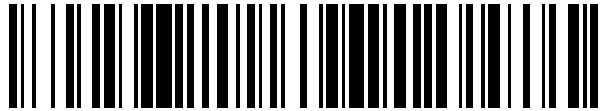


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 501**

51 Int. Cl.:

<b>D21C 5/00</b>	(2006.01)
<b>D21C 9/00</b>	(2006.01)
<b>D21H 11/18</b>	(2006.01)
<b>D21H 17/00</b>	(2006.01)
<b>D21H 17/33</b>	(2006.01)
<b>D21H 21/06</b>	(2006.01)
<b>D21H 21/08</b>	(2006.01)
<b>D21H 21/18</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2013 PCT/US2013/063825**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2014 WO14058846**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2013 E 13777452 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2906750**

54 Título: **Composición de celulasa que contiene celulasa y polímeros de fabricación de papel para aplicación de resistencia en seco de papel**

30 Prioridad:

**09.10.2012 US 201261711269 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.06.2018**

73 Titular/es:

**SOLENIS TECHNOLOGIES CAYMAN, L.P  
(100.0%)  
Mühlentalstrasse 38  
8200 Schaffhausen, CH**

72 Inventor/es:

**GU, QU-MING y  
SUTMAN, FRANK, J.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 671 501 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

Composición de celulasa que contiene celulasa y polímeros de fabricación de papel para aplicación de resistencia en seco de papel

## Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una composición de celulasa que comprende endo-celulasas mono-componente; fijadores catiónicos y/o polímeros antiadherentes no iónicos; estabilizantes de proteína celulasa; y potenciadores de celulasa. La presente invención también se refiere al uso de una composición de celulasa para mejorar las propiedades de resistencia en seco de un producto de papel mediante el tratamiento de fibras celulósicas en el acondicionamiento de la pulpa usando la composición de celulasa con una actividad de endo-celulasa de entre 10 aproximadamente 5 ECU y aproximadamente 2500 ECU por kilogramo (kg) de fibra seca antes del refinado mecánico en el proceso de fabricación de papel.

## Antecedentes de la invención

Se puede usar celulasa para modificar la superficie de celulosa de fibras celulósicas, potenciando la eficiencia del refinado mecánico de las fibras de madera y ahorrando energía de refinado en la fabricación de papel. Aunque la acción combinada del tratamiento con celulasa seguida del refinado mecánico de la fibra celulósica ayuda a fibrilar la fibra, muchas celulasas comerciales también contienen actividades de celulasa específicas que son capaces de desfibrilar fibras celulósicas mediante una hidrólisis del área fibrilada de la superficie de la fibra. Esta acción de la celulasa es perjudicial para las propiedades de resistencia en seco ya que el área fibrilada es necesaria para una mejor interacción fibra a fibra en el producto de papel tras el secado, proporcionando una mejor resistencia en seco. 20 Adicionalmente, dichas actividades de celulasa específicas mencionadas anteriormente pueden ser capaces de hidrolizar pequeños restos de fibras celulósicas o partículas finas. Aunque esta propiedad de la celulasa puede ayudar a reducir la viscosidad de la pulpa y a mejorar el drenaje de la pulpa; también puede producir una pérdida de fibra con un incremento de la demanda química de oxígeno (DQO) en la producción de papel. No está claro, mecanísticamente, cómo se puede aplicar un producto de celulasa a un proceso de fabricación de papel para mejorar las propiedades de resistencia en seco de un producto de papel.

Celulasa generalmente se refiere a una composición enzimática derivada de un microorganismo fúngico o bacteriano que puede catalizar la hidrólisis de enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos de una molécula de celulosa o de sus derivados. Tal como se muestra en la Tabla I, las endo-celulasas, las exo-celulasas y las celobiasas son tres tipos de celulasas específicas que presentan una actividad distintiva, que es diferente entre ellas, hacia moléculas de celulosa específicas. Los tres tipos de celulasas son física, química y enzimáticamente diferentes. Entre ellas, la endo-celulasa o  $\beta$ -glucanasa hidroliza aleatoriamente anomalías amorfas internas dentro de la celulosa cristalina, dando lugar a oligosacáridos superiores o a polisacáridos de celulosa acortados. Las exo-celulasas o las exo-celobiohidrolasas (CBH1 o CBH2) liberan oligosacáridos de un grado de polimerización (GP) de 2 a 4 desde el extremo reductor o desde el extremo no reductor de un polímero de celulosa. La celobiasa o  $\beta$ -glucosidasa no presenta actividad hacia polímero u oligosacáridos de celulosa, pero cataliza la hidrólisis de la celobiasa a glucosa. Las celulasas se usan en una variedad de industrias y son producidas a gran escala a partir de varias especies tales como *Trichoderma*, *Humicola*, *Thermomyces*, *Bacillus*, etc. mediante ingeniería genética de enzimas.

Para determinar la actividad de endo-nucleasa en un producto de celulasa, convencionalmente se usa como sustrato un derivado de celulosa soluble en agua como la carboximetil celulosa (CMC) o la hidroxietil celulosa (HEC) y el azúcar reductor liberado por la enzima se mide mediante un método de ácido dinitrosalicílico (DNS). La actividad de exo-celulasa se puede distinguir de la actividad de endo-nucleasa usando como sustrato celulosa insoluble en agua, tal como papel de filtro de celulosa o fibra de madera, y el azúcar reductor liberado de la fibