

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 662**

51 Int. Cl.:

D01C 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2009 E 09838038 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2387628**

54 Título: **Preparación enzimática de fibras vegetales**

30 Prioridad:

13.01.2009 US 193967 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2015

73 Titular/es:

**NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA
(100.0%)
1200 Montreal Road
Ottawa, Ontario K1A 0R6, CA**

72 Inventor/es:

**SUNG, WING L.;
WOOD, MARK y
HUANG, FANG**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 539 662 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

Preparación enzimática de fibras vegetales

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a procesos para preparar fibras vegetales.

10 **Antecedentes de la invención**

10 Históricamente, las fibras de cáñamo se han usado en la industria textil. Sin embargo, los recientes avances en los materiales compuestos permitieron que fibras renovables, por ejemplo, las de cáñamo, sustituyeran a las fibras de vidrio como refuerzos en materiales compuestos. Por tanto, el desarrollo de procedimientos para extraer fibras de cáñamo sin dañar su integridad facilitará su uso tanto en la industria textil como en biomaterial compuesto. Tal procedimiento sería preferentemente eficiente desde el punto de vista energético y evitaría el uso de agentes peligrosos y/o no biodegradables.

20 En el tallo de las plantas de fibra, tales como cáñamo, lino y yute, una capa similar a corteza que contiene fibras de líber rodea un núcleo leñoso o la madera del tronco. El descortezado, tanto manualmente como mecánicamente, es un proceso que puede dividir el tallo del cáñamo en una fracción de "corteza" de cáñamo y "madera de tallo" del cáñamo. La fracción de "madera del tallo" puede utilizarse para la fabricación de pasta química (Kortekaas 1998). La "corteza" se usa para describir todos los tejidos externos del tallo, que incluyen las fibras de líber. Las fibras de líber o haces de fibras están rodeadas por pectina u otros materiales engomados.

25 Las fibras vegetales están compuestas de polisacáridos, principalmente celulosa. Esto es diferente de las fibras animales, tales como sedas de gusanos de seda y arañas, lana de ovejas u otro ganado peludo, que están constituidas de proteína.

30 Se requiere el aislamiento de fibra vegetal de la corteza descortezada antes de cualquier aplicación industrial. La extracción implica principalmente el desengomado, una eliminación de pectina de la fibra. La pectina es un polisacárido que es un polímero de ácido galacturónico. La pectina no es soluble en agua o ácido. Sin embargo, puede eliminarse por disoluciones alcalinas fuertes como sosa cáustica (hidróxido sódico concentrado).

35 Métodos generales para el aislamiento de fibras limpias incluyen enriado al rocío, enriado al agua y procesos químicos y enzimáticos, con diversas modificaciones. Implica soltar o eliminar el pegamento que mantiene juntas las fibras. Los métodos tradicionales son enriado al agua o al rocío. En el enriado al rocío, las cañas se dejan yacer en el campo después de cortarlas. En algunas zonas del mundo, el cáñamo se enría al agua colocando haces de cañas en charcos o corrientes. Estos dos métodos de enriado (enriado limitado) dependen de la digestión de pectina por enzimas secretadas por microbios naturales. El proceso de enriado al agua tiene la desventaja de contaminar los canales o corrientes. El enriado al rocío requiere dos a seis semanas o más para completarse, y está muy afectado por el tiempo sin garantía de condiciones favorables.

45 El enriado con enzima implica la acción de la enzima pectinasa con o sin otras enzimas, como xilanasas y/o celulasa. Sin embargo, la aplicación práctica de tales enzimas para el aislamiento de fibra de cáñamo sigue estando en fase experimental.

50 Hoy en día, el procedimiento industrial común es el enriado químico que implica productos químicos peligrosos agresivos como ceniza de sosa, sosa cáustica y ácido oxálico, frecuentemente a temperatura alta de 160 °C a varias presiones atmosféricas.

55 Se conocen en la técnica diversos procesos de enriado. Clarke et al. (Clarke 2002) describen un proceso de eliminación de pectina o materiales engomados de piel de líber descortezada para dar fibras individuales colocando la piel de líber (con o sin remojo en una disolución de enzima en un proceso de pretratamiento) en un recipiente impermeable al gas cerrado tal como una bolsa de plástico. Los microbios productores de enzima naturales para la piel de líber se desarrollarán sobre los nutrientes iniciales liberados por el pretratamiento con enzima y acabarán el proceso de enriado en este entorno cerrado. Clarke también describe un proceso de pretratamiento alternativo que implica productos químicos en lugar de enzimas, y esto incluye sosa cáustica, ceniza de sosa, silicato de sodio, ácido oxálico y ácido etilendiaminatetraacético (EDTA).

60 Así, existe la necesidad de un proceso más suave y eficaz para aislar fibras de cáñamo que implique agentes respetuosos con el medioambiente y/o biodegradables. También es una cuestión de si la pectina es el único objetivo del desengomado. La eliminación de materias engomadas distintas del objetivo primario, la pectina, puede ofrecer la oportunidad de dar fibras de cáñamo más finas y más suaves.

65 Sung et al. (Sung 2007) enseñaron que el pretratamiento de la piel de líber de cáñamo descortezada con una disolución acuosa que contiene citrato de disodio, citrato de trisodio, o una mezcla de los mismos, que tiene un pH

de aproximadamente 6-13 a temperatura de aproximadamente 90 °C o menos, facilita la posterior extracción de fibra con la enzima pectinasa.

5 El tallo de cáñamo consiste en tanto fibra de líber (corteza) como núcleo leñoso (madera del tallo). Los principales componentes de estas dos partes son celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina (véase la Tabla 1) (García-Jaldón 1998).

Tabla 1

Análisis químico de las partes del cáñamo		
	Fibra de líber (%)	Núcleo leñoso (%)
Celulosa	55	48
Hemicelulosa	16	12
Pectina	18	6
Lignina	4	28
Cera + grasa	1	1
Ceniza	4	2
Proteína	2	3

10 En términos de composición química, las principales diferencias entre la fibra de líber (corteza) y el núcleo leñoso (madera del tallo) son la cantidad de pectina (18 % frente al 6 %) y lignina (4 % y 28 %). La gran cantidad de lignina en la “madera del tallo” da su rigidez. En el caso de la fibra de líber (corteza), la ausencia de lignina se compensa por pectina para pegar juntas la fibra larga individual y los haces de fibra. Por tanto, la mayoría de la investigación en la liberación de la fibra larga de la corteza se ha centrado en la hidrólisis de la pectina, el principal componente engomado, mediante la aplicación de la enzima pectinasa.

15 En comparación, la cantidad de proteína es muy pequeña en la fibra de líber (2 % en fibra de líber, Tabla 1). Sin embargo, parte de esta proteína aparentemente poco importante es proteínas estructurales como “extensina”, responsable de la matriz de proteína que contribuye a la integridad estructural de la propia planta. La aplicación de proteasa a la corteza puede degradar la matriz de proteína, produciendo la liberación de material no de fibra o residuos físicamente o químicamente asociados a la proteína vegetal. Como resultado de tal tratamiento, puede liberarse o separarse fibra.

20 Pokora et al. enseñaron la deslignificación de pulpas de madera mecánicas de refinador para facilitar la producción biológica de pasta, usando proteasa a pH ácido (Pokora 1994). Pokora et al. enseñaron que se usaron proteasas para deslignificar la madera por la proteína de la madera “extensina”. La “extensina” es una proteína reticulada que se sospecha que está unida a la lignina y funciona como un esqueleto de soporte a un nivel celular. Como Pokora et al. se refieren a la eliminación de lignina en pulpas de madera mecánicas, no es relevante para el aislamiento de la fibra larga de la “corteza” que contiene poca lignina (Tabla 1).

30 Dorado et al. han enseñado el uso de proteasa a pH neutro para eliminar lignina específicamente de “madera del tallo” de cáñamo mediante un pretratamiento con proteasa (Dorado 2001). Similarmente, esto no es relevante para la extracción de fibra larga de la corteza.

35 La proteasa se usa comúnmente en la purificación de fibras naturales de orígenes animales, como lana y seda. Estas fibras también son de origen de proteína, por lo tanto fundamentalmente diferentes de las fibras vegetales que son de polisacáridos.

40 También se ha aplicado proteasa en el “biolavado” de fibras de algodón que tienen diversas capas de materiales no celulósicos que incluyen proteína/sustancias nitrogenosas. El algodón, cuando se recoge, es “baga de algodón”, que es una bola esponjosa mullida de fibras individuales ya separadas. La eliminación de materiales no celulósicos de la superficie de fibras de algodón individuales potencia la humectación y facilidad de coloración (Karapinar 2004). Esto no es para la aplicación en la separación o extracción de fibra de corteza o piel de líber de plantas de fibra. La corteza o piel de líber de plantas de fibra tales como corteza de cáñamo o lino es bastante diferente de la baga de algodón. La corteza o piel de líber es una hoja que contiene fibras individuales todas pegadas (o engomadas) juntas en el haz, y a continuación en una hoja. No es visible fibra individual en esta etapa. Aunque la proteína constituye una pequeña parte de las plantas de fibra, proteínas estructurales como “extensina” conectan microfibrillas separadas (fibras finas) para reforzar la arquitectura. Otras proteínas también pueden insertarse para reticular extensina, formando una red entre las fibras.

50 En lugar de la aplicación de una única enzima, la purificación de fibras vegetales puede hacerse con mezclas de enzimas líquidas comerciales producidas directamente mediante el cultivo del hongo *Aspergillus niger*, que incluye Novo SP249 (Akkawi 1990) o Pektopol PT-400 (Pektowin, Polonia) (Sedelnik 2004; Sedelnik 2006). La corteza de fibra descortezada tiene que tratarse con un baño que contiene esta mezcla de enzimas fúngicas durante nada menos que 24 a 36 h. Como era de esperar, estas mezclas de enzimas naturales obtenidas mediante cultivo de *Aspergillus* contienen un amplio espectro de sus enzimas normales, que incluyen poligalacturonasa, pectinasa,

celulasas, beta-glucanasa, hemicelulasas, xilanasas, arabinasa y proteasa en diversas cantidades (Massiot 1989; Steinke 1991).

5 Las mezclas de enzimas comerciales anteriormente mencionadas (Novo SP249 y Pektopol), producidas directamente mediante el cultivo del hongo *Aspergillus*, solo son adecuadas para aplicación a pH ácido con intervalo óptimo de pH de 4-6 (Akkawi 1990; Sedelnik 2006; Steinke 1991). Hacia pH neutro, las enzimas *Aspergillus* pierden actividad rápidamente.

10 En cuanto al efecto de un tiempo de tratamiento largo sobre la fibra vegetal a pH ácido (bajo), Jaskowski (Jaskowski 1984) enseña que las disoluciones de tratamiento ácidas a pH inferior a 4,5 pueden promover la hidrólisis ácida de fibra vegetal, que es principalmente celulosa, y que se produce degradación significativa de fibra de liber descortezada si la fibra sigue en tales disoluciones de tratamiento durante más de 1 h. Como el tratamiento con mezclas de enzimas fúngicas como se ha descrito anteriormente dura 24 h o más, el daño a la integridad de la fibra purificada es motivo de preocupación.

15 **Resumen de la invención**

Ahora se ha encontrado que el tratamiento de piel de liber de planta descortezada de una planta de fibra con una proteasa a pH alcalino, después de haberse pretratado químicamente la piel de liber bajo condiciones suaves, produce extracción eficiente y eficaz de fibras de la piel de liber de planta a pesar del contenido relativamente bajo de proteína de plantas de fibra. Esto permite ventajosamente realizar la etapa de tratamiento enzimática a pH no ácido que reduce el daño producido por la hidrólisis ácida de las fibras vegetales.

25 Así, se proporciona un método de extracción de fibras de piel de liber de planta descortezada que comprende: pretratar piel de liber de planta descortezada de una planta de fibra con una disolución acuosa que contiene citrato de trisodio que tiene un pH en un intervalo de 8-14 a una temperatura de 90 °C o menos; y posteriormente tratar las fibras recuperadas con una proteasa a pH alcalino.

30 En el pretratamiento, una disolución acuosa que contiene citrato de trisodio solo tiene un pH de aproximadamente 9. La concentración de citrato de trisodio está preferentemente en un intervalo de aproximadamente el 0,4 % (peso/volumen) a aproximadamente el 1,6 % (peso/volumen), basado en el volumen total de la disolución acuosa. Si se desea, el pH puede elevarse mediante la adición de una base más fuerte. Preferentemente, la base más fuerte es una disolución acuosa de hidróxido sódico, que tiene preferentemente una concentración en un intervalo de aproximadamente el 0,01 % (peso/volumen) a aproximadamente el 5 % (peso/volumen), más preferentemente aproximadamente el 0,1 % (peso/volumen) a aproximadamente el 0,5 % (peso/volumen), basado en el volumen total de la disolución acuosa. Si se desea, el pH puede reducirse a tan solo 8 mediante la adición de ácido. Preferentemente, el ácido es una disolución acuosa de ácido cítrico, que tiene preferentemente una concentración de aproximadamente el 0,5 % (peso/volumen) basado en el volumen total de la disolución acuosa.

40 En el pretratamiento, la temperatura de la disolución acuosa es 90 °C o menos, preferentemente en un intervalo de 65 °C a 90 °C, por ejemplo, en un intervalo de 65 °C a 85 °C. El pretratamiento se realiza preferentemente durante un tiempo en un intervalo de aproximadamente 0,5-12 horas, por ejemplo, 0,5-5 horas.

45 Si se desea, el pretratamiento de las fibras puede producirse en más de una etapa, una primera etapa en la que las fibras se tratan con citrato de trisodio sin la adición de una base más fuerte, seguido de una o más etapas adicionales en las que las fibras se tratan con citrato de trisodio con la adición de una base más fuerte (por ejemplo, hidróxido sódico, hidróxido potásico, etc.) para ajustar el pH, preferentemente a un pH en un intervalo de 10-14. Las concentraciones de citrato de trisodio y la base más fuerte en las etapas adicionales son como se han descrito anteriormente. Las condiciones de temperatura de las etapas adicionales son como se han descrito anteriormente.

