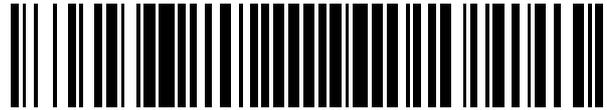


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 239**

51 Int. Cl.:

D21C 5/00 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2013 PCT/EP2013/055866**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14146712**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2013 E 13712199 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2976458**

54 Título: **Método para ahorrar energía en la producción de papel**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.02.2018

73 Titular/es:
METGEN OY (100.0%)
Rakentajantie 26
20780 Kaarina, FI

72 Inventor/es:
BIRIKH, KLARA y
AZHAYEV, ALEXEY

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 653 239 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

Método para ahorrar energía en la producción de papel

5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuentra en el campo de la producción de papel, más en particular se refiere al proceso de fabricación de pasta de madera. Proporciona métodos y compuestos útiles para reducir los requisitos de energía de la producción de pasta de madera.

10

Antecedentes de la invención

La lignina es un componente principal de la madera (vista como un material marrón), también presente en plantas que no tienen madera. Este compuesto polifenólico heterogéneo proporciona rigidez a la estructura de madera y protege las fibras de celulosa frente al daño. Naturalmente, la lignina crea un obstáculo importante para recuperar celulosa para la fabricación de papel u otras aplicaciones. La producción mecánica de pasta de madera es un proceso extremadamente intenso desde el punto de vista de la energía; por ejemplo, una pasta de papel prensa típica puede necesitar 2160 kWh de energía de refinado por tonelada de materia prima para refinar virutas de madera para dar una pasta. Reducir este requisito de energía es una necesidad muy aguda de la industria.

15

20

Como una de las soluciones, se ha propuesto el uso de enzimas capaces de oxidar la lignina para el pretratamiento de virutas de madera (material para la producción de pasta) con el fin de reducir la energía requerida para la trituración. Esta idea se percibió de la observación natural de que los hongos, especialmente hongos de podredumbre blanca, pueden descomponer el material de madera secretando enzimas lignolíticas tales como peroxidases y lacasas.

25

Esta idea se implementó por primera vez como la denominada bioproducción de pasta, en la que especies fúngicas se cultivaron realmente sobre virutas de madera antes de la producción de pasta. Esto dio como resultado un ahorro de energía sustancial, pero el tiempo de cultivo comprendió varias semanas, lo que no era aceptable en un contexto industrial.

30

Posteriormente se propuso usar preparaciones de enzimas aisladas para el pretratamiento de la madera, en vez de especies vivas, lo que en principio debería producir un efecto similar. Esto dio como resultado un número limitado de publicaciones en las que se emplearon lacasas fúngicas aisladas para el pretratamiento de virutas de madera.

35

Sigue existiendo la necesidad en la técnica de enzimas con un rendimiento mejorado, en cuanto a la oxidación de lignina económica, el ahorro de energía en el proceso, la velocidad de acción, la seguridad, la estabilidad y el potencial de desarrollo.

40

Sumario de la invención

Se conoce que las lacasas fúngicas tienen un potencial redox alto. La mayoría de los esfuerzos de investigación descritos hasta la fecha se han dirigido a encontrar enzimas con un potencial redox incluso mayor. Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que enzimas con un potencial redox de bajo a medio tienen un mejor rendimiento que las lacasas fúngicas convencionales. Se ha encontrado que una lacasa bacteriana (CotA) que puede obtenerse a partir de *Bacillus subtilis* tiene un efecto ampliamente mejorado sobre la integridad estructural de las virutas de madera, en comparación con las lacasas fúngicas o incluso otras lacasas bacterianas. Por consiguiente, esta enzima es más adecuada que cualquier otra lacasa para el pretratamiento de virutas de madera en la industria del papel y de la pasta.

50

Se ha encontrado que el pretratamiento de virutas de madera con CotA lacasa reducía los requisitos de energía del proceso de fabricación de pasta de madera.

En el presente documento se describe un método para reducir el requisito de energía de un proceso para recuperar celulosa a partir de una biomasa que comprende un material lignocelulósico, en el que la biomasa que comprende un material lignocelulósico se trata con una CotA lacasa antes de recuperar la celulosa de la biomasa.

55

Un proceso adecuado para recuperar celulosa a partir de una biomasa que comprende un material de lignocelulosa, es un denominado proceso de producción de pasta termomecánica (TMP). En un proceso de este tipo, la biomasa se calienta hasta una temperatura por encima de 100 grados centígrados y simultáneamente se somete a desfibrado mecánico.

60

En otras palabras, se proporciona un método para recuperar celulosa o fibras de celulosa a partir de una biomasa que comprende material lignocelulósico, en el que el método comprende una etapa en la que la biomasa se calienta hasta una temperatura por encima de 100 grados centígrados y se somete a desfibrado mecánico y en la que la biomasa que comprende material lignocelulósico se pone en contacto con una CotA lacasa antes de desfibrarse.

65

Descripción detallada de la invención

5 La fabricación de papel es el proceso fabricación del papel. En la fabricación de papel, una suspensión diluida de fibras de celulosa en agua se cuele a través de un tamiz, de modo que se deposita una estera de fibras entretrejidas aleatoriamente. El agua se retira de esta estera de fibras presionando y secado para fabricar papel. Desde la invención de la máquina de Fourdrinier en el siglo XIX, la mayor parte del papel se ha fabricado a partir de pasta de madera debido al coste.

10 Otras fuentes de fibras tales como el algodón y materiales textiles también se usan para papeles de alta calidad. Una medida común de la calidad de un papel es su contenido de pasta distinta de la madera, por ejemplo, el 25% de algodón, el 50% de tela, etc. Anteriormente, el papel se fabricaba de telas y cáñamo así como otros materiales. La madera y otros materiales vegetales usados para fabricar pasta contienen tres componentes principales (además de agua): fibras de celulosa (deseadas para la fabricación de papel), lignina (un polímero tridimensional que une las
15 fibras de celulosa entre sí) y hemicelulosas (polímeros hidrocarbonados ramificados más cortos).

La producción de pasta es un proceso de preparación de pasta. La pasta es un material compuesto por fibras de madera o fibras de celulosa.

20 El propósito de la producción de pasta es romper la estructura gruesa de la fuente de fibra, ya sean virutas de madera, tallos u otras partes de la planta, para dar las fibras constituyentes.

La pasta puede producirse en un proceso denominado producción mecánica de pasta. Para la producción de pasta de madera mecánica, la madera puede triturarse, tal como por ejemplo contra una piedra giratoria lubricada con agua. El calor generado por la trituración ablanda la lignina que unen las fibras y las fuerzas mecánicas separan las
25 fibras para formar pulpa de madera mecánica. Esto también se denomina en el presente documento desfibración.

“Desfibración” tal como se usa en el presente documento se refiere a un proceso de separación de fibras de madera entre sí.

30 Durante la segunda mitad del siglo XX se desarrollaron técnicas mecánicas más nuevas que usan “refinadores”. En un refinador, las virutas de madera se someten a fuerzas de cizallamiento intensas, por ejemplo, entre un disco de acero giratorio y una placa fija. Esto también está comprendido en el término “desfibración”.

35 La pasta mecánica consiste en una mezcla de fibras completas y fragmentos de fibra de diferentes tamaños. La pasta mecánica le proporciona al papel un tono amarillento/gris con alta opacidad y una superficie muy lisa. La producción mecánica de pasta proporciona un buen rendimiento a partir de la madera para pasta, porque usa todo el tronco, excepto la corteza, pero el requisito de energía para el refinamiento es alto y sólo puede compensarse parcialmente usando la corteza como combustible. Los diversos métodos de producción mecánica de pasta, tales como producción de pasta con pulpa de madera mecánica (GW) y mecánica con refinador (RMP), arrancan físicamente las fibras de celulosa unas de otras. Gran parte de la lignina sigue adherida a las fibras. La resistencia de las fibras puede verse afectada, porque puede que se corten las fibras.

45 En modificaciones posteriores de este proceso, las virutas de madera se reblandecen previamente mediante calor (producción termomecánica de pasta (TMP)) para hacer que la fibrilación o desfibración sea más efectiva. La pasta resultante tiene un color ligero y tiene fibras más largas.

50 Con referencia a la figura 7, la producción termomecánica de pasta (TMP) es un proceso en el que se calientan virutas de madera y se hacen pasar a través de un refinador mecánico para la desfibración (separación de las fibras), dando como resultado pasta termomecánica.

55 En un proceso de TMP típico, las virutas de madera se alimentan a un vaporizador previo y se vaporizan con vapor de proceso (normalmente de 1 a 2 bar o por encima de 100 grados centígrados, tal como de 130 a 140 grados C) procedente de los refinadores. Tras un tiempo de retención de varios minutos, las virutas a presión pueden alimentarse al refinador con el tornillo sin fin de alimentación (alimentador de conexión). El refinador separa las fibras mediante fuerza mecánica por medio de medios mecánicos de refinador (por ejemplo entre placas de discos giratorios). Puede alimentarse vapor nuevo al refinador durante el arranque, para aumentar la presión hasta 4 ó 5 bar y aproximadamente 150 grados C.

60 Por tanto, la producción termomecánica de pasta se refiere a un proceso de producción de pasta, que incluye el calentamiento de la biomasa hasta una temperatura por encima de 100 grados centígrados y desfibrado mecánico.

65 El término “refinar” o “refinado” tal como se usa en el presente documento se refiere a desfibrado mecánico a una temperatura por encima de 100 grados centígrados.

La pasta se refina a menudo en dos fases. El vapor de proceso se lleva normalmente a una unidad de recuperación de calor para producir vapor limpio. El refinador descarga la pasta y el vapor en un ciclón. El ciclón separa el vapor de la pasta.

5 Tal como se usa en el presente documento, la pasta termomecánica es pasta producida mediante el procesamiento de virutas de madera usando calor y un movimiento de refinado mecánico.

10 Las virutas de madera se producen habitualmente tal como sigue: en primer lugar se pela la corteza de los troncos y se convierten en pequeñas virutas, que tienen un contenido de humedad de aproximadamente el 25-30%. Se aplica una fuerza mecánica a las virutas de madera en una acción de machado o trituración que genera calor y vapor de agua y ablanda la lignina separando así las fibras individuales.

15 Entonces se tamiza la pasta y se limpia, se separa cualquier material que no se haya refinado suficientemente (no pasó en el procedimiento de tamizado) como "desecho" y vuelve a procesarse. El proceso de TMP proporciona un alto rendimiento de fibra a partir de la madera (aproximadamente el 95%) y como la lignina no se ha eliminado, las fibras son duras y rígidas.

20 La deslignificación también puede conseguirse en un proceso químico. Un ejemplo típico es el denominado proceso de deslignificación "Kraft", que usa hidróxido de sodio y sulfuro de sodio para eliminar químicamente la lignina. Tras la deslignificación, el color de la pasta es marrón oscuro. Si se desea papel blanco, se blanquea la pasta. La pasta deslignificada, blanqueada, se alimenta a máquinas de papel tras someterse a otros procesos químicos que producen la calidad y características deseadas para el papel. Una pasta o papel químico se denomina libre de madera, aunque en la práctica se acepta habitualmente un pequeño porcentaje de fibra mecánica.

25 La producción química de pasta aplica denominados productos químicos de cocción para degradar la lignina y hemicelulosa en pequeñas moléculas solubles en agua, que pueden eliminarse mediante lavado de las fibras de celulosa sin despolimerizar las fibras de celulosa. Esto es ventajoso porque la despolimerización de celulosa debilita las fibras. El uso de pasta química para producir papel es más caro que el uso de pasta mecánica o papel recuperado, pero tiene mejores propiedades de resistencia y brillo.

