 1 |
| L-Arabinonato | L-Arabinono-1,4-lactona | L-Arabinonolactonasa | 1 |
| Alcohol de cadena larga | Éster de cera | Éster de cera hidrolasa | 1 |

| Producto | Sustrato polimérico | Actividad enzimática | Números de mezclas de enzimas |
|---|---|---|-------------------------------|
| Ácido graso de cadena larga | Éster etílico de acilo graso de cadena larga | Éster etílico de acilo graso sintasa | 1 |
| Manosa | Galactomanano Manano | Beta-1,4-D-manosidasa | 2 |
| | | Endo-beta-1,4-D-mananasa | 1 |
| | | Exo-beta-1,4-D-mananasa | 1,2,3 |
| Metanol + pectato | Pectina | Pectina esterasa | 1,2,3 |
| | | Pectina demetoxilasa | 1 |
| | | Pectina metoxilasa | 1,2 |
| Oligolignano, monolignol, compuestos fenólicos, oligofenilpropanoides | Lignina | Lacasa (TEMPO) | 1,2,6 |
| | | Lignina peroxidasa (alcohol veratrílico) + glioxal oxidasa (aldehídos primarios o metilglioxal) | 1,3,4 |
| | | Peroxidasa de manganeso (ácidos orgánicos de Mn ²⁺) | 1,2,3,5 |
| Oligopéptidos | Proteínas | Amino-peptidasa | 1,2,8 |
| | | Carboxi-peptidasa | 1,3,8 |
| | | Carboxil-proteinasa | 1,4 |
| | | Endo-peptidasa | 1,4,5,6,7 |
| | | Exo-peptidasa | 1,2,3,8 |
| | | Metalo-proteinasa | 1,5 |
| | | Serin-proteinasa | 1,6 |
| Tiol-proteinasa | 1,7 | | |
| Oligosacáridos con grupos 4-desoxi-alfa-D-galact-4-enuronosilo terminales | Alfa-1,4-D-galacturonano | Pectato liasa (ácido alfa-1,4-D-endo oligalacturónico liasa) | 1 |
| Fitol | Clorofila | Clorofilasa | 1 |
| Ribonucleótidos | ARN | Endoribonucleasa | 1,2,3 |
| | | Exoribonucleasa | 1,2,4,5 |
| | | Ribonucleasa | 1,3,4,5 |
| Esterol | Éster de esterilo | Esterol esterasa | 1,2 |
| | | Triterpenol esterasa | 1,3 |
| Ácidos urónicos | Pectina | Poligalacturinasas | 1 |
| | | Pectina liasa | 1,2 |
| Xilosa | Arabinoxilano Glucoronoxilano Xilano Xiloglucano | Endo-beta-1,3-D-xilanasa | 1,3,6 |
| | | Endo-alfa-1,6-D-xilosidasa | 1,2 |
| | | Endo-beta-1,4-D-xilanasa | 1,2,3 |
| | | Exo-alfa-1,6-D-xilanasa | 1,2,7 |
| | | Exo-beta-1,3-D-xilanasa | 1,3,5,6 |
| | | Exo-beta-1,4-D-xilanasa | 1,2,3,4 |
| Xilosidasa | 1,2,3 | | |
| Combinaciones de enzimas a modo de ejemplo para la generación de un producto específico obtenido de un constituyente de materia prima polimérica específico se denotan individualmente por números que oscilan de 1 a 8. | | | |

Tabla 2

| Sustrato | Número de cat. de Sigma | Enzima | Producto |
|---------------------------------------|-------------------------|--|----------------|
| Celulosa | C6288 | Endo-celulasa, exo-celulasa, β-glucosidasa | Glucosa |
| Celodextrinas | C4642 | Endo-celulasa, exo-celulasa, β-glucosidasa | Glucosa |
| Oligosacáridos de β-metilumbeliferilo | M6018 | Endo-celulasa, exo-celulasa, β-glucosidasa | Glucosa |
| Oligosacáridos de p-nitrofenol | N0145 | Endo-celulasa, exo-celulasa, β-glucosidasa | Glucosa |
| CMC | C9481 | Endocelulasa | Oligosacáridos |
| Avicel PH-101 | 11365 | Exocelulasa | Glucosa |

ES 2 459 291 T3

| | | | |
|--|--------|----------------------------|--|
| 4-Nitrofenil-β-D-celobiósido | N5759 | Glucosa | Glucosa y pNP |
| Xilano | X4252 | Xilanasa, xilanosidasa | Xilosa |
| 4-Nitrofenil-β-D-xilopiranosido | N2132 | Celulasa | Xilosa y pNP |
| Manano de levadura | M7504 | Mananasa | Mananósido y manosa |
| D-Galacto-D-manano de <i>Ceratonía siliqua</i> | 48230 | Galactasa y mananasa | Galactosa y manosa |
| 4-Nitrofenil-α-L-arabinofuranósido | N3641 | Arabinofucosidasa | Arabinosa y pNP |
| Alcohol 2,3-dimetoxibencílico (alcohol veratrílico) | 38700 | Lignina peroxidasa (LIP) | Catión de radical de alcohol veratrílico |
| Lignina, hidrolítica | 371076 | Lignina peroxidasa (LIP) | Fenilpropanoides |
| Lignina, organosolvente | 371017 | Lignina peroxidasa (LIP) | Fenilpropanoides |
| Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) | A1227 | Lignina peroxidasa (LIP) | Cationes de radicales de ABTS |
| Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) | A1227 | Lacasa | Cationes de radicales de ABTS |
| Cloruro de manganeso (MnCl ₂) | 416479 | Manganeso peroxidasa (MnP) | Ión Mn ³⁺ |