50 La primera etapa se realiza preferentemente durante aproximadamente 0,5-2 horas, más preferentemente 0,5-1 hora, y la segunda etapa preferentemente durante aproximadamente 0,5-4 horas, por ejemplo, 0,5-2 horas. Ventajosamente, la primera etapa aumenta la eficiencia de extracción de las etapas adicionales. Si se desea, las fibras pueden lavarse con agua entre etapas.

55 Para la preparación de fibra antes del tratamiento con enzima, con fibra de lino, es adecuado un pretratamiento de una sola etapa con citrato de trisodio. Con fibra de cáñamo se prefiere un pretratamiento de 2 etapas con citrato de trisodio inicialmente, seguido de hidróxido sódico y citrato de trisodio.

60 El pretratamiento como se ha descrito anteriormente, tanto si se hace en una etapa como más de una etapa, se realiza ventajosamente sin la presencia de enzimas. Como resultado del pretratamiento, el tratamiento enzimático posterior es más eficaz y/o puede realizarse bajo condiciones más suaves. Ventajosamente, el pretratamiento como se describe en el presente documento permite un tratamiento enzimático práctico industrialmente aplicable de fibras de plantas de fibra bajo condiciones suaves respetuosas con el medioambiente.

65 Las fibras vegetales recuperadas del pretratamiento se aclaran preferentemente con agua antes del tratamiento enzimático con proteasa. El tratamiento enzimático de fibras recuperadas emplea una o más proteasas,

preferentemente de fuentes animales o bacterianas. Una fuente de proteasa preferida es microorganismos de *Bacillus*. Preferentemente, la proteasa es subtilisina, termolisina, alcalasa o esperasa, pudiendo funcionar todas óptimamente a pH alcalino. La proteasa puede ser natural o modificada (por ejemplo, mutante o recombinante). Una proteasa particularmente preferida es subtilisina natural o modificada. Preferentemente, la proteasa se usa en una cantidad de al menos 0,24 unidades de enzima por gramo de fibra tratada. Es particularmente adecuada una cantidad en un intervalo de 0,24-24 unidades de enzima por gramo de fibra tratada. Puede usarse satisfactoriamente una cantidad en un intervalo de 0,24-4,8 unidades de enzima por gramo de fibra tratada, o incluso 0,24-2,4 unidades de enzima por gramo de fibra tratada. Una unidad de la proteasa se define como la cantidad de la proteasa que puede hidrolizar caseína para producir el equivalente de color a 1,0 μmol (181 μg) de tirosina por min a pH 7,5 a 37 °C (color por reactivo de Folin-Ciocalteu).

El uso de proteasas permite ventajosamente realizar tratamiento enzimático a un pH alcalino. Preferentemente, el tratamiento enzimático se realiza en un medio acuoso a un pH de 8-12. Más preferentemente, el pH es de 8-10, incluso más preferentemente de 8,0-9,5. Preferentemente, la temperatura a la que se realiza el tratamiento enzimático está en un intervalo de 35 °C a 65 °C, más preferentemente en un intervalo de aproximadamente 40 °C a 65 °C. Preferentemente, el medio acuoso contiene sales y/o tampones, por ejemplo, citrato de trisodio. La concentración de cualquier sal o tampón no debe ser demasiado alta para no afectar excesivamente la actividad de la enzima. Por ejemplo, la concentración de citrato de trisodio puede estar en un intervalo de aproximadamente 3-7 mM, por ejemplo, 5 mM.

Preferentemente, el tratamiento enzimático de las fibras se realiza durante un periodo de tiempo en un intervalo de aproximadamente 0,5-12 horas, por ejemplo, aproximadamente 1-12 horas, más preferentemente aproximadamente 0,5-3 horas, incluso más preferentemente aproximadamente 1-3 horas. Puede hacerse agitación del medio acuoso. Preferentemente, el medio acuoso se agita cada 15 min durante el tratamiento enzimático. Las fibras purificadas después del tratamiento enzimático pueden aclararse con agua.

Ventajosamente, el tratamiento con proteasa permite la hidrólisis de proteínas vegetales, tales como las proteínas estructurales. La degradación proteolítica liberaría adicionalmente residuos físicamente o químicamente asociados a estas proteínas. Sorprendentemente, aunque la proteína constituye una parte muy pequeña de plantas de fibra, la desconstrucción de elementos estructurales basados en proteína en la corteza facilita la liberación de fibras. En una realización particularmente preferida, el tratamiento enzimático con proteasa no incluye tratamiento simultáneo con una o varias de otras enzimas. En una realización tal no se usan mezclas de enzimas, ya que la proteasa se usa sola en forma purificada. La proteasa hidroliza específicamente proteínas sobre o entremedias de las fibras. Las mezclas de enzimas descritas en el estado de la técnica (por ejemplo, Novozyme Pectinase Ultra SP-L™) también contienen otros componentes de enzima como pectinasas, celulasas, xilanasas, glucanasa y hemicelulasas. Estas otras enzimas pueden atacar los componentes fundamentales de la fibra, por ejemplo, celulosa, xilano y hemicelulosa, durante el tratamiento.

Si se desea, las fibras purificadas pueden someterse a un tratamiento posterior con otra enzima, por ejemplo, una pectinasa.

El pretratamiento con citrato de trisodio y/o hidróxido sódico permite ventajosamente recircular las enzimas en la extracción de las fibras. Por ejemplo, las disoluciones de enzima usadas pueden reutilizarse para otros lotes de fibra hasta 4 veces, o incluso más en algunos casos.

Las fibras purificadas del tratamiento con enzima pueden someterse a otros tratamientos, por ejemplo, blanqueo, tinción, etc., para su eventual aplicación.

Plantas de fibra incluyen, por ejemplo, cáñamo y lino.

En una realización particularmente preferida se proporciona un método de extracción de fibras de piel de líber de planta descortezada que comprende: pretratar piel de líber de planta descortezada de una planta de fibra con una disolución acuosa que contiene citrato de trisodio que tiene un pH en un intervalo de 8,5-9,5 a una temperatura de 90 °C o menos durante 30-60 minutos; a continuación tratar las fibras con una disolución de hidróxido sódico a una temperatura de aproximadamente 90 °C o menos durante aproximadamente 30-120 minutos; y, a continuación tratar las fibras con una proteasa a una temperatura en un intervalo de 40-65 °C a un pH en un intervalo de 8-10 durante 0,5-12 horas para eliminar tanto residuos insolubles como materiales solubles de las fibras. Esta realización es particularmente útil para piel de líber de cáñamo descortezada.