30 Un desarrollo adicional de la producción química de pasta y la producción termomecánica de pasta es la producción química y termomecánica de pasta (CTMP). En el presente documento, las virutas de madera se impregnan con un producto químico tal como sulfito de sodio antes de la etapa de refinado. El resultado final es una pasta de color claro con buenas características de resistencia. Los tratamientos químicos y térmicos reducen la cantidad de energía requerida posteriormente por el refinado mecánico, y también reduce la pérdida de resistencia sufrida por las fibras. En la CTMP, las virutas de madera pueden tratarse previamente con carbonato de sodio, hidróxido de sodio, sulfito de sodio y otros productos químicos antes del refinado con un equipo similar a un molino mecánico. Las condiciones del tratamiento químico son menos vigorosas (menor temperatura, tiempo más corto, pH menos extremo) que en un proceso de producción química de pasta dado que el propósito es hacer que las fibras sean más fáciles de refinar, no eliminar la lignina como en un proceso completamente químico.

45 Las virutas de madera para TMP o CTMP se obtienen habitualmente de madera sin corteza y de árboles nuevos. Tras la fabricación, las virutas se tamizan para tener un tamaño especificado. Para la pasta de calidad superior, y un consumo de energía óptimo, las virutas tienen habitualmente un grosor de 4-6 mm y una longitud (dimensión a lo largo de las fibras) de 10 - 50 mm, tal como 15 - 40 mm o 16-22 mm. Antes del refinado, las virutas se lavan y se someten a vapor, teniendo estas virutas un contenido de humedad típico de más del 20% tal como aproximadamente el 25-30%.

50 En comparación, la producción mecánica de pasta requiera mucha energía, en el intervalo de 1000-3500 kilovatios por tonelada de pasta, mientras que el proceso de producción química de pasta es autosuficiente. La producción química de pasta produce fibras mejores (más largas), mientras que las fibras obtenidas en la producción mecánica de pasta son de diferentes tamaños. Esto da como resultado una resistencia del papel baja. Sin embargo, los costes de producción de la pasta mecánica son mucho menores en comparación con la producción química de pasta. La producción mecánica de pasta tiene un rendimiento del 95% a diferencia del 45% del proceso químico. El rendimiento en los procesos químicos es mucho menor, ya que la lignina se disuelve completamente y se separa de las fibras. Sin embargo, la lignina de los procesos de sulfato y algunos de sulfito puede quemarse como sustituto del fueloil. En molinos modernos, las operaciones de caldera de recuperación y la combustión controlada de corteza y otros residuos convierte al molino de pasta química en un productor de energía neta, que a menudo puede suministrar potencia a la red eléctrica, o vapor a plantas de calentamiento domésticas locales.

60 Tras la trituración, la pasta se clasifica tamizando hasta calidades adecuadas. Entonces puede blanquearse con peróxido para su uso en producto de mayor valor añadido.

65 El grado de libertad es una medida de la colabilidad de una suspensión de pasta. Caracteriza cómo de fina se ha refinado la pasta. Puede determinarse mediante el método Canadian Standard Freeness - (CSF) (Thode, E. F., e Ingmanson, W. L., Tappi 42(1): 74 (1959) especialmente pág. 82.; Technical Section, Canadian Pulp & Paper

Association, Official Standard Testing Method C.1, "The Determination of Freeness") y se mide en milímetros. Valores de CSF mayores significan una pasta que se cuele más rápidamente, menos refinada. El requisito de energía para el refinado depende del grado de libertad objetivo. Alcanzar un grado de libertad menor requiere más energía. El "ahorro de energía" en el refinado se refiere a una situación en la que se consigue el mismo grado de libertad con menos energía.

Tal como se usa en el presente documento, el término "molino de pasta" es una instalación de fabricación que convierte virutas de madera u otras fuentes de fibras vegetales en un tablero de fibras grueso que puede enviarse a un molino de papel para su procesamiento adicional. La pasta puede fabricarse usando métodos mecánicos, termomecánicos, químico-termomecánicos o completamente químicos. El producto acabado puede o bien blanquearse o bien no blanquearse, dependiendo de los requisitos del cliente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "pasta" pretende significar un material fibroso lignocelulósico preparado separando química y/o mecánicamente fibras de celulosa de madera, cosechas de fibras o papel de desecho. La pasta de madera es el material de partida más común en la fabricación de papel.

El término material lignocelulósico se refiere a un material que comprende (1) celulosa, hemicelulosa, o una combinación y (2) lignina.

Los recursos de madera usados para fabricar pasta de madera se denominan madera para pasta. La pasta de madera procede de árboles de madera blanda, tales como píceas, pino, abeto, alerce y abeto canadiense, y árboles de madera dura, tales como eucalipto, álamo y abedul. La fabricación de virutas de madera es la acción y la industria de producir virutas de madera para pasta, pero también para otros productos de madera procesados y cobertura con paja. Sólo la madera de corazón y la madera de albura son útiles para la fabricación de pasta. La corteza contiene relativamente pocas fibras útiles y se elimina y se usa como combustible para proporcionar vapor para su uso en el molino de pasta.

La mayoría de los procesos de producción de pasta requieren que la madera se trocee en virutas y se tamice para proporcionar virutas de tamaño uniforme. Pueden usarse piedras de amolar fabricadas con óxido de aluminio o carburo de silicio incrustado para triturar troncos de madera pequeños denominados "troncos brotando" para fabricar pasta de madera triturada con piedra (SGW). Si la madera se somete a vapor antes de la trituración, se conoce como pasta de madera triturada a presión (PGW). Los molinos más modernos usan virutas en vez de troncos y discos metálicos con crestas denominados placas de refinador en lugar de piedras de amolar. Si las virutas sólo se Trituran con las placas, la pasta se denomina pasta mecánica de refinador (RMP) y si las virutas se someten a vapor mientras se refinan la pasta se denomina pasta termomecánica (TMP). El tratamiento con vapor reduce significativamente la energía total necesaria para fabricar la pasta y reduce el daño (corte) de las fibras.

Un efecto ventajoso de aplicar una fuerza mecánica a las virutas de madera en una acción de machacado o trituración (en el presente documento también denominado, La Figura 7) es que genera calor que ablanda la lignina, ayudando así en la separación de fibras de celulosa individuales.

El pretratamiento (una etapa opcional en el TMP y obligatoria en el CTMP) es un proceso en el que las virutas se exponen a una cierta disolución química o enzimática, o un tratamiento mecánico antes del refinado. El propósito del pretratamiento es reducir el consumo de energía de refinado o mejorar las propiedades de la pasta. El pretratamiento físico se denomina a menudo reducción de tamaño y pretende reducir el tamaño físico de las virutas. Con referencia a la Figura 7, esto también se denomina tratamiento mecánico de baja energía. El pretratamiento químico es para eliminar barreras químicas, para que las fibras de celulosa puedan recuperarse más fácilmente.

El término "tratamiento mecánico de baja energía" se usa en el presente documento para indicar un proceso en el que la biomasa que contiene el material lignocelulósico se somete a fuerzas mecánicas, de modo que la temperatura de la biomasa no supere los 95 grados centígrados.

El pretratamiento también se realiza a menudo mediante impregnación. La impregnación es un proceso en el que en primer lugar se aplica presión a las virutas y tras una liberación lenta de la presión, se añade la disolución de pretratamiento a las virutas. La presión puede desarrollarse mediante fuerza mecánica (por ejemplo tornillo sin fin de impregnación) o mediante un principio de olla de vapor. Por tanto, la impregnación puede combinar en ocasiones pretratamiento químico y mecánico. En condiciones industriales, la impregnación se realiza habitualmente en virutas expuestas a vapor, lo que facilita la impregnación. La impregnación mejora la penetración de la disolución de pretratamiento en la madera. Puede continuarse con el pretratamiento en un recipiente de reacción tras la fase de impregnación en el proceso.

En un procedimiento alternativo, el pretratamiento incluye tratamiento mecánico de baja energía (la energía es baja en comparación con la energía de refinado) de virutas de madera para aumentar la superficie de contacto con la disolución de pretratamiento. En un pretratamiento mecánico de baja energía, no hay una producción significativa de calor, en otras palabras, la temperatura de las virutas de madera en esta etapa puede no superar los 95 grados C o menos, tal como 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45 ó 40 grados centígrados.

“Virutas de madera desestructuradas” son virutas de madera que se destruyeron parcialmente como resultado de la impregnación o el pretratamiento mecánico de baja energía. A este respecto, el término “pretratamiento mecánico de baja energía” debe interpretarse como un proceso en el que las virutas de madera se desestructuran parcialmente, pero no se deshilachan.

Se ha encontrado ahora que una lacasa bacteriana (CotA) que puede obtenerse a partir de *Bacillus subtilis* tiene un efecto ampliamente mejorado sobre la integridad estructural de virutas de madera, en comparación con lacasas fúngicas o incluso otras lacasas bacterianas. Por consiguiente, esta enzima es más adecuada que cualquier otra lacasa para el pretratamiento de virutas de madera en la industria del papel y de la pasta, en particular en la producción termomecánica de pasta.

Se ha encontrado que el pretratamiento de virutas de madera con CotA lacasa reducía los requisitos de energía del proceso de fabricación de pasta de madera.

En el presente documento se describe un método para reducir el requisito de energía de un proceso para recuperar celulosa a partir de una biomasa que comprende un material lignocelulósico, en el que la biomasa que comprende un material lignocelulósico se trata con una CotA lacasa antes de recuperar la celulosa de la biomasa.

Un proceso adecuado para recuperar celulosa a partir de una biomasa que comprende un material de lignocelulosa es un denominado proceso de producción termomecánica de pasta. En un proceso de este tipo, la biomasa se calienta hasta una temperatura por encima de 100 grados centígrados y se somete simultáneamente a desfibrado mecánico.

En otras palabras, en el presente documento se proporciona un método para recuperar fibras de celulosa a partir de una biomasa que comprende material lignocelulósico, en el que el método comprende una etapa en la que la biomasa se calienta hasta una temperatura por encima de 100 grados centígrados y se somete a desfibrado mecánico y en el que la biomasa que comprende material lignocelulósico se pone en contacto con una CotA lacasa antes de calentarla hasta una temperatura por encima de 100 grados centígrados.

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son enzimas que tienen una amplia distribución taxonómica y que pertenecen al grupo de oxidasas multicobre. Las lacasas son catalizadores respetuosos con el medio ambiente, que usan oxígeno molecular del aire para oxidar diversos compuestos fenólicos y no fenólicos relacionados con la lignina así como contaminantes medioambientales altamente recalcitrantes, y producen agua como único subproducto. Estos catalizadores “verdes” naturales se usan para diversas aplicaciones industriales, incluyendo la descontaminación de efluentes industriales, en la mayoría de los casos de las industrias del papel y la pasta, textil y petroquímica, y el uso como agente de biorremediación para limpiar herbicidas, pesticidas y ciertos explosivos en el suelo. Las lacasas también se usan como agentes de limpieza para ciertos sistemas de purificación de agua. Además, su capacidad para eliminar sustancias xenobióticas y producir productos poliméricos las convierte en una herramienta útil para fines de biorremediación.

Las lacasas se descubrieron originariamente en hongos, se han estudiado particularmente bien en hongos de podredumbre blanca y hongos de podredumbre marrón. Posteriormente se encontraron lacasas también en plantas y bacterias. Las lacasas tienen una especificidad de sustrato amplia; no obstante, diferentes lacasas pueden tener preferencias de sustrato algo diferentes. La característica principal de la enzima lacasa es su potencial redox, y según este parámetro, todas las lacasas pueden dividirse en tres grupos (véase, por ejemplo, Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. a., Shleev, S. V., y Yaropolov, a. I. (2007). “Blue” laccases. *Biochemistry* (Moscú), 72(10), 1136-1150. doi:10.1134/S0006297907100112): lacasas de potencial redox alto (0,7-0,8 V), lacasas de potencial redox medio (0,4-0,7 V) y lacasas de potencial redox bajo (<0,4 V). Se cree que el potencial redox bajo limita el alcance de los sustratos que puede oxidar posiblemente la enzima, y viceversa. Todas las lacasas de potencial redox alto y la parte superior de las lacasas de potencial redox medio son lacasas fúngicas. La aplicación industrial de lacasas se basa en su mayor parte, si no completamente, en lacasas fúngicas.

CotA es una lacasa bacteriana y es un componente de las capas de cubierta exteriores de la endospora de bacilos. Es una proteína de 65 kDa codificada por el gen *cotA* (Martins, O., Soares, M., Pereira, M. M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G. H., y Henriques, A. O. (2002). Molecular and Biochemical Characterization of a Highly Stable Bacterial Laccase That Occurs as a Structural Component of the *Bacillus subtilis* Endospore Coat. *Biochemistry*, 277(21), 18849 -18859. doi:10.1074/jbc.M200827200). CotA pertenece a un grupo diverso de oxidasas “azules” multicobre que incluyen las lacasas. Esta proteína muestra una termoestabilidad alta y resistencia a diversos elementos peligrosos según las capacidades de supervivencia de la endospora. Se han notificado que el potencial redox de esta proteína es de aproximadamente 0,5 mV, que lo sitúa en el intervalo de las lacasas de potencial redox medio.

En el trabajo descrito en el presente documento, se sometió a prueba la acción de diferentes lacasas sobre la estructura de madera para aclarar su potencial para el pretratamiento de la madera. Se aplicó la misma cantidad de unidades de actividad de una lacasa fúngica de potencial redox alto de *Trametes versicolor* (0,78 V), lacasa CuEO de *Escherichia coli* (0,36 V) y CotA lacasa de *Bacillus subtilis* (0,5 V).

Un análisis microscópico de cortes de virutas de madera pretratadas con esta lacasa reveló que la proteína CotA tiene un efecto distinto y profundo sobre la estructura de madera diferente al producido mediante lacasas fúngicas u otras lacasas bacterianas.

Se observó que las virutas de madera tratadas con CotA lacasa mostraron más y mayores aberturas entre las paredes de fibra que las virutas tratadas con cualquiera de las otras enzimas. Se muestran ejemplos representativos en las Figuras 1 a 6. La Figura 1 muestra una sección de una viruta de madera en el borde de la viruta con grietas en las paredes de fibra primarias (las flechas blancas indican algunas de las grietas). Estas grietas sueltan las fibras entre sí sin dañarlas y por tanto reducen la energía requerida para la producción de pasta, que es esencialmente la separación de fibras entre sí (desfibración). Las grietas también garantizarán que la lignina se vuelve más accesible para otras enzimas o productos químicos de pretratamiento, mejorando de ese modo su eficacia. En la Figura 2 se muestra una sección en el centro de la viruta de madera tratada con una CotA lacasa, mostrando de nuevo grietas sustancialmente deseables en la estructura (las flechas blancas indican algunas de las grietas). Por el contrario, enzimas fúngicas y otras enzimas bacterianas no mostraron este efecto (Figuras 3 - 6), destacando la característica especial de que la CotA es adecuada excepcionalmente para el pretratamiento de la madera en la preparación de pasta de madera para la producción de papel.

En cuanto a la estructura primaria, las lacasas son sumamente diversas. En muchos casos, las lacasas difícilmente pueden tener alguna homología de secuencia significativa con algunos de otros miembros de las oxidasas multicobre. Por ejemplo, el alineamiento de una CotA lacasa de *Bacillus subtilis*, GenBank: BAA22774.1 con lacasa fúngica de *Trametes versicolos* (GenBank: CAA77015) usando el recurso en línea "Blast 2 sequences" (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq) muestra que sólo el 54% de la longitud de secuencia podía alinearse con una identidad en la sección alineada del 22%. El alineamiento de CotA lacasa de *Bacillus subtilis*, GenBank: BAA22774.1 con otra lacasa bacteriana - CuEO de *E. coli* (ZP_03034325.1) mostró sólo una identidad del 29%.

Por el contrario, las propias CotA lacasas representan un grupo de secuencias bastante compacta y bien definido. Se realizó una búsqueda Blast de secuencias en la base de datos de proteínas (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome) que tenían homología con las secuencias preferidas denominadas proteína COT1 (SEQ ID NO: 1) y proteína COT2 (SEQ ID NO: 2) tal como se describe en el presente documento.

Esta búsqueda reveló un grupo de secuencias altamente compacto que muestra una identidad de entre el 98% y el 91% con la secuencia de COT2. Otro grupo de secuencias, que también consistía exclusivamente en lacasas de cubierta de esporas de especies de bacilos, tenía una identidad de entre el 78% y el 82% con la secuencia de COT1.

En el grupo de secuencias con una identidad del 60% o más, todas las secuencias eran proteínas de espora de cubierta de especies de bacilos, productos de genes COTA correspondientes. Por tanto, puede concluirse que CotA no tiene ninguna identidad de secuencia significativa con otras lacasas.

Para el propósito de esta invención, el término "CotA" se define en el presente documento como una proteína aislada con actividad lacasa con una estructura de aminoácido primaria que es idéntica al menos en un 60% a la secuencia según SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, CotA tiene una estructura primaria que es idéntica al menos en un 65% a la secuencia según SEQ ID NO: 2, tal como al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o incluso un 100%.

Tal como se describe en la sección de ejemplos, se pudo mostrar que las virutas de madera tratadas con una proteína de cubierta de espora de *Bacillus subtilis* denominada CotA eran un sustrato superior para la preparación de pasta para la industria de la fabricación de papel. El tratamiento con el polipéptido CotA dio como resultado una disminución deseable de la resistencia del material de pared celular del sustrato de lignocelulosa, de modo que el requisito de energía del proceso disminuyó significativamente. Este era particularmente el caso en un proceso de producción termomecánica de pasta.

Por tanto, la descripción proporciona un método para reducir el requisito de energía de un proceso de producción termomecánica de pasta (TMP), en el que se recuperan fibras de celulosa de una biomasa que comprende material lignocelulósico, en el que el material lignocelulósico se trata con una CotA lacasa antes de recuperar la celulosa del material lignocelulósico.

En otras palabras, se proporciona un método para recuperar fibras de celulosa de una biomasa que comprende material lignocelulósico, en el que el método comprende una etapa en la que la biomasa se calienta hasta una temperatura por encima de 100 grados centígrados y se somete a desfibrado mecánico y en el que la biomasa que comprende material lignocelulósico se pone en contacto con una CotA lacasa antes de calentarla hasta una temperatura por encima de 100 grados centígrados.

Un sustrato particularmente preferido en el método descrito en el presente documento es madera o virutas de madera. Por tanto, se proporciona un método descrito anteriormente, en el que el material lignocelulósico comprende o consiste en madera, una viruta de madera o una viruta de madera desestructurada.

El método descrito anteriormente no sólo redujo la resistencia física de las paredes celulares del material lignocelulósico, sino que también hace que las fibras lignocelulósicas sean más accesibles para otros reactivos. Se encontró que esto era ventajoso en un proceso de TMP particular, concretamente un proceso de producción químico-termomecánica de pasta (CTMP). Por tanto, se proporciona un método descrito anteriormente, en el que el TMP es un proceso de producción químico-termomecánica de pasta (CTMP).

Con referencia a la Figura 7, un proceso de producción químico-termomecánica de pasta difiere de un proceso de TMP, en que se añade al menos una etapa adicional y en que la biomasa que contiene el material lignocelulósico se impregna con una composición química con el fin de degradar al menos parcialmente la lignina.

Más en particular, se proporciona un método descrito anteriormente, que comprende una etapa adicional de tratar la biomasa que comprende los materiales lignocelulósicos con un producto químico antes de someter la biomasa a desfibración. Se prefiere particularmente que el producto químico pueda degradar la lignina.

Con referencia a la Figura 7, el tratamiento con la CotA lacasa puede emplearse en diferentes fases en el proceso. En primer lugar, el material lignocelulósico puede ponerse en contacto con la enzima tras haberse proporcionado en las dimensiones apropiadas, opcionalmente tras la limpieza y la exposición a vapor. Esto se indica con la flecha marcada con (3) en la Figura 7.

Para un proceso en el que el material lignocelulósico es madera, esto significa que la madera se trata descortezarse y cortarse en trozos y seleccionarse por tamaños. Estos trozos se denominan habitualmente virutas de madera. Tales virutas de madera tienen normalmente una dimensión máxima de normalmente del orden de hasta 5 cm, tal como 2, 3 ó 4 cm.

El material lignocelulósico puede ponerse en contacto preferiblemente con la enzima CotA tras lavado y/o exposición a vapor. Esto hace que el material sea más accesible para la enzima y aumenta el contenido de humedad del material. Por tanto, se proporciona un método descrito anteriormente, en el que la madera tiene un contenido de humedad de al menos el 20% y se precalienta hasta una temperatura por debajo de 100 grados centígrados antes de tratar la madera con CotA lacasa.

Sin querer restringirse a la teoría, se concluye en el presente documento que esta etapa de lavado y exposición a vapor aumenta el rendimiento de la enzima, dando como resultado un ahorro de energía en todo el proceso. Esto se indica mediante las flechas 1, 2 y 3 en la Figura 7.

En ciertos procesos, la temperatura de la biomasa o del material lignocelulósico que debe tratarse puede ser superior a la temperatura de inactivación de la enzima. Dado que una temperatura alta puede inactivar las enzimas desnaturalizando su cadena de aminoácidos, la enzima puede añadirse ventajosamente a la biomasa en un punto por debajo de la temperatura de inactivación de la enzima. Las enzimas pueden añadirse dentro del/de los intervalo(s) de temperatura funcional o a la(s) temperatura(s) óptima(s) de la enzima. En el caso de biomazas con una temperatura alta, las enzimas pueden añadirse tras haberse enfriado la biomasa por debajo de la temperatura de inactivación y de que el proceso enzimático se haya completado suficientemente antes de que la temperatura haya caído por debajo de la temperatura funcional óptima de la enzima. Naturalmente, también es una opción mantener una temperatura deseada enfriando o calentando la biomasa o el material lignocelulósico. La adición de un líquido de dilución, tal como agua a una cierta temperatura, puede usarse para enfriar la biomasa.

El proceso de pretratamiento enzimático puede realizarse a una temperatura específica tal como, por ejemplo, a de 30 grados C a 80 grados centígrados; de 40 grados C a 70 grados C; o de 45 grados C a 60 grados C, tal como 50 grados C o temperatura ambiente o inferior.

El contacto de la biomasa con una enzima puede realizarse durante un periodo de tiempo de hasta un día. Aunque son posibles digestiones enzimáticas más largas, puede usarse un periodo de tiempo más corto tal como 15 min, 60 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas o cualquier tiempo inferior a estos valores cualquier tiempo entre dos cualquiera de estos valores, por motivos prácticos o económicos. Las digestiones enzimáticas pueden durar 50, 100, 150 ó 200 horas o cualquier tiempo inferior a estos valores o cualquier tiempo entre dos cualquiera de estos valores. Véase, por ejemplo, la sección de ejemplos. Un periodo preferido de contacto enzimático es de aproximadamente 3 días o menos.