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el tratamiento enzimático de materia prima polimérica en bruto que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) tratar la materia prima polimérica en bruto insoluble con un sistema de enzimas con el fin de liberar un bloque de construcción monomérico u oligomérico soluble definido de la materia prima polimérica en bruto;
- b) separar el bloque de construcción monomérico u oligomérico soluble definido producido en la etapa a) del resto
10 de la materia prima polimérica en bruto insoluble,
- en el que las etapas a) y b) se repiten una o más veces con diferentes sistemas de enzimas con el fin de liberar del resto de la materia prima polimérica en bruto (materia prima polimérica procesada) otros bloques de construcción monoméricos u oligoméricos solubles definidos, y en el que un bloque de construcción monomérico u oligomérico
15 definido según la etapa a) es arabinosa,
- en el que el sistema de enzimas que da la mayor pureza de un bloque de construcción monomérico y oligomérico definido después del tratamiento de la materia prima polimérica en bruto y separación de la materia prima monomérica y oligomérica definida de la materia prima polimérica procesada se elige para el primer tratamiento
20 enzimático según la etapa a),
- en el que el segundo sistema de enzimas según la etapa a) es el que da la mayor pureza del bloque de construcción monomérico y oligomérico definido después del tratamiento de la materia prima polimérica procesada, que se obtiene por el primer tratamiento enzimático según la etapa a) y separación de la materia prima monomérica y
25 oligomérica definida de la materia prima polimérica en bruto, con el sistema de enzimas y separación de la materia prima monomérica y oligomérica definida de la materia prima polimérica procesada,
- y en el que cualquier etapa de tratamiento enzimático posterior se realiza con el fin de disminuir la pureza de los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos definidos después del tratamiento de la materia primera
30 procesada obtenida de la etapa de tratamiento enzimático previa con el sistema de enzimas respectivo y separación de los bloques de construcción monoméricos y oligoméricos definidos de las materias primas poliméricas procesadas,
- y en el que el sistema de enzimas para liberar arabinosa contiene no más del 50 % de otras actividades enzimáticas,
35 aparte de la actividad enzimática que produce la liberación de arabinosa de la materia prima polimérica en bruto o procesada según la etapa a).
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la materia prima polimérica en bruto comprende al menos el 3 % en peso de lignina, preferentemente el 10 % en peso de lignina, más preferentemente al menos el 20
40 % en peso de lignina.
3. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el contenido de lignina en la materia prima polimérica, calculado como % en peso de la composición global de la materia prima polimérica, no se reduce durante las etapas a) y b) o su repetición.
45
4. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que antes de la etapa a) los componentes solubles se separan de la materia prima polimérica en bruto.
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sistema de
50 enzimas usado en la etapa a) contiene preferentemente no más del 10 %, más preferentemente no más del 5 %, más preferentemente no más del 2 %, más preferentemente no más del 1 % de otras actividades enzimáticas, aparte de la actividad enzimática que produce la liberación de dichos bloques de construcción monoméricos u oligoméricos solubles definidos de la materia prima polimérica en bruto insoluble según la etapa a).
6. El procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que antes de la repetición de la etapa a) la separación de componentes solubles de la materia prima polimérica procesada se realiza usando una o más etapas de pretratamiento, preferentemente una o más etapas de lavado.
55
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sistema de
60 enzimas usado en una etapa de tratamiento enzimático particular contiene no más del 10 %, más preferentemente no más del 5 %, más preferentemente no más del 2 %, más preferentemente no más del 1 % de actividades enzimáticas contaminantes, que no se han empleado en una etapa de tratamiento enzimático previa usando un sistema de enzimas diferente o que puede producir liberación de otros bloques de construcción monoméricos u oligoméricos definidos, que no se han liberado en etapas de tratamiento enzimático previas, o que pueden solo
65 producir la liberación de productos de sustratos poliméricos que están inicialmente esencialmente ausentes de la materia prima polimérica.