En otra realización particularmente preferida se proporciona un método de extracción de fibras de piel de líber de planta descortezada que comprende: pretratar piel de líber de planta descortezada de una planta de fibra con una disolución acuosa que contiene citrato de trisodio que tiene un pH de 8,5-9,5 a una temperatura de 90 °C o menos durante 30-60 minutos; y, a continuación tratar las fibras con una proteasa a una temperatura en un intervalo de 40-65 °C a un pH en un intervalo de 8-10 durante 0,5-12 horas para eliminar tanto residuos insolubles como materiales solubles de las fibras. Esta realización es particularmente útil para piel de líber de lino descortezada.

Características adicionales de la invención se describirán o serán evidentes en el transcurso de la siguiente descripción detallada.

Descripción de realizaciones preferidas

5 *Ejemplo 1: Tratamiento de fibra de cáñamo de piel de liber descortezada de cáñamo de crecimiento completo, con proteasa a diferentes concentraciones*

10 Etapas 1 y 2: Pretratamiento de piel de liber de cáñamo (o corteza) antes del tratamiento con proteasa

15 Se pretrataron doce gramos de piel de liber de cáñamo descortezada por agitación en 360 ml (3,3 % de consistencia) de una disolución acuosa que contenía 0,4 % (peso/volumen) de citrato de trisodio a 85 °C durante 1 h. La disolución se desechó. Esto fue seguido de agitación de la fibra en 360 ml de una disolución acuosa que contenía 0,5 % de NaOH y 0,4 % (peso/volumen) de citrato de trisodio a 85 °C durante 4 h. La disolución se desechó y la fibra se aclaró tres veces con agua.

Etapa 3: Tratamiento con la proteasa subtilisina

20 La fibra recuperada de la Etapa 2 se dividió en 6 porciones iguales, equivalentes a 2 gramos de la fibra seca sin tratar. Cada porción se suspendió en 40 ml (5 % de consistencia) de 0,1 % (peso/volumen) de citrato de trisodio (pH 9,0) y se trató por una de las cuatro concentraciones de la proteasa (0, 0,2, 0,4 y 0,8 µl/ml), a 55 °C durante 3 h. La proteasa es subtilisina de *Bacillus licheniformis* (Sigma, 94 mg de proteína/ml, 12,9 unidades/mg de proteína).

25 La liberación de materiales totales, que incluye el residuo insoluble, en cada una de las disoluciones se monitorizó mediante D.O. medida por espectroscopía UV-Vis a 280 nm (Tabla 2). Después de la centrifugación para eliminar el residuo, la D.O. del sobrenadante claro se determinó de nuevo a 280 nm (Tabla 3). Se sacaron alícuotas (1 ml) para la medición de D.O. a 1, 2 y 3 horas.

30 En la Tabla 2, sin proteasa (0 µl/ml), el tampón liberó continuamente materiales de fibra de cáñamo, que incluyen tanto residuo como sustancias solubles, representadas por la DO₂₈₀ del sobrenadante como 0,855, 1,041 y 1,269 en 1, 2 y 3 h, respectivamente. Sin embargo, con la adición de proteasa a diferente concentración de 0,05, 0,1 y 0,2 µl/ml, hubo un aumento coherente en la tasa de liberación de materiales (DO₂₈₀) en los sobrenadantes en los mismos periodos. Como comparación, con proteasa a 0,2 µl/ml, la DO₂₈₀ del sobrenadante es 1,540, 1,842 y 2,018 en 1, 2 y 3 h respectivamente. Tales aumentos de DO₂₈₀ del sobrenadante no pueden explicarse por la insignificativa DO₂₈₀ de fondo (0,087) de la proteasa, que es 0,084 a esa concentración. Es obvio que la proteasa aceleró la liberación de tanto residuo como materiales solubles de fibra.

40 A las mayores concentraciones de 0,4 y 0,8 µl/ml, no pareció que la velocidad aumentara la liberación significativamente, en comparación con 0,2 µl/ml.

Tabla 2

D.O. del sobrenadante en bruto con residuos de fibra de cáñamo china tratada a diferentes concentraciones de proteasa			
Concentración de proteasa (µl/ml)	DO ₂₈₀ a diferentes tiempos de reacción ¹		
	1 h	2 h	3 h
0	0,855	1,041	1,269
0,05	1,273	1,538	1,801
0,1	1,411	1,613	1,832
0,2	1,540	1,842	2,018
0,4	1,599	1,912	2,118
0,8	1,700	1,978	2,156

¹ La DO₂₈₀ del fondo creado por proteasa a la mayor concentración de 0,8 µl/ml es aproximadamente 0,29, e inferior a 0,084 a la concentración de 0,2 µl/ml.

45 Después de la eliminación del residuo mediante centrifugación, volvió a determinarse la DO de las mismas disoluciones para mostrar solo la liberación de sustancias solubles detectada a 280 nm. En la Tabla 3, sin proteasa (0 µl/ml), la liberación de materiales solubles por tampón se representó por el aumento de DO₂₈₀ del sobrenadante (0,443, 0,607 y 0,710) en 1, 2 y 3 h respectivamente. La adición de proteasa a las concentraciones de 0,05, 0,1 y 0,2 µl/ml también produjo tasas más rápidas de liberación de los materiales solubles en los mismos periodos. Por tanto, indicó que la proteasa ha acelerado la liberación de materiales solubles de fibra.

50 A las mayores concentraciones de 0,4 y 0,8 µl/ml, no pareció que la velocidad aumenta la liberación significativamente, en comparación con 0,2 µl/ml.

Tabla 3

D.O. del sobrenadante claro centrifugado de fibra de cáñamo china tratada a diferentes concentraciones de proteasa			
Concentración de proteasa (µl/ml)	DO ₂₈₀ a diferentes tiempos de reacción ¹		
	1 h	2 h	3 h
0	0,443	0,607	0,710
0,05	0,845	1,029	1,178
0,1	0,852	1,049	1,186
0,2	1,025	1,194	1,312
0,4	1,131	1,306	1,421
0,8	1,264	1,380	1,478

¹ La DO₂₈₀ de los sobrenadantes claros de la Tabla 2 a diferentes tiempos de reacción se determinó después de eliminar el residuo mediante centrifugación.

Basándose en las Tablas 2 y 3, es evidente que la proteasa puede acelerar la liberación de tanto el residuo como la sustancia soluble de la fibra tratada. La significativa liberación puede llevarse a cabo en 1 h a una concentración de proteasa a 0,2 µl/ml.

Generalmente, la D.O. a 280 nm se usa para determinar la presencia de compuestos que contienen anillos aromáticos que incluyen sustancias como lignina o proteína vegetal con residuos de aminoácidos aromáticos. Como la liberación de las sustancias solubles se efectuó por proteasa, el sustrato diana en la fibra de cáñamo sería las proteínas vegetales. El presente tratamiento con proteasa de la fibra de cáñamo ha liberado probablemente péptidos solubles cortos y otras sustancias físicamente o químicamente asociadas.

El presente tratamiento con proteasa de corteza descortezada a pH alcalino es, por tanto, diferente de aquel por la mezcla de enzimas de *Aspergillus* a pH ácido descrito en diversos estados de la técnica.