El pretratamiento con CotA también emplearse ventajosamente antes o después de una etapa adicional de tratamiento mecánico denominado habitualmente tratamiento mecánico de baja energía (flecha 2). Por tanto, se proporciona un método descrito anteriormente, en el que el tratamiento con CotA lacasa se realiza tras lavar y

exponer a vapor la biomasa que comprende material lignocelulósico y antes o después de una etapa de tratamiento mecánico de baja energía, pero antes de la etapa de refinado.

5 En procesos de CTMP, la enzima CotA se añade preferiblemente durante o después de la etapa de impregnación química para actuar conjuntamente con otros productos químicos o enzimas, siempre que estos productos químicos y/o enzimas no interfieran con la actividad lacasa. En este caso, se proporciona un método descrito anteriormente, en el que el tratamiento con CotA lacasa se realiza durante o después de la etapa de impregnación química y preferiblemente continúa tras la etapa de impregnación.

10 En procesos de CTMP, el tratamiento con CotA se realiza antes de tratar el material lignocelulósico con productos químicos que disuelven la lignina. En este caso, se proporciona un método descrito anteriormente, en el que el tratamiento con CotA lacasa se realiza tras lavar y exponer a vapor la biomasa que comprende material lignocelulósico, pero antes del tratamiento con los productos químicos.

15 El material de desecho lignocelulósico también puede tratarse tras la etapa de refinado. El material lignocelulósico residual, que no estaba suficientemente refinado (desecho), se alimenta habitualmente al circuito de manipulación de desecho para otra operación de refinado (flecha 4 en la Figura 7). Tal como se describe en el presente documento, este denominado material de desecho puede tratarse ventajosamente con CotA antes de alimentarse a la fase de refinado de desechos (Figura 7). Por tanto, se proporciona un método descrito anteriormente, en el que la biomasa que comprende un material lignocelulósico es pasta de desecho.

20 La descripción también proporciona enzimas y métodos nuevos y mejorados para su uso. Por tanto, se proporciona un método descrito anteriormente, en el que la CotA lacasa tiene una estructura de aminoácido primaria que es idéntica al menos en un 60% a la secuencia de COT1 (SEQ ID NO:1) o COT2 (SEQ ID NO:2). La CotA lacasa puede ser COT1 (SEQ ID NO:1) o COT2 (SEQ ID NO:2).

25 La descripción también proporciona un ácido nucleico aislado que codifica para una proteína que tiene actividad lacasa y una secuencia de aminoácidos primaria que tiene una identidad de al menos el 93% con la secuencia de COT1 (SEQ ID NO:1) o COT2 (SEQ ID NO:2).

30 La descripción también proporciona un polipéptido aislado que tiene actividad lacasa codificado por una secuencia de ADN aislada tal como se describió anteriormente. a la descripción también proporciona un polipéptido aislado que tiene actividad lacasa con una secuencia de aminoácidos primaria que tiene una identidad de al menos el 60% con la secuencia de COT1 (SEQ ID NO:1) o COT2 (SEQ ID NO:2).

35 También se proporciona en el presente documento un material lignocelulósico, en particular virutas de madera que comprenden un polipéptido aislado o un ácido nucleico aislado tal como se describe en el presente documento.

40 El experto en la técnica conocerá como obtener CotA lacasas para su uso en los métodos descritos en el presente documento. Las lacasas se han descrito abundantemente y su estructura de aminoácido primaria está disponible públicamente. Pueden aislarse de fuentes naturales o prepararse mediante técnicas de ADN recombinantes convencionales. La dosificación puede determinarse fácilmente mediante métodos de ensayo y error para un entorno dado en una operación de molino de pasta tradicional.

45 **Leyenda de las figuras**

La Figura 1 muestra una imagen de microscopía ESEM de una sección en el borde de una viruta de madera tratada con CotA lacasa.

50 La Figura 2 muestra una imagen de microscopía ESEM de una sección en el centro de una viruta de madera tratada con CotA lacasa.

La Figura 3 muestra una imagen de microscopía ESEM de una sección en el borde de una viruta de madera tratada con una lacasa fúngica de *Trametes versicolor*.

55 La Figura 4 muestra una imagen de microscopía ESEM de una sección en el centro de una viruta de madera tratada con una lacasa fúngica de *Trametes versicolor*.

60 La Figura 5 muestra una imagen de microscopía ESEM de una sección en el borde de una viruta de madera tratada con una lacasa CuEO de *Escherichia coli*.

La Figura 6 muestra una imagen de microscopía ESEM de una sección en el centro de una viruta de madera tratada con una lacasa CuEO de *Escherichia coli*.

65 Figura 7 Diagrama de fabricación de pasta. Las flechas macizas indican las posiciones en el proceso en las que el tratamiento con CotA lacasa es beneficioso para ahorrar energía. El término virutas tamizadas significa que las

virutas se seleccionan para el tamaño apropiado y deseado. El lavado significa que se limpian con agua para eliminar el polvo y la suciedad no deseados. La exposición a vapor significa que las virutas se someten a vapor. La figura muestra tres etapas de pretratamiento diferentes. En primer lugar (posición marcada con (3)), el pretratamiento consiste en poner en contacto la biomasa que contiene lignocelulosa con una CotA lacasa (flecha maciza gris). En segundo lugar, el pretratamiento puede consistir en poner en contacto la biomasa que contiene lignocelulosa con una CotA lacasa antes o después del tratamiento mecánico de baja energía (posición marcada con (2)). En tercer lugar, el pretratamiento puede consistir en poner en contacto la biomasa que contiene lignocelulosa con una CotA lacasa antes o después de la impregnación, por ejemplo con un reactivo químico o un reactivo biológico tal como una enzima. Por medio de una etapa de exposición a vapor opcional, la biomasa que contiene la lignocelulosa se alimenta entonces a la fase de refinado, en la que la biomasa se calienta entonces hasta una temperatura por encima de 100 grados centígrados y se refina, es decir se somete a desfibrado mecánico. Tras la etapa de refinado, la pasta resultante se tamiza para dar el material lignocelulósico residual, en el que las fibras de madera no se separaron suficientemente. Ese material (desecho) se alimenta entonces al proceso de refinado de desechos. CotA puede aplicarse ventajosamente a la pasta de desecho con el fin de ahorrar energía en el proceso de refinado de desechos.

Figura 8: Curvas de energía (grado de libertad de la pasta representado frente al consumo de energía específico) del experimento de refinado (ejemplo 2).

El gráfico muestra un desplazamiento de la línea de energía a la izquierda (o hacia abajo) en las muestras tratadas con COTA lacasa, lo que significa que se consigue el ahorro de energía. En otras palabras, puede obtenerse el mismo grado de libertad (tal como se toma por ejemplo en este caso a 300 ml, indicado en la figura mediante una línea horizontal) con menos energía. Las curvas corresponden a las siguientes muestras 1-*Trametes versicolor* (0,05 u/ml), 2 - referencia, 3- *Trametes versicolor* (0,1 u/ml), 4 - COT1 (0,05 u/ml), 5 - COT2 (0,05 u/ml), 6 - COT2 (0,1 u/ml), 7 -COT1 (0,1 u/ml)

Ejemplos

Ejemplo 1: Microscopía

Se lavaron virutas de madera de 50 g de contenido en materia seca (DMC) con un tamaño máximo de entre 35 mm y 40 mm mm para eliminar la suciedad residual, y se trataron después con vapor durante 10 minutos. Entonces se equilibraron las virutas hasta 50 grados C, se colocaron en un dispositivo cilíndrico con una prensa. Se aplicó presión mecánica desde la parte superior 63,5 kPa/cm², hasta que la capa de virutas tenía la mitad de la altura original. Se drenó cualquier líquido que salía de las virutas a través de pequeños agujeros en la parte inferior del cilindro. Después de esto, se liberó lentamente la presión y se alimentó la disolución de enzima desde la parte inferior del cilindro. La disolución de enzima contenía 1 unidad/ml de una de las enzimas lacasa (tal como se indica) en ácido succínico 20 mM pH 5,0. Una unidad catalítica se define como la cantidad de enzima necesaria para convertir 1 micromol de sustrato (ABTS) en 1 min.

Se usaron las siguientes lacasas en el presente documento: (1) proteína de cubierta de esporas CotA de *Bacillus subtilis* (COT2 (SEQ ID NO:2, expresada recombinantemente en *E. coli*), (2) lacasa fúngica disponible comercialmente de hongos de podredumbre blanca *Trametes versicolor* (disponibles de Sigma-Aldrich), y (3) lacasa de *E. coli* denominada CUEO, expresada recombinantemente en *E. coli*.

Aproximadamente 30 ml de esta disolución se absorbieron mediante las virutas. Se drenó cualquier disolución residual. Entonces se colocaron estas virutas en un recipiente sellado para impedir la evaporación y se incubaron durante 2 horas. Se incubaron muestras con lacasas COT2 y CUEO a su temperatura óptima, es decir 70 grados centígrados, se incubó una muestra con lacasa de *Trametes versicolor* a 50 grados centígrados dado que la lacasa de *Trametes versicolor* se inactivaría rápidamente a 70 grados centígrados.

De cada muestra se extrajeron cuatro virutas y se cortaron aproximadamente en el centro. Entonces se seccionó manualmente la superficie de corte mediante una cuchilla y se dejó secar a temperatura ambiente.

Se obtuvieron imágenes de las secciones transversales de las virutas usando un instrumento Philips XL30 ESEM-FEG (Environmental Scanning Electron Microscope-Field Emission Gun). Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: modelo de bajo vacío, 0,7 mbar de presión en la cámara de muestra, detector BSE (electrones retrodispersados) y un voltaje de aceleración de 15 kV. Los aumentos usados fueron 200x, 250x, 500x y 1000x.

Ejemplo 2: Ahorro de energía en TMP

Se realizaron una serie de experimentos de refinado a escala de laboratorio con el fin de evaluar el efecto del pretratamiento con lacasa sobre la energía de refinado.

Se impregnaron virutas de madera tamizadas con un tamaño máximo promedio de aproximadamente 40 mm con una disolución que contenía una cualquiera de dos CotA lacasas (COTA lacasas (COT1 y COT2, SEQ ID NO: 1 y

SEQ ID NO: 2 resp.) o una lacasa fúngica obtenida comercialmente de hongos de podredumbre blanca *Trametes versicolor* (disponible de Sigma-Aldrich).

5 La impregnación de virutas de madera se realizó en porciones de 50 g de DMC tal como se describe en el ejemplo 1, con la excepción de que se usaron dos concentraciones de disolución de impregnación; 0,1 u/ml o 0,5 u/ml de lacasa en ácido succínico 20 mM pH 5. La muestra de referencia se impregnó con la misma disolución sin lacasa.

10 Se produjeron tres porciones de 50 gramos (DMC) de virutas impregnadas con cada dosificación de cada lacasa. Tras la impregnación, las porciones tratadas con la misma enzima se combinaron para dar una única muestra de 150 gramos de DMC.

15 Entonces se colocaron las virutas impregnadas en un recipiente sellado para impedir la evaporación y se incubaron durante 1 hora. Las muestras con COTA lacasas se incubaron a su temperatura óptima, es decir 70 grados centígrados, la muestra con lacasa de *Trametes versicolor* se incubó a 50 grados centígrados dado que la lacasa de *Trametes versicolor* se inactivaría rápidamente a 70 grados centígrados.