8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la materia prima polimérica en bruto comprende celulosa y hemicelulosa como sustratos poliméricos y el sistema de enzimas usado en una etapa de tratamiento enzimático particular tiene actividad de celulasa, y opcionalmente actividad de beta-glucosidasa, glucohidrolasa y/o alfa- o beta-amilasa, pero está esencialmente libre de actividad de hemicelulosa.
- 5 9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sistema de enzimas usado en una etapa de tratamiento enzimático particular contiene como actividades enzimáticas contaminantes una o más de tales actividades enzimáticas, que se han empleado en una etapa de tratamiento enzimático previa usando un sistema de enzimas diferente o que pueden solo producir la liberación de otros bloques
- 10 de construcción monoméricos u oligoméricos de sustratos poliméricos que están inicialmente esencialmente ausentes en la materia prima polimérica en bruto; o
- en el que el sistema de enzimas usado en una etapa de tratamiento enzimático particular tiene una primera actividad enzimática y contiene al menos una actividad enzimática adicional, que conduce al mismo (a los mismos) bloque(s)
- 15 de construcción monomérico(s) u oligomérico(s) definido(s) de la materia prima polimérica en bruto o procesada como la primera actividad enzimática del sistema de enzimas, en particular de un sustrato polimérico diferente presente en la materia prima polimérica en bruto.
10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la materia prima
- 20 polimérica en bruto insoluble o procesada se somete a una etapa de tratamiento fisicoquímico selectiva o no selectiva antes de la etapa a) o antes de la repetición de la etapa a) según la reivindicación 1.
11. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que la etapa de tratamiento fisicoquímico comprende un tratamiento con disolventes acuosos, disolventes orgánicos, o cualquier combinación o mezclas de
- 25 estos preferentemente con etanol o glicerol.
12. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que, con el fin de determinar los sistemas de enzimas que van a usarse y su secuencia, la materia prima polimérica en bruto insoluble
- 30 a. se trata primero en tratamientos enzimáticos separados con cada uno de una pluralidad de sistemas de enzimas (mezclas) tal como se enumeran en la Tabla 1;
- b. para cada tratamiento enzimático los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos definidos liberados de la materia prima polimérica en bruto se analizan para pureza de los bloques de construcción monoméricos u
- 35 oligoméricos definidos después de la separación de los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos definidos de la materia prima polimérica en bruto;
- c. el sistema de enzimas que da la mayor pureza se elige para la primera etapa de tratamiento enzimático según la etapa a) de la reivindicación 1;
- 40 d. la secuencia de etapas a) a c) se repite con el resto de la materia prima polimérica en bruto o procesada con el fin de determinar el sistema de enzimas que va a usarse en la posterior etapa de tratamiento enzimático.
13. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que, con el fin de determinar los sistemas de enzimas
- 45 que van a usarse y su secuencia, la materia prima polimérica en bruto insoluble
- a. se trata primero en tratamientos enzimáticos separados con cada uno de una pluralidad de sistemas de enzimas (mezclas) tal como se enumeran en la Tabla 1 para determinar los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos que contribuyen a la mayor relación másica en la materia prima polimérica en bruto;
- 50 b. los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos definidos que contribuyen a la mayor relación másica en la materia prima polimérica en bruto se analizan para pureza después de la separación de la materia prima polimérica en bruto;
- 55 c. si la pureza como se determina es de forma que más del 75 % en peso, preferentemente más del 90 % en peso, más preferentemente más del 95 % en peso, más preferentemente más del 99 % en peso, del contenido de sólido total consista en los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos definidos, el sistema de enzimas respectivo se elige para la primera etapa de tratamiento enzimático según la etapa a) de la reivindicación 1;
- 60 d. si la pureza determinada según la etapa b) es menos de la requerida según la etapa c), los bloques de construcción monoméricos u oligoméricos definidos que contribuyen a la siguiente mayor relación másica en la materia prima polimérica en bruto se analizan para pureza después de la separación de la materia prima polimérica en bruto en consecuencia, hasta que una pureza satisface el requisito según la etapa c) y el sistema de enzimas respectivo se elige para la primera etapa de tratamiento enzimático según la etapa a) de la reivindicación 1;
- 65 e. opcionalmente, la secuencia de etapas a) a d) se repite con el resto de la materia prima polimérica en bruto o

procesada con el fin de determinar el sistema de enzimas que va a usarse en la posterior etapa de tratamiento enzimático.

14. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que, con el fin de determinar los sistemas de enzimas que van a usarse y su secuencia, la materia prima polimérica en bruto

10 a. se trata primero en tratamientos enzimáticos separados con cada uno de una pluralidad de sistemas de enzimas (mezclas) tal como se enumeran en la Tabla 1 para determinar el tratamiento enzimático que conduce al mayor rendimiento de bloques de construcción monoméricos u oligoméricos contenidos en la materia prima polimérica en bruto;

15 b. seleccionar aquellos tratamientos enzimáticos que dan un producto monomérico u oligomérico definido con una pureza de más del 75 % en peso, preferentemente más del 90 % en peso, más preferentemente más del 95 % en peso, más preferentemente más del 99 % en peso de los sólidos totales;

15 c. determinar entre los restantes tratamientos enzimáticos el tratamiento con el mayor rendimiento de producto monomérico u oligomérico;

20 d. opcionalmente, la secuencia de etapas a) a c) se repite con el resto de la materia prima polimérica en bruto o procesada con el fin de determinar el sistema de enzimas que va a usarse en la posterior etapa de tratamiento enzimático.

FIG. 1