Etapa 4: Tratamiento con pectinasas

Después de la etapa con proteasa, el sobrenadante se desechó y la fibra se aclaró tres veces con agua. La fibra recuperada (equivalente a 2 g de la fibra de líber seca de partida) se trató en 40 ml (5 % de consistencia) de una disolución acuosa que contenía la enzima pectinasa (Novozyme Pectinase (poligalacturonasa) de *Aspergillus niger*) a 0,2 µl/ml en citrato de sodio 50 mM (pH 5) a 55 °C. Después de 0,5 h, la disolución de enzima podría recuperarse para la recirculación. La fibra se aclaró dos veces con agua.

Etapa 5: Blanqueamiento

La fibra de la Etapa 4 se blanqueó en 20 ml (5 % de consistencia) de una disolución de 0,35 % de H₂O₂ y 0,2 % de NaOH, 70 °C durante 1 hora. Se desechó la disolución de blanqueamiento y la fibra se lavó tres veces con agua. La comparación de las diferentes muestras de fibra indicó que aquellas procesadas con proteasa a concentración de 0,1 µl/ml o superior en la Etapa 2 estaban más separadas en fibras más finas, más suaves y más brillantes que la muestra de control sin tratamiento con proteasa.

Ejemplo 2: Tratamiento de fibra de cáñamo de piel de líber descortezada de cáñamo de crecimiento completo, con proteasa a diferentes temperaturas y pH

35 Determinación de la temperatura óptima en el tratamiento con proteasa de fibra de cáñamo

Se pretrató fibra de líber como se ha descrito en las Etapas 1 y 2 del Ejemplo 1. A continuación, la fibra pretratada (equivalente a 1 g de la fibra de líber de partida seca) se trató con la proteasa subtilisina de *Bacillus licheniformis* (0,2 µl/ml) en 20 ml (5 % de consistencia) de 0,1 % (peso/volumen) de citrato de trisodio (pH 9,4), a 55 y 65 °C durante 3 h.

La liberación de materiales solubles, libres del residuo, en cada una de las disoluciones se monitorizó mediante D.O. medida por espectroscopía UV-Vis a 280 nm (Tabla 4). Después de la centrifugación para eliminar el residuo, la D.O. del sobrenadante claro se determinó de nuevo a 280 nm (Tabla 4). Se tomaron alícuotas (1 ml) para la medición de D.O. a 1, 2 y 3 horas.

Tabla 4

Efecto de la temperatura sobre el sobrenadante claro centrifugado de fibra de cáñamo china tratada por proteasa a diferentes temperaturas			
Temperatura (°C)	DO ₂₈₀ a diferentes tiempos de reacción		
	1 h	2 h	3 h
55 (Tampón)	0,603	0,726	0,834
55	1,001	1,193	1,312
65	0,945	1,223	1,324

En la Tabla 4, los sobrenadantes con proteasa (55 °C y 65 °C) tienen DO mucho mayor que el control, que es un tampón sin proteasa. Hubo poca diferencia en la DO entre los sobrenadantes a 55 °C y 65 °C.

Determinación del pH óptimo del tratamiento con proteasa de fibra

- 5 Se procesaron las muestras de fibra (equivalentes a 1 g de fibra de líber de partida seca) pretratadas por NaOH como se ha descrito en la Etapa 2 del Ejemplo 1 con la proteasa subtilisina de *Bacillus licheniformis* (0,2 µl/ml) en 40 ml de 0,1 % (peso/volumen) de citrato de trisodio a diferentes pH (8,0, 8,5, 9,0 y 9,5) y 55 °C durante 3 h.
- 10 La liberación de materiales solubles, libres del residuo, en cada una de las disoluciones se monitorizó mediante D.O. medida por espectroscopía UV-Vis a 280 nm (Tabla 5). Después de la centrifugación para eliminar el residuo, la D.O. del sobrenadante claro se determinó de nuevo a 280 nm (Tabla 5).

Tabla 5

D.O. del sobrenadante claro centrifugado de fibra de cáñamo china tratada por proteasa a diferentes pH			
pH	DO ₂₈₀ a diferentes tiempos de reacción		
	1 h	2 h	3 h
8,0	0,561	0,663	0,728
8,5	0,609	0,680	0,758
9,0	0,700	0,820	0,876
9,5	0,534	0,660	0,710

- 15 En la Tabla 5, basándose en el valor de DO₂₈₀, fue evidente que la proteasa subtilisina fue eficaz a pH 8,0, 8,5, 9,0 y 9,5, pero ligeramente más a 9,0 que el resto. El uso de pH alcalino en el presente tratamiento con proteasa es, por tanto, un gran contraste con el uso de pH ácido de la mezcla de enzimas de *Aspergillus* descrita en diversos estados de la técnica.

20 *Ejemplo 3: Tratamiento de fibra de cáñamo de piel de líber descortezada de cáñamo joven (70 días), con proteasas*

Con el fin de confirmar que el tratamiento con proteasa es aplicable a otra muestra de fibra de cáñamo, el protocolo usado en el Ejemplo 1 se repitió para el procesamiento de cáñamo joven cultivado durante 70 días en la región de Peace River, Alberta, Canadá, incluyendo las Etapas 1 a 5.

En la Etapa 3 que implica el tratamiento con proteasa se trataron 2 muestras con o sin la proteasa subtilisina a 0,2 µl/ml. Se determinó la DO₂₈₀ de tanto los sobrenadantes en bruto como centrifugados (Tabla 6). La DO₂₈₀ del sobrenadante de proteasa fue coherentemente superior al control. Por tanto, indicó que el tratamiento con proteasa es eficaz para liberar tanto el residuo como el material soluble de la fibra de cáñamo canadiense.

Tabla 6

D.O. de los sobrenadantes en bruto y centrifugados de fibra de cáñamo canadiense tratada con o sin proteasa						
Concentración de proteasa (µl/ml)	DO ₂₈₀ del sobrenadante en bruto a diferentes tiempos de reacción ¹			DO ₂₈₀ de los sobrenadantes claros centrifugados a diferentes tiempos de reacción ²		
	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h
0	0,381	0,338	0,350	0,186	0,242	0,312
0,2	0,565	0,608	0,714	0,442	0,442	0,551

¹ La DO₂₈₀ del fondo creado por la proteasa es inferior a 0,084 a concentración a 0,2 µl/ml.
² Se determinó la DO₂₈₀ de los sobrenadantes claros a diferentes tiempos de reacción después de eliminar el residuo mediante centrifugación de las disoluciones en bruto.

35 *Ejemplo 4: Extracción de fibra de cáñamo de piel de líber descortezada del cáñamo de crecimiento completo, sin el uso de pectinasa.*

La fibra de cáñamo de líber de crecimiento completo también se purificó por un procedimiento más corto, en comparación con el Ejemplo 1, que incluye un pretratamiento mucho más corto en NaOH (de 3 h a 1 h) y tratamiento más corto en la proteasa subtilisina (3 h a 1,5 h), sin el posterior tratamiento con pectinasa como se ha descrito como Etapa 4 en el Ejemplo 1.