20 Las virutas de madera tratadas descritas anteriormente se repartieron en lotes de 125 g de DMC y se refinaron en un refinador de aletas de baja intensidad que comprende una cámara desfibradora de aletas. La cámara desfibradora de aletas consistía en dos palas giratorias que giran en direcciones axiales opuestas. Una estructura cilíndrica de 20 palas giraba a una distancia de 1 mm de las 4 palas giratorias de tipo aleta.

25 Se calentó el refinador y se usaron tres series vacías como blanco. La temperatura de exposición a vapor era de $124^{\circ}\text{C} \pm 0,6^{\circ}\text{C}$. Las virutas de madera se expusieron a vapor durante 5 minutos, durante los cuales las 4 palas de tipo aleta se giraron 90° cada 1,25 minutos para calentar las virutas uniformemente. Tras 2 minutos de exposición a vapor se dejó salir el condensado durante 10 segundos. Tras 4 minutos y 50 segundos de exposición a vapor, se cerró la válvula, se puso a cero el pulsómetro y se inició la serie tras 5 minutos de exposición a vapor. Los experimentos se realizaron durante 2, 4, 6 y 8 minutos de refinado. Cuando había transcurrido el tiempo, se detuvo el experimento directamente cuando el pulsómetro cambió de valor. La presión en la cámara era de 1,9 - 2,6 bar y la temperatura aumentaba de aproximadamente 124°C a 136°C , dependiendo de durante cuánto tiempo se continuó con el experimento. Todos los ensayos enzimáticos se realizaron de manera única, así como durante 2, 6, y 8 minutos para la referencia. Los 4 minutos de refinado para la referencia se ejecutaron 4 veces.

35 Tras el refinado, las pastas se centrifugaron y se midieron para determinar el contenido de materia seca DMC (según SCAN-C 3:78) y se determinó el grado de libertad con un instrumento de prueba Canadian Standard Freeness. Los resultados se muestran en la tabla 1. La cantidad total de energía consumida se representó frente al grado de libertad (Figura 8) y se calcularon líneas de tendencia para la referencia, COT1, COT2 y *Trametes versicolor* ($R = 0,99; 0,97; 0,99; \text{ y } 0,99$ respectivamente). El consumo de energía se comparó a niveles constantes de grado de libertad (300 ml).

40 La lacasa fúngica no tuvo ningún efecto significativo de consumo de energía en este experimento de refinado. Por el contrario, las muestras de COT1 y COT2 mostraron una reducción significativa muy similar en el consumo de energía de aproximadamente el 7-8 % para una dosificación de 0,05 u/ml y del 13-15% para una dosificación de 0,1 u/ml. Estos valores de ahorro de energía son sumamente relevantes a nivel industrial y considerando la baja dosificación de enzima, esto puede considerarse de alta importancia comercial.

45 Tabla 1: Energía de refinado a 300 ml de grado de libertad de muestras de referencia y tratadas con lacasa.

| Curva n.º | Muestra | SEC a 300 ml de grado de libertad | Ahorro de energía (%) |
|-----------|------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| 2 | Referencia | 1,73 | 0 |
| 1 | Tv* (0,05 u/ml) | 1,75 | -0,61 |
| 3 | Tv (0,1 u/ml) | 1,74 | 0,10 |
| 4 | COT1 (0,05 u/ml) | 1,62 | 6,8 |
| 7 | COT1 (0,1 u/ml) | 1,47 | 14,9 |
| 5 | COT2 (0,05 u/ml) | 1,59 | 8,3 |
| 6 | COT2 (0,1 u/ml) | 1,50 | 13,2 |

*Tv = lacasa de *Trametes versicolor*.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> MetGen Oy