Etapas 1 y 2: Pretratamiento de piel de líber de cáñamo (o corteza) antes del tratamiento con proteasa

45 Se pretrató piel de líber de cáñamo descortezada por agitación en una disolución acuosa (3,3 % de consistencia) que contenía 0,4 % (peso/volumen) de citrato de trisodio a 85 °C durante 30 min. La disolución se desechó y la fibra se aclaró tres veces con agua. La disolución se desechó. Esto fue seguido de agitación al 3,3 % de consistencia en una disolución acuosa que contenía 0,5 % de NaOH y 0,4 % (peso/volumen) de citrato de trisodio a 85 °C durante 1 h. La disolución se desechó. La fibra se pulverizó con un chorro de agua para facilitar la eliminación de una buena

cantidad de residuo de planta libremente unido a la fibra.

Etapa 3: Tratamiento con proteasa

5 La fibra de cáñamo pretratada de la Etapa 2 se suspendió al 5 % de consistencia en una disolución de 0,1 % (peso/volumen) de citrato de trisodio (pH 9,0) con o sin la proteasa subtilisina a 0,2 µl/ml a 55 °C durante 1,5 h. La disolución se desechó y la fibra se lavó dos veces con agua. Sin el tratamiento con pectinasa descrito en el Ejemplo 1, la fibra lavada se blanqueó.

10 Etapa 4: Blanqueamiento

La fibra de cáñamo de la Etapa 3 de tratamiento con proteasa se blanqueó en 20 ml (5 % de consistencia) de una disolución de 0,35 % de H₂O₂ y 0,2 % de NaOH, 70 °C durante 1 hora. Se desechó la disolución de blanqueamiento y la fibra se lavó tres veces con agua. Esto dio fibras brillantes, finas y suaves comparables a la muestra procesada con el protocolo largo descrito en el Ejemplo 1.

20 Como el pretratamiento con citrato de trisodio/ hidróxido sódico siguió a pH 9-14 y el posterior tratamiento con la proteasa siguió a pH 9, todas las etapas en la presente purificación de fibra se han producido en pH alcalino. Esto ha evitado cualquier exposición larga de la fibra en condición ácida que pueda dañar su integridad.

Ejemplo 5: Extracción de fibra de cáñamo de piel de líber descortezada del cáñamo joven, sin el uso de pectinasa

25 La fibra de cáñamo de líber joven también se purificó por un procedimiento más corto en comparación con el Ejemplo 1, que incluye un pretratamiento mucho más corto en NaOH (3 h a 2 h) a menor temperatura (70 °C frente a 85 °C) y tratamiento más corto en la proteasa subtilisina (3 h a 1,5 h), sin el posterior tratamiento con pectinasa como se ha descrito como Etapa 4 en el Ejemplo 1.

Etapas 1 y 2: Pretratamiento de piel de líber de cáñamo (o corteza) antes del tratamiento con proteasa

30 Se pretrató piel de líber de cáñamo descortezada por agitación en una disolución acuosa (3,3 % de consistencia) que contenía 0,4 % (peso/volumen) de citrato de trisodio a 70 °C durante 30 min. La disolución se desechó y la fibra se aclaró tres veces con agua. La disolución se desechó. Esto fue seguido de agitación al 3,3 % de consistencia en una disolución acuosa que contenía 0,5 % de NaOH y 0,4 % (peso/volumen) de citrato de trisodio a 70 °C durante 2 h. La disolución se desechó. La fibra se pulverizó con un chorro de agua para facilitar la eliminación de cualquier residuo de planta libremente unido a la fibra.

Etapa 3: Tratamiento con proteasa

40 La fibra de cáñamo pretratada de la Etapa 2 se suspendió al 5 % de consistencia en una disolución de 0,1 % (peso/volumen) de citrato de trisodio (pH 9,0) con o sin la proteasa subtilisina a 0,2 µl/ml a 55 °C durante 1,5 h. La disolución se desechó y la fibra se lavó dos veces con agua. Sin el tratamiento con pectinasa descrito en el Ejemplo 1, la fibra lavada se blanqueó.

45 Etapa 4: Blanqueamiento

Se blanqueó la fibra de cáñamo de la Etapa 3 del tratamiento con proteasa en 20 ml (5 % de consistencia) de una disolución de 0,35 % de H₂O₂ y 0,2 % de NaOH, 70 °C durante 1 hora. Se desechó la disolución de blanqueamiento y la fibra se lavó tres veces con agua. Esto dio fibras brillantes, finas y suaves.

50 Al igual que el Ejemplo 4, todas las etapas que incluyen el pretratamiento con citrato de trisodio/ hidróxido sódico que siguieron a pH 9-14 y el posterior tratamiento con proteasa que siguió a pH 9, se han realizado en pH alcalino. Esto ha evitado la larga exposición de fibra en condición ácida que puede dañar su integridad.

Ejemplo 6: Tratamiento de fibra de lino de piel de líber descortezada de lino, con proteasa

55 Se purificó fibra de lino por un procedimiento más corto en comparación con el Ejemplo 1, que incluye un pretratamiento de 1 etapa sin NaOH, sin posterior tratamiento con pectinasa.

Etapa 1: Pretratamiento de piel de líber de lino (o corteza) antes del tratamiento con proteasa

60 Se pretrató piel de líber de lino descortezada por agitación en una disolución acuosa (5 % de consistencia) que contenía 0,4 % (peso/volumen) de citrato de trisodio a 85 °C durante 1 h. La disolución se desechó y la fibra se aclaró tres veces con agua. Sin pretratamiento con NaOH descrito en la Etapa 1 del Ejemplo 1, la fibra se trató con la proteasa subtilisina como se ha descrito en la Etapa 2 a continuación.

65 Etapa 2: Tratamiento con proteasa

La fibra de lino pretratada de la Etapa 1 se suspendió al 5 % de consistencia en una disolución de 0,1 % (peso/volumen) de citrato de trisodio (pH 9,0) con o sin la proteasa subtilisina a 0,2 µl/ml a 55 °C durante 3 h. La liberación de materiales totales, que incluye el residuo, en cada una de las disoluciones se monitorizó mediante D.O. medida a 280 nm (Tabla 7). Se tomaron alícuotas (1 ml) para la medición de D.O. del sobrenadante en bruto y el sobrenadante centrifugado claro a las 1, 2 y 3 horas. Fue evidente que la proteasa ha acelerado la liberación de residuos y otros materiales solubles de la fibra de lino.

Tabla 7

D.O. de los sobrenadantes en bruto y centrifugados de fibra de lino tratada con o sin proteasa						
Concentración de proteasa (µl/ml)	DO ₂₈₀ del sobrenadante en bruto a diferentes tiempos de reacción ¹			DO ₂₈₀ de los sobrenadantes claros centrifugados a diferentes tiempos de reacción ²		
	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h
0	0,478	0,616	0,754	0,209	0,305	0,368
0,2	1,507	1,861	2,380	0,925	1,204	1,452

¹ La DO₂₈₀ del fondo creado por la proteasa es inferior a 0,084 a concentración a 0,2 µl/ml.
² Se determinó la DO₂₈₀ de los sobrenadantes claros a diferentes tiempos de reacción después de eliminar el residuo mediante centrifugación de las disoluciones en bruto.