5 <120> Método para ahorrar energía en la producción de papel

<130> 254 WOP0

<160> 2

10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 513

15

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 1

Met Thr Leu Glu Lys Phe Val Asp Ala Leu Pro Ile Pro Asp Thr Leu
1 5 10 15

Lys Pro Val Gln Gln Thr Thr Glu Lys Thr Tyr Tyr Glu Val Thr Met
20 25 30

Glu Glu Cys Ala His Gln Leu His Arg Asp Leu Pro Pro Thr Arg Leu
35 40 45

Trp Gly Tyr Asn Gly Leu Phe Pro Gly Pro Thr Ile Glu Val Lys Arg
50 55 60

Asn Glu Asn Val Tyr Val Lys Trp Met Asn Asn Leu Pro Ser Glu His
65 70 75 80

Phe Leu Pro Ile Asp His Thr Ile His His Ser Asp Ser Gln His Glu
85 90 95

Glu Pro Glu Val Lys Thr Val Val His Leu His Gly Gly Val Thr Pro
100 105 110

Asp Asp Ser Asp Gly Tyr Pro Glu Ala Trp Phe Ser Lys Asp Phe Glu
115 120 125

Gln Thr Gly Pro Tyr Phe Lys Arg Glu Val Tyr His Tyr Pro Asn Gln
130 135 140

Gln Arg Gly Ala Ile Leu Trp Tyr His Asp His Ala Met Ala Leu Thr
145 150 155 160

20

Arg Leu Asn Val Tyr Ala Gly Leu Val Gly Asp Tyr Ile Ile His Asp
165 170 175

ES 2 653 239 T3

Pro Lys Glu Lys Arg Leu Lys Leu Pro Ser Gly Glu Tyr Asp Val Pro
 180 185 190

Leu Leu Ile Thr Asp Arg Thr Ile Asn Glu Asp Gly Ser Leu Phe Tyr
 195 200 205

Pro Ser Gly Pro Glu Asn Pro Ser Pro Ser Leu Pro Lys Pro Ser Ile
 210 215 220

Val Pro Ala Phe Cys Gly Asp Thr Ile Leu Val Asn Gly Lys Val Trp
 225 230 235 240

Pro Tyr Leu Glu Val Glu Pro Arg Lys Tyr Arg Phe Arg Val Ile Asn
 245 250 255

Ala Ser Asn Thr Arg Thr Tyr Asn Leu Ser Leu Asp Asn Gly Gly Glu
 260 265 270

Phe Ile Gln Ile Gly Ser Asp Gly Gly Leu Leu Pro Arg Ser Val Lys
 275 280 285

Leu Asn Ser Phe Ser Leu Ala Pro Ala Glu Arg Tyr Asp Ile Ile Ile
 290 295 300

Asp Phe Thr Ala Tyr Glu Gly Glu Ser Ile Ile Leu Ala Asn Ser Glu
 305 310 315 320

Gly Cys Gly Gly Asp Ala Asn Pro Glu Thr Asp Ala Asn Ile Met Gln
 325 330 335

Phe Arg Val Thr Lys Pro Leu Ala Gln Lys Asp Glu Ser Arg Lys Pro
 340 345 350

Lys Tyr Leu Ala Ser Tyr Pro Ser Val Gln Asn Glu Arg Ile Gln Asn
 355 360 365

Ile Arg Thr Leu Lys Leu Ala Gly Thr Gln Asp Glu Tyr Gly Arg Pro
 370 375 380

Val Leu Leu Leu Asn Asn Lys Arg Trp His Asp Pro Val Thr Glu Ala
 385 390 395 400

Pro Lys Ala Gly Thr Thr Glu Ile Trp Ser Ile Val Asn Pro Thr Gln
 405 410 415

Gly Thr His Pro Ile His Leu His Leu Val Ser Phe Arg Val Leu Asp
 420 425 430

ES 2 653 239 T3

Arg Arg Pro Phe Asp Ile Ala Arg Tyr Gln Glu Arg Gly Glu Leu Ser
 435 440 445

Tyr Thr Gly Pro Ala Val Pro Pro Pro Ser Glu Lys Gly Trp Lys
 450 455 460

Asp Thr Ile Gln Ala His Ala Gly Glu Val Leu Arg Ile Ala Val Thr
 465 470 475 480

Phe Gly Pro Tyr Ser Gly Arg Tyr Val Trp His Cys His Ile Leu Glu
 485 490 495

His Glu Asp Tyr Asp Met Met Arg Pro Met Asp Ile Thr Asp Pro His
 500 505 510

Lys

<210> 2

<211> 539

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 2

Met Thr Leu Glu Lys Phe Val Asp Ala Leu Pro Ile Pro Asp Thr Leu
 1 5 10 15

Lys Pro Val Gln Gln Ser Lys Glu Lys Thr Tyr Tyr Glu Val Thr Met
 20 25 30

Glu Glu Cys Thr His Gln Leu His Arg Asp Leu Pro Pro Thr Arg Leu
 35 40 45

Trp Gly Tyr Asn Gly Leu Phe Pro Gly Pro Thr Ile Glu Val Lys Arg
 50 55 60

Asn Glu Asn Val Tyr Val Lys Trp Met Asn Asn Leu Pro Ser Thr His
 65 70 75 80

Phe Leu Pro Ile Asp His Thr Ile His His Ser Asp Ser Gln His Glu
 85 90 95

Glu Pro Glu Val Lys Thr Val Val His Leu His Gly Gly Val Thr Pro
 100 105 110

Asp Asp Ser Asp Gly Tyr Pro Glu Ala Trp Phe Ser Lys Asp Phe Glu
 115 120 125

5

10

ES 2 653 239 T3

Gln Thr Gly Pro Tyr Phe Lys Arg Glu Val Tyr His Tyr Pro Asn Gln
 130 135 140

Gln Arg Gly Ala Ile Leu Trp Tyr His Asp His Ala Met Ala Leu Thr
 145 150 155 160

Arg Leu Asn Val Tyr Ala Gly Leu Val Gly Ala Tyr Ile Ile His Asp
 165 170 175

Pro Lys Glu Lys Arg Leu Lys Leu Pro Ser Glu Glu Tyr Asp Val Pro
 180 185 190

Leu Leu Ile Thr Asp Arg Thr Ile Asn Glu Asp Gly Ser Leu Phe Tyr
 195 200 205

Pro Ser Gly Pro Glu Asn Pro Ser Pro Ser Leu Pro Asn Pro Ser Ile
 210 215 220

Val Pro Ala Phe Cys Gly Glu Thr Ile Leu Val Asn Gly Lys Val Trp
 225 230 235 240

Pro Tyr Leu Glu Val Glu Pro Arg Lys Tyr Arg Phe Arg Val Ile Asn
 245 250 255

Ala Ser Asn Thr Arg Thr Tyr Asn Leu Ser Leu Asp Asn Gly Gly Glu
 260 265 270

Phe Ile Gln Ile Gly Ser Asp Gly Gly Leu Leu Pro Arg Ser Val Lys
 275 280 285

Leu Thr Ser Phe Ser Leu Ala Pro Ala Glu Arg Tyr Asp Ile Ile Ile
 290 295 300

Asp Phe Thr Ala Tyr Glu Gly Gln Ser Ile Ile Leu Ala Asn Ser Ala
 305 310 315 320

Gly Cys Gly Gly Asp Val Asn Pro Glu Thr Asp Ala Asn Ile Met Gln
 325 330 335

Phe Arg Val Thr Lys Pro Leu Ala Gln Lys Asp Glu Ser Arg Lys Pro
 340 345 350

Lys Tyr Leu Ala Ser Tyr Pro Ser Val Gln Asn Glu Arg Ile Gln Asn
 355 360 365

Ile Arg Thr Leu Lys Leu Ala Gly Thr Gln Asp Glu Tyr Gly Arg Pro
 370 375 380

ES 2 653 239 T3

Val Leu Leu Leu Asn Asn Lys Arg Trp His Asp Pro Val Thr Glu Ala
 385 390 395 400

Pro Lys Ala Gly Thr Thr Glu Ile Trp Ser Ile Ile Asn Pro Thr Arg
 405 410 415

Gly Thr His Pro Ile His Leu His Leu Val Ser Phe Arg Val Ile Asp
 420 425 430

Arg Arg Pro Phe Asp Ile Ala His Tyr Gln Glu Ser Gly Ala Leu Ser
 435 440 445

Tyr Thr Gly Pro Ala Val Pro Pro Pro Pro Ser Glu Lys Gly Trp Lys
 450 455 460

Asp Thr Ile Gln Ala His Ala Gly Glu Val Leu Arg Ile Ala Ala Thr
 465 470 475 480

Phe Gly Pro Tyr Ser Gly Arg Tyr Val Trp His Cys His Ile Leu Glu
 485 490 495

His Glu Asp Tyr Asp Met Met Arg Pro Met Asp Ile Thr Asp Pro His
 500 505 510

Lys Ser Asp Pro Asn Ser Ser Ser Val Asp Lys Leu His Arg Thr Arg
 515 520 525

Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Arg Ser Gly Cys
 530 535

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Método para recuperar celulosa a partir de una biomasa que comprende material lignocelulósico, que comprende las etapas de calentar la biomasa hasta una temperatura por encima de 100 grados centígrados y someterla a desfibrado mecánico, caracterizado porque la biomasa que comprende material lignocelulósico se trata con una CotA lacasa antes de calentarla hasta una temperatura por encima de 100 grados centígrados.
- 10 2.- Método según la reivindicación 1, en el que el material lignocelulósico comprende o consiste en madera.
- 3.- Método según la reivindicación 2, en el que la madera es una viruta de madera.
- 4.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en el que la madera es una viruta de madera desestructurada.
- 15 5.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4, que comprende una etapa adicional de tratar la biomasa que comprende los materiales lignocelulósicos con una composición química antes de desfibrar la biomasa.
- 6.- Método según la reivindicación 5, en el que el producto químico puede degradar la lignina
- 20 7.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 – 6, en el que la madera tiene un contenido de humedad de al menos el 20% y se precalienta hasta una temperatura por debajo de 100 grados centígrados antes de tratar la madera con CotA lacasa.
- 25 8.- Método según la reivindicación 7, en el que la madera se precalienta hasta una temperatura por debajo de la temperatura de inactivación de la CotA lacasa.
- 9.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en el que el tratamiento con CotA lacasa se realiza tras una etapa de tratamiento mecánico de baja energía antes de desfibrarse.
- 30 10.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, que comprende además una etapa de impregnación en la que la biomasa que comprende material lignocelulósico se pone en contacto con una composición química o una enzima antes o después de poner en contacto la biomasa con la CotA lacasa.
- 35 11.- Método según la reivindicación 1, en el que la biomasa que comprende un material lignocelulósico es pasta de desecho.
- 40 12.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 – 11, en el que la CotA lacasa tiene una estructura de aminoácido primaria que es idéntica al menos en un 60% a la secuencia de COT1 (SEQ ID NO:1) o COT2 (SEQ ID NO: 2).
- 13.- Método según la reivindicación 12, en el que CotA es COT1 (SEQ ID NO: 1) o COT2 (SEQ ID NO: 2).

Figura 1

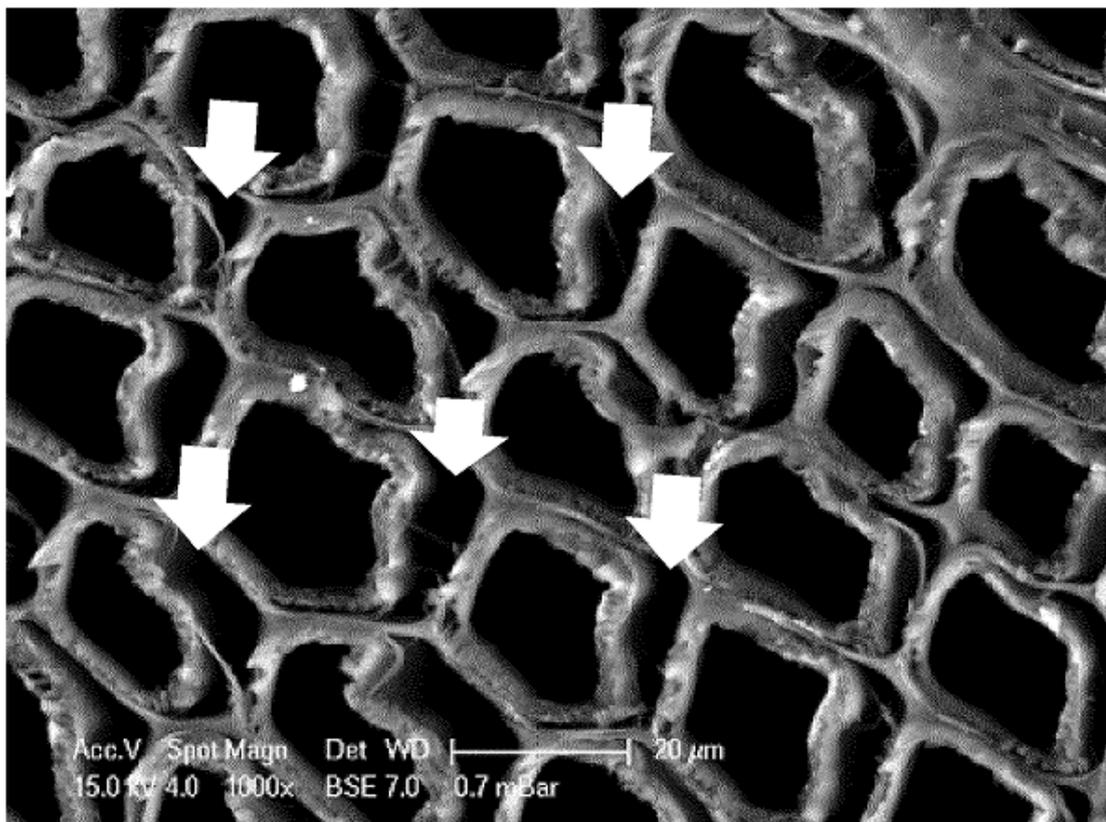
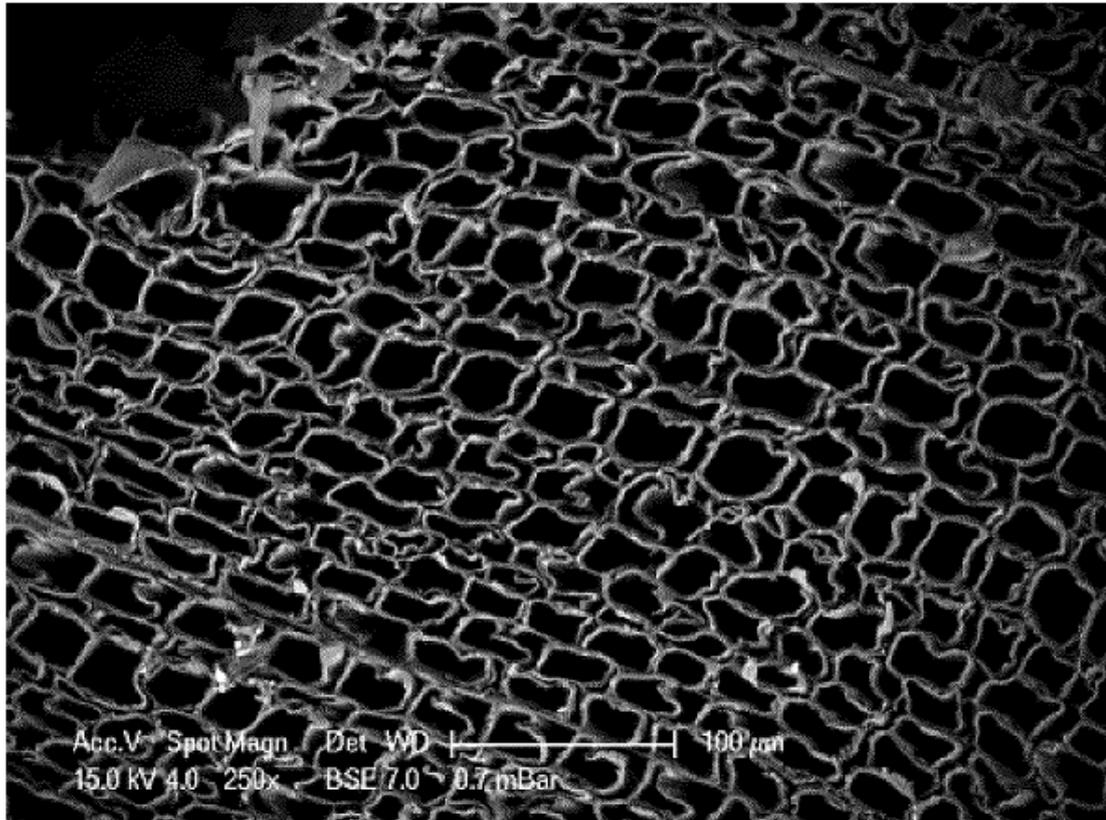