10

Etapa 3: Blanqueamiento

La fibra de lino de la Etapa 2 del tratamiento con proteasa se lavó dos veces con agua. Sin el tratamiento con pectinasa descrito en el Ejemplo 1, la fibra se blanqueó en 20 ml (5 % de consistencia) de una disolución de 0,35 % de H₂O₂ y 0,2 % de NaOH, 70 °C durante 1 hora. Se desechó la disolución de blanqueamiento y la fibra se lavó tres veces con agua. La comparación de las muestras de fibra indicó que aquellas procesadas con proteasa estaban más separadas en fibras más finas y más suaves que la muestra de control sin tratamiento con proteasa.

Tanto el pretratamiento como el tratamiento con proteasa en la presente purificación de fibra se han realizado en pH alcalino. Esto ha evitado cualquier larga exposición de la fibra en condición ácida que pueda dañar su integridad.

Ejemplo 7: Extracción de fibra de cáñamo de piel de líber de cáñamo enriada, sin el uso de pectinasas

También se purificó fibra de cáñamo de líber enriada por un procedimiento más corto, en comparación con el Ejemplo 1, que incluye un pretratamiento mucho más corto en NaOH (3 h a 2,5 h) a 85 °C, y tratamiento más corto en la proteasa subtilisina (3 h a 2 h) a menores concentraciones, sin el posterior tratamiento con pectinasa como se describe como Etapa 4 en el Ejemplo 1.

Etapas 1 y 2: Pretratamiento de piel de líber de cáñamo enriado (o corteza) antes del tratamiento con proteasa

Se pretrató piel de líber de cáñamo enriada y descortezada por agitación en una disolución acuosa (3,3 % de consistencia) que contenía 0,4 % (peso/volumen) de citrato de trisodio a 85 °C durante 30 min. La disolución se desechó y la fibra se aclaró tres veces con agua. La disolución se desechó. Esto fue seguido de agitación al 3,3 % de consistencia en una disolución acuosa que contenía 0,5 % de NaOH y 0,4 % (peso/volumen) de citrato de trisodio a 85 °C durante 2,5 h. La disolución se desechó y la fibra se aclaró tres veces con agua.

Etapa 3: Tratamiento con proteasa

La fibra de cáñamo pretratada de la Etapa 2 se suspendió al 5 % de consistencia en una disolución de 0,1 % (peso/volumen) de citrato de trisodio (pH 9,0) con proteasa subtilisina a 0, 0,01, 0,05, 0,1 y 0,2 µl/ml a 55 °C durante 2 h. La liberación de materiales solubles en las disoluciones de cada ejecución se monitorizó mediante espectroscopía UV-Vis a 280 nm. Se tomaron alícuotas (1 ml) para la medición de D.O. a 0, 0,5, 1, 1,5 y 2 h. Después de la centrifugación para eliminar residuos, la D.O. del sobrenadante claro se determinó a 280 nm mediante espectroscopía UV-Vis (Tabla 8).

45

Tabla 8

D.O. de los sobrenadantes centrifugados de fibra de cáñamo tratada con proteasa a diferentes concentraciones					
Tiempo (h)	DO ₂₈₀ de sobrenadantes claros centrifugados a diferentes tiempos de reacción				
	Concentración de proteasa (µl/ml)				
	0*	0,01	0,05	0,1	0,2
0	0,203	0,170	0,182	0,186	0,208
0,5	0,321	0,373	0,418	0,461	0,451
1,0	0,348	0,444	0,486	0,534	0,525
1,5	0,371	0,490	0,523	0,589	0,576
2,0	0,380	0,504	0,578	0,633	0,610

D.O. de los sobrenadantes centrifugados de fibra de cáñamo tratada con proteasa a diferentes concentraciones	
	DO ₂₈₀ de sobrenadantes claros centrifugados a diferentes tiempos de reacción
	Concentración de proteasa (µl/ml)
* 0,1 % (peso/volumen) de citrato de trisodio (pH 9,0) sin proteasa	

Después de 2 h, la disolución se desechó y la fibra se lavó dos veces con agua. Sin el tratamiento con pectinasa descrito en el Ejemplo 1, la fibra lavada se blanqueó.

5 Etapa 4: Blanqueamiento

Se blanqueó la fibra de cáñamo de la Etapa 3 del tratamiento con proteasa en 20 ml (5 % de consistencia) de una disolución de 0,35 % de H₂O₂ y 0,2 % de NaOH, 70 °C durante 1 hora. Se desechó la disolución de blanqueamiento y la fibra se lavó tres veces con agua. Las muestras de fibra que se trataron previamente con la proteasa a concentración de 0,01 a 0,2 µl/ml en la Etapa 3 dieron fibras finas brillantes y suaves.

Comparación del tratamiento con proteasa con el tratamiento con pectinasa:

El Ejemplo 4 tomado con el Ejemplo 1 muestra que el proceso que implica proteasa sola produce fibras de mejor calidad que el proceso con pectinasa del estado de la técnica (Sung 2007).

En el Ejemplo 1, el protocolo para probar la proteasa tiene cinco etapas: Etapas 1 y 2 de pretratamiento, Etapa 3 de proteasa, Etapa 4 de pectinasa y Etapa 5 de blanqueamiento. En el Ejemplo 1 también hay una realización de control paralelo sin la Etapa 3 de proteasa, que es equivalente al "proceso con pectinasa" de Sung y col. (Sung 2007). La realización del control es de cuatro etapas: Etapas 1 y 2 de pretratamiento, Etapa 3 de pectinasa y Etapa 4 de blanqueamiento. En la Tabla 2, la realización del control se representa por la realización con concentración de proteasa a 0 µl/ml. Como se indica en el Ejemplo 1, la comparación de las diferentes muestras de fibra indicó que aquellas procesadas con proteasa a concentración de 0,1 µl/ml o mayor en la Etapa 2 estuvieron más separadas en fibras más finas, más suaves y más brillantes que la muestra de control sin tratamiento con proteasa. Por tanto, el Ejemplo 1 enseña que con tanto el tratamiento con proteasa como pectinasa, la fibra es mejor que con el tratamiento con pectinasa sola.

Además, el Ejemplo 4 describe un protocolo con cuatro etapas, es decir, para eliminar la etapa de pectinasa. Por tanto, hay cuatro etapas: Etapas 1 y 2 de pretratamiento, Etapa 3 de proteasa y Etapa 4 de blanqueamiento. En este protocolo solo hay tratamiento con proteasa sin tratamiento con pectinasa. Como se describe en el Ejemplo 4, este proceso (es decir, proteasa sola) dio fibras brillantes, finas y suaves comparables a la muestra procesada con el protocolo largo (es decir, proteasa más pectinasa) descrito en el Ejemplo 1. Por tanto, el Ejemplo 4 enseña que el proceso con proteasa sola es comparable al proceso con proteasa/pectinasa.