Figura 2

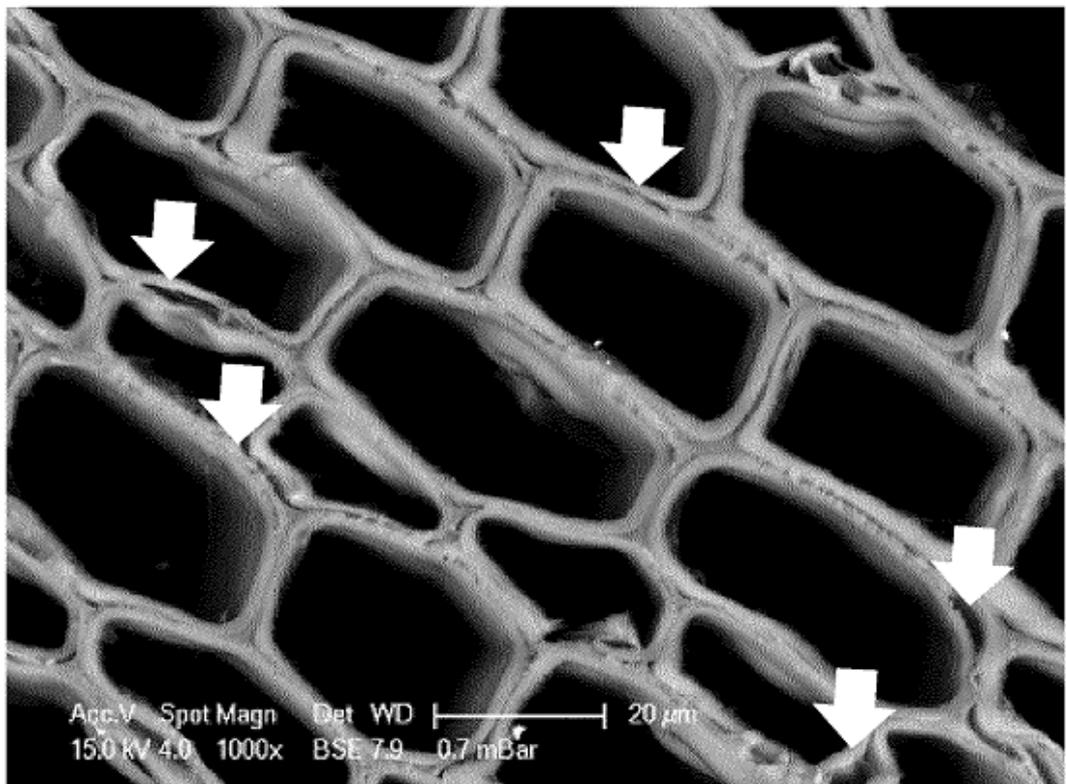
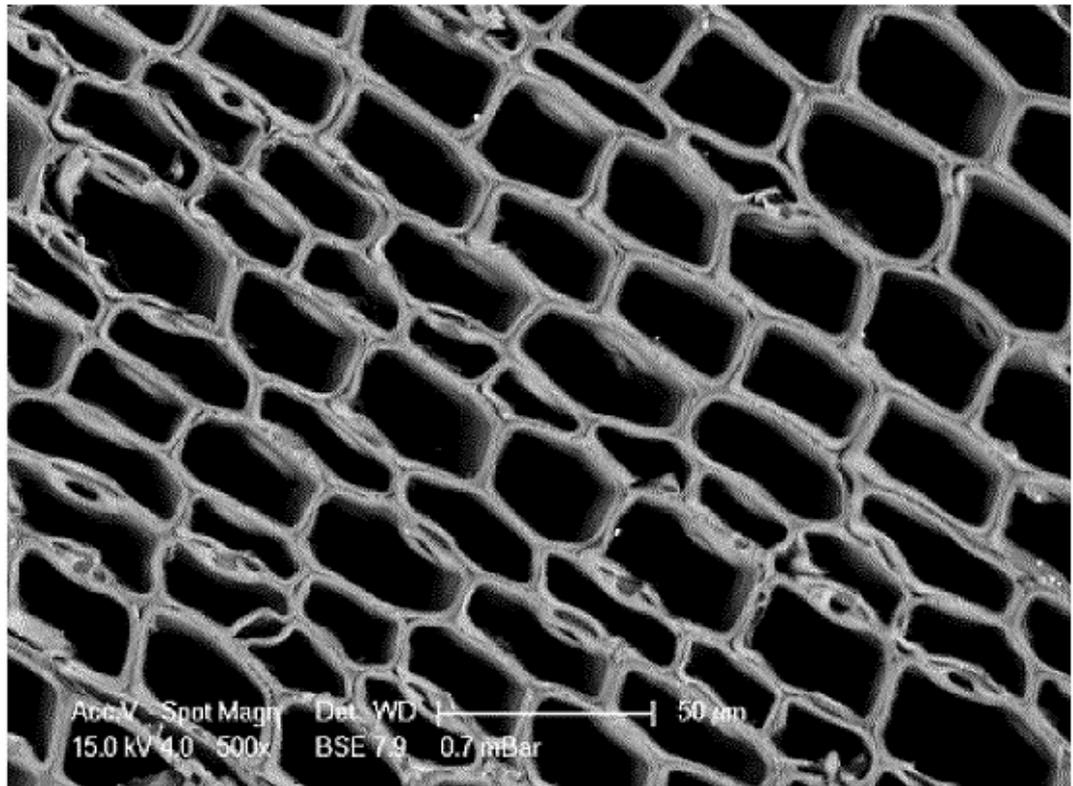


Figura 3

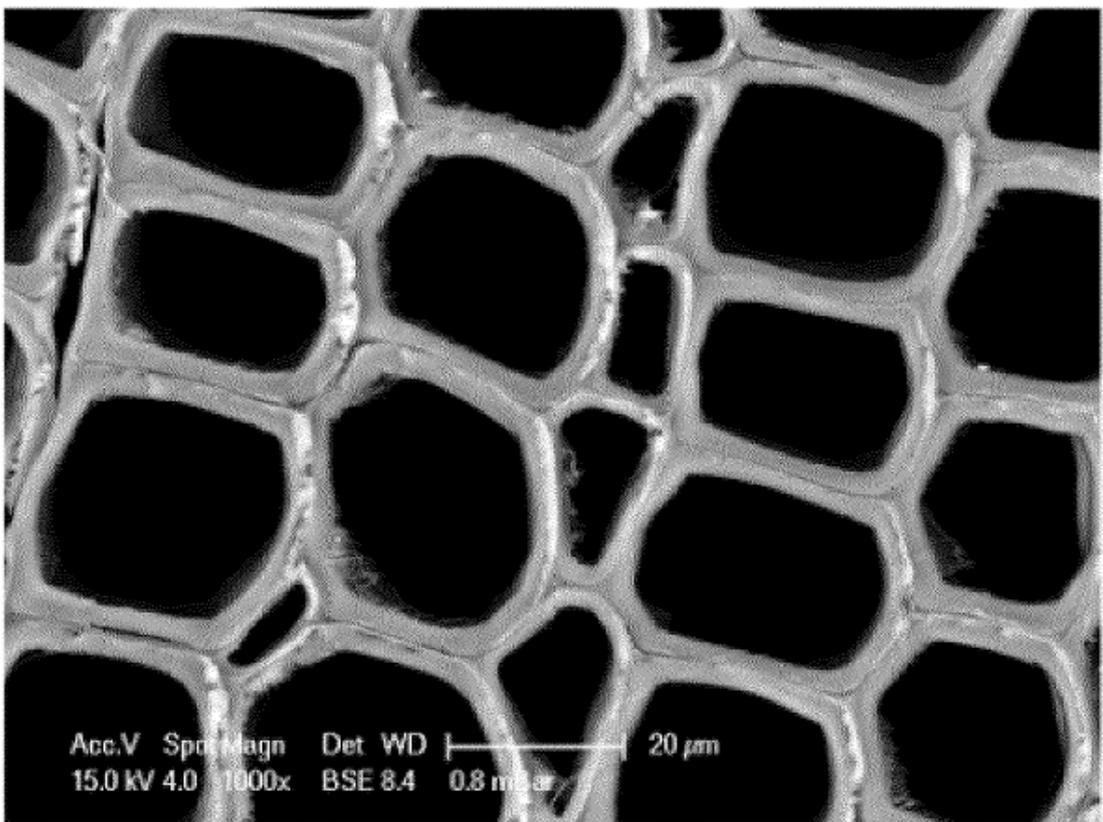
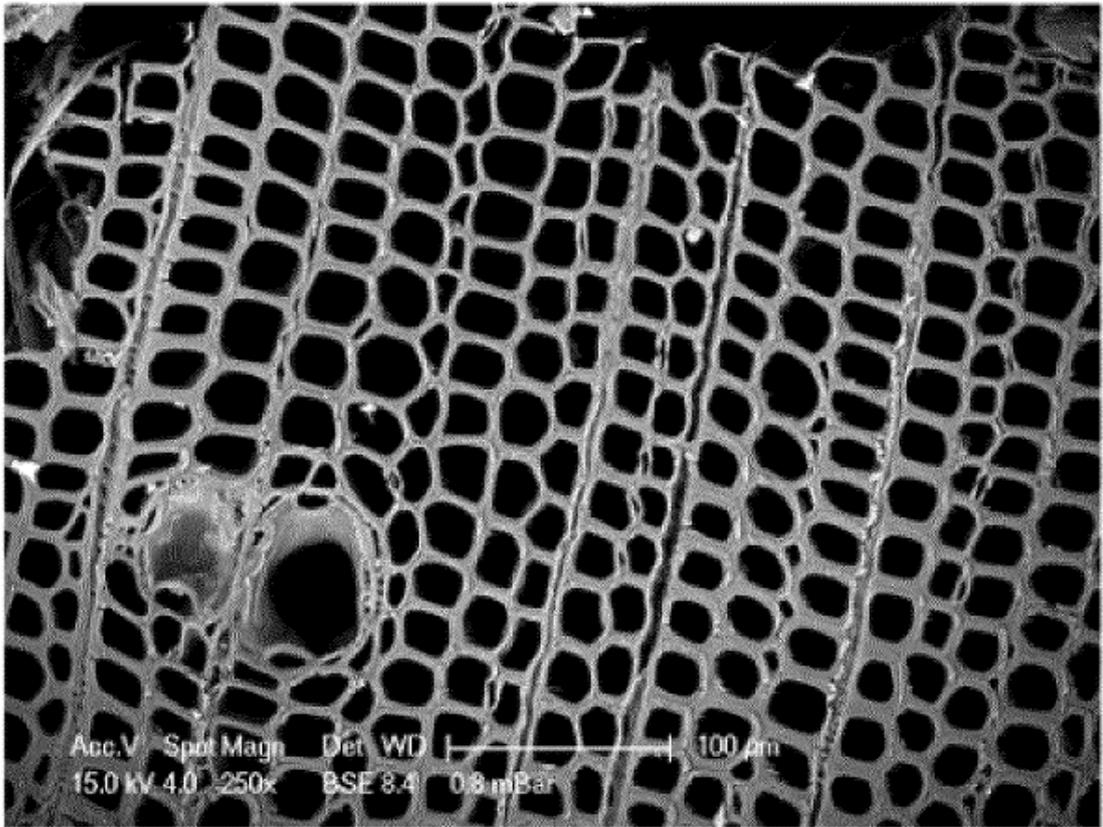