Como el Ejemplo 1 demuestra que el protocolo largo con tanto proteasa como pectinasa es mejor que la pectinasa sola, y el Ejemplo 4 demuestra que el proceso con proteasa sola es comparable al proceso con proteasa/pectinasa, es evidente que el proceso con proteasa sola proporciona resultados mejorados con respecto a la pectinasa sola. Por tanto, el presente proceso con proteasa es mejor que el proceso con pectinasa del estado de la técnica.

40 *Referencias:*

Adamsen APS, Akin DE, Rigsby LL (2002) Textile Res. J. 72: 789-794.

45 Adamsen APS, Akin DE, Rigsby LL (2002) Textile Res. J. 72: 296-302.

Akkawi J-S (1990) Patente de EE.UU. 4.891.096 concedida el 2 de enero 1990.

Chiyouzou H (1980) Resumen de patente de Espacenet de JP 55026267 publicada el 25 de febrero de 1980.

50 Clarke AF, Dennis HGS, Wang X, Hurren CJ (2002) Publicación de patente internacional PCT WO 03/006722 publicada el 23 de enero de 2003.

Dorado J, Field JA, Almendros G, Sierra-Alvarez R (2001) Appl. Microbiol. Biotechnol, 57: 205-211.

55 Garcia-Jaldon C, Dupeyre D, Vignon MR (1998) Biomass and Bioenergy. 14: 251-260.

Jaskowski MC (1984) Patente de EE.UU. 4.481.355 concedida el 6 de noviembre de 1984.

Jaskowski MC (1986a) Patente de EE.UU. 4.568.739 concedida el 4 de febrero de 1986.

60 Jaskowski MC (1986b) Patente de EE.UU. 4.617.383 concedida el 14 de octubre de 1986.

- Karapinar E, Sariisik, MO (2004) *Fiber & Textile in Eastern Europe*. 12: 79-82.
- Kling A, Specht V (1976) Patente de EE.UU. 3.954.401 concedida el 4 de mayo de 1976.
- 5 Kortekaas S, Vidal G, Yan-Ling H, Lettinga G, Field JA (1998) *J. Fermentation and Bioengineering*. 86: 97-110.
- Massiot P, Thibault J-F, Rouau X (1989) *J Sci Food Agri*. 49: 45-57.
- 10 Ouajai S, Shanks RA (2005) *Macromol. Biosci*. 5: 124-134.
- Pokora AR, Johnson MA (1994) Patente de EE.UU. 5.374.555 concedida el 20 de diciembre de 1994.
- Raimann W (1986) Patente de EE.UU. 5.510.055 concedida el 23 de abril de 1996.
- 15 Sedelnik N (2004) *Fiber & Textile in Eastern Europe* 12: 58-60.
- Sedelnik N, Zareba S, Szporek J (2006) *Fiber & Textile in Eastern Europe* 14: 22-26.
- 20 Singh DP (2006) Informe del Central Research Institute for Jute & Allied Fibres, Indian Council of Agricultural Research, titulado "Ramie (*Boemmeria nivea*)". Sección titulada "Degumming". Extraído de internet en mayo de 2006.
- Steinke JD, Johnson LA (1991) *Cereal Chem*. 68: 7-12.
- 25 Sung WL, Wood M, Huang F (2007) Publicación de patente internacional PCT WO 2007/140578 publicada el 13 de diciembre de 2007.
- Zhang J, Johansson G, Petterson B, Akin DE, Foulk JA, Khalili S, Henriksson G (2003) *Textile Res. J*. 73: 263-267.
- 30 Zhang J (2006) Tesis doctoral titulada "Biochemical Study and Technical Applications of Fungal Pectinase". Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 137.
- 35 Otras ventajas que son inherentes a la estructura son obvias para un experto en la materia. Las realizaciones se describen en el presente documento ilustrativamente y no pretenden limitar el alcance de la invención como se reivindica. Variaciones de las anteriores realizaciones serán evidentes para un experto habitual y está previsto por el inventor que estén englobadas por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de extracción fibras de piel de líber de planta descortezada que comprende: pretratar piel de líber de planta descortezada de una planta de fibra con una disolución acuosa que contiene citrato de trisodio que tiene un pH en un intervalo de 8 - 14 a una temperatura de 90 °C o menos; y posteriormente las tratar fibras recuperadas con una proteasa a pH alcalino.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la temperatura de pretratamiento está en un intervalo de 65 °C a 90 °C.
- 10 3. El método de la reivindicación 1, en el que la temperatura de pretratamiento está en un intervalo de 65 °C a 85 °C.
- 15 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el pretratamiento se realiza durante un tiempo en un intervalo de 0,5 - 5 horas.
- 15 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el tratamiento con proteasa se realiza en un medio acuoso a un pH en un intervalo de 8 - 12.
- 20 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el tratamiento con proteasa se realiza en un medio acuoso a un pH en un intervalo de 8 - 10.
- 20 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el tratamiento con proteasa se realiza en un medio acuoso a un pH en un intervalo de 8,0 - 9,5.
- 25 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el tratamiento con proteasa se realiza a una temperatura en un intervalo de 35 - 65 °C.
- 30 9. El método de la reivindicación 1, en el que el pretratamiento se hace a un pH en un intervalo de 8,5 - 9,5 a una temperatura de 90 °C o menos durante 30 - 60 minutos, seguido de tratar con una disolución de hidróxido sódico a una temperatura de 90 °C o menos durante 30 - 120 minutos, y en el que el tratamiento de las fibras recuperadas con proteasa se hace a una temperatura en un intervalo de 40 - 65 °C a un pH en un intervalo de 8 - 10 durante 0,5 - 12 horas.
- 35 10. El método de la reivindicación 9, que comprende además tratar las fibras con una pectinasa en una disolución acuosa de citrato de sodio a un pH en un intervalo de 4 - 6 a una temperatura de 30 - 45 °C durante 1 - 12 horas.
- 35 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 10, en el que la planta de fibra es cáñamo.
- 40 12. El método de la reivindicación 1, en el que el pretratamiento se hace a un pH de 8,5 - 9,5 a una temperatura de 90 °C o menos durante 30 - 60 minutos y en el que el tratamiento de las fibras recuperadas con proteasa se hace a una temperatura en un intervalo de 40 - 65 °C a un pH en un intervalo de 8 - 10 durante 0,5 - 12 horas.
- 40 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 ó 12, en el que la planta de fibra es lino.
- 45 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13, en el que la proteasa es de origen de Bacillus.
- 45 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13, en el que la proteasa es subtilisina, termolisina, alcalasa o esperasa natural o modificada.
- 50 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 15, en el que la proteasa se usa en una cantidad de al menos 0,24 unidades de enzima por gramo de fibra tratada.
- 50 17. El método de la reivindicación 16, en el que la cantidad de proteasa está en un intervalo de 0,24 - 24 unidades de enzima por gramo de fibra tratada.
- 55 18. El método de la reivindicación 16, en el que la cantidad de proteasa está en un intervalo de 0,24 - 4,8 unidades de enzima por gramo de fibra tratada.