Figura 4

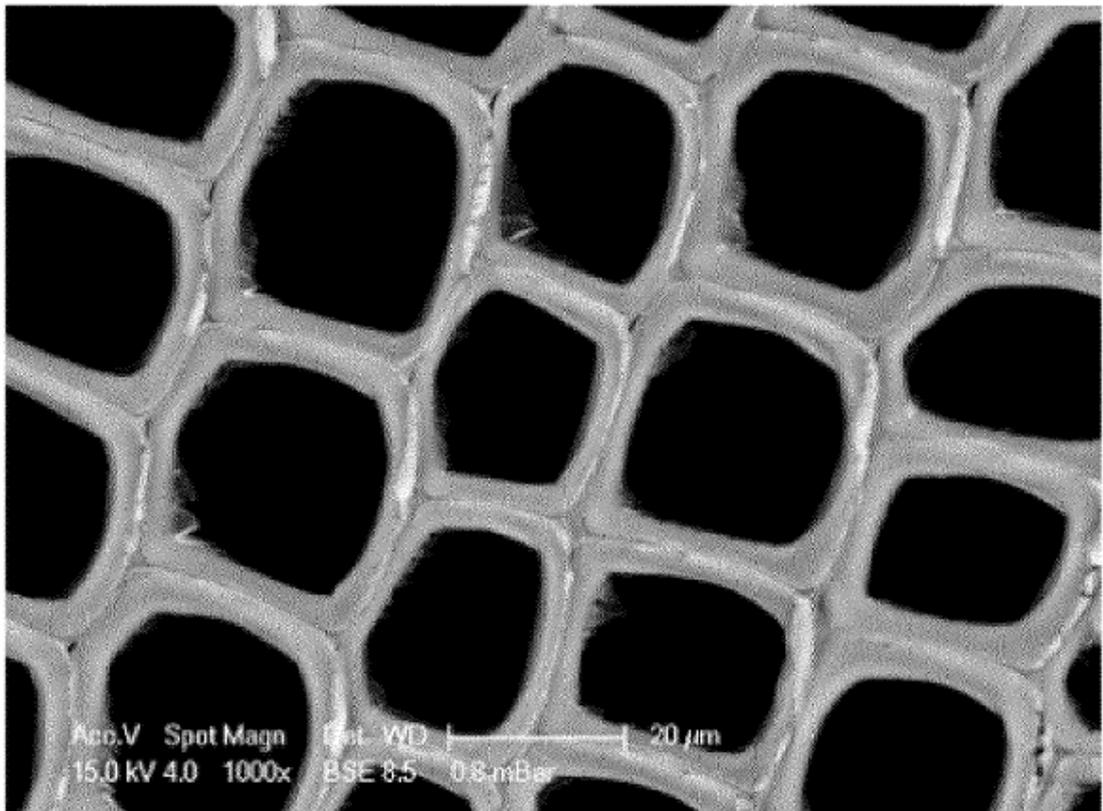
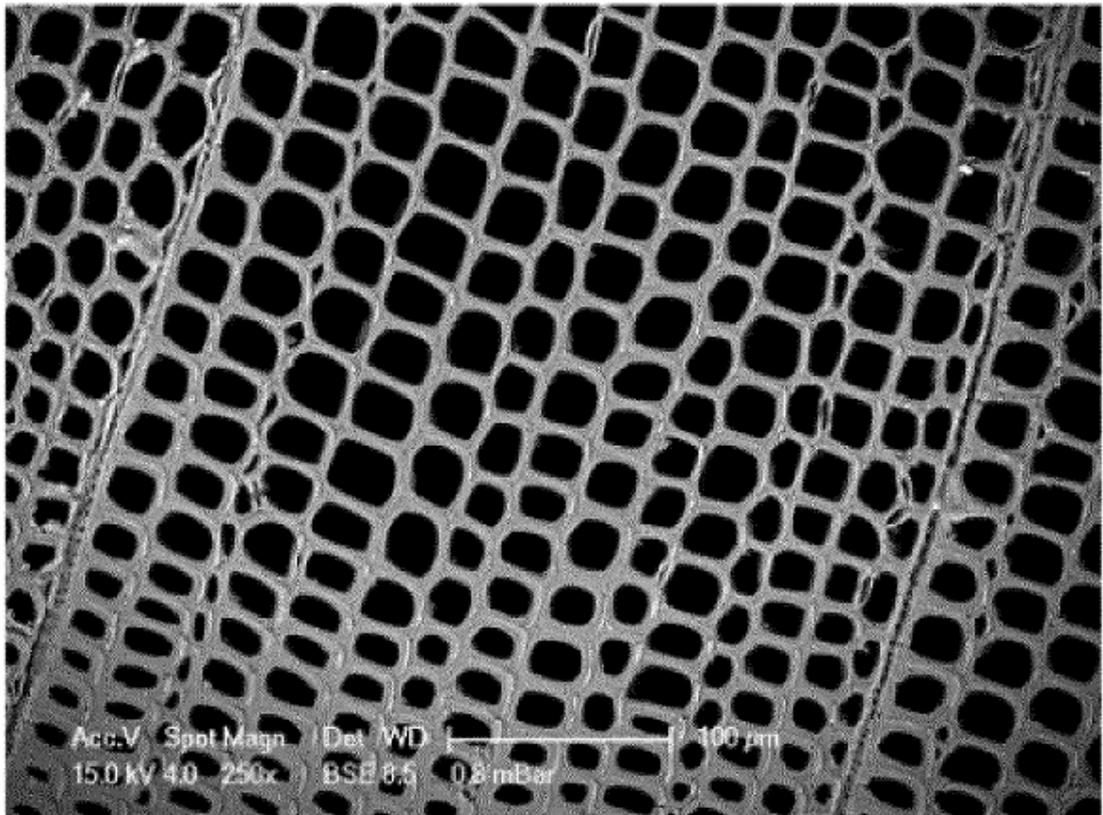


Figura 5

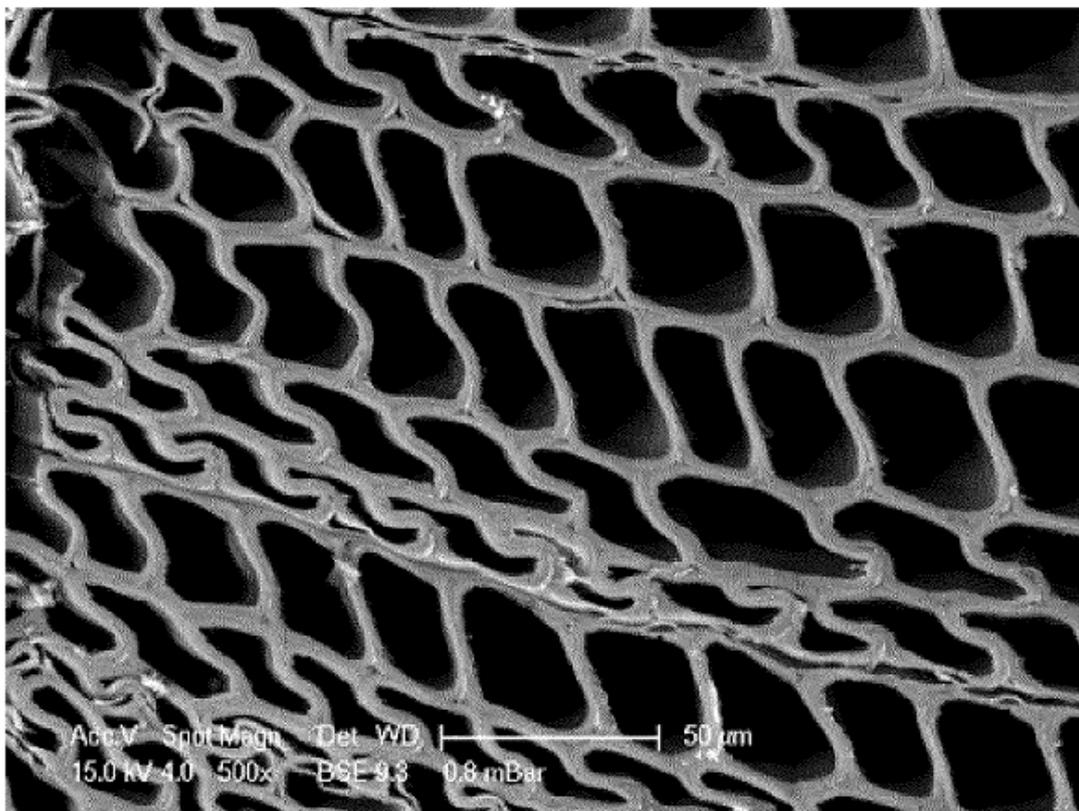


Figura 6

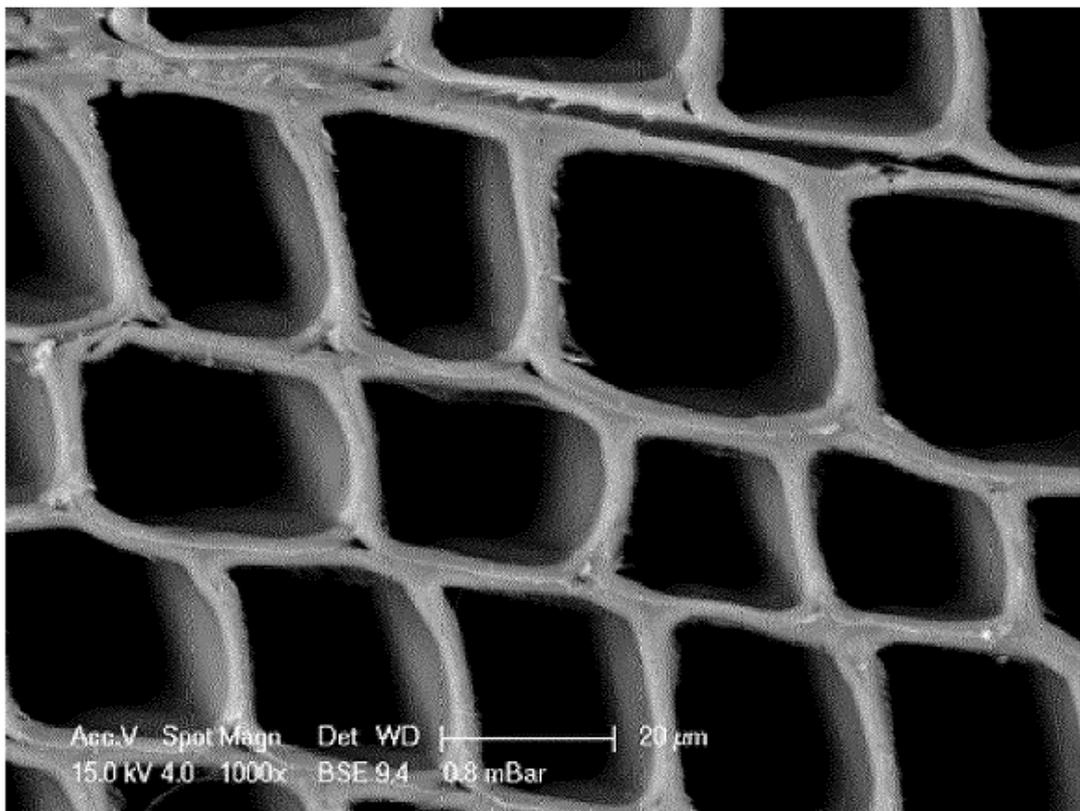
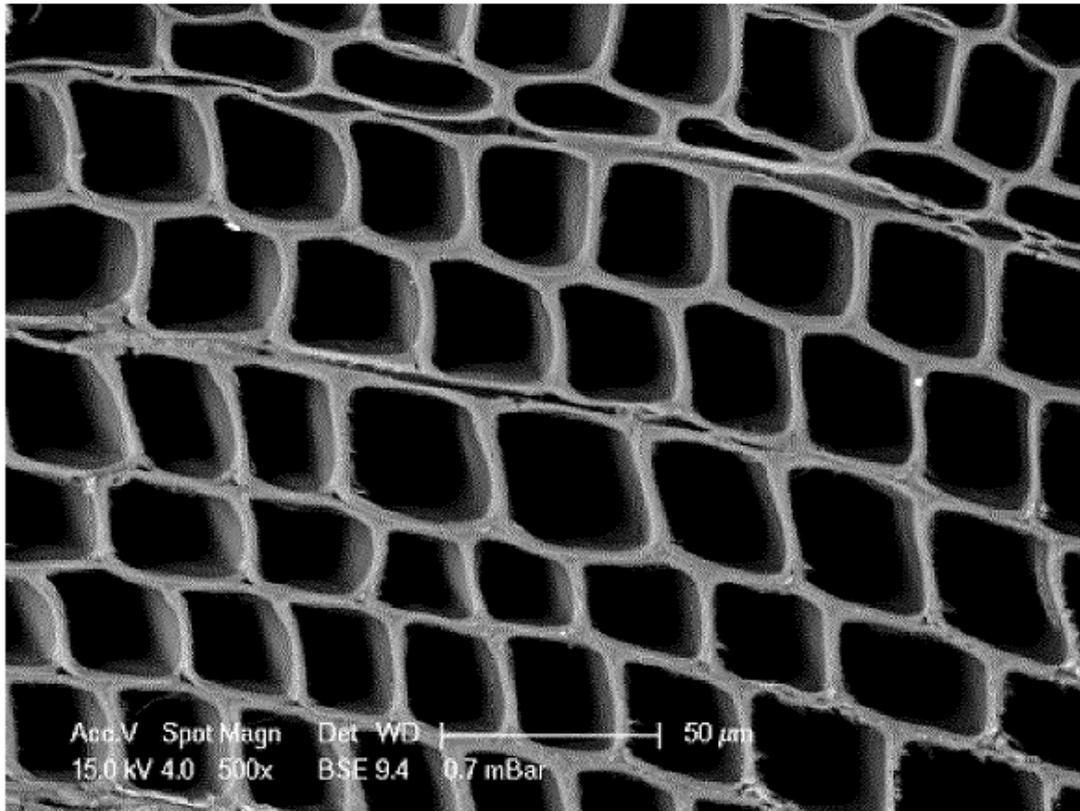


Figura 7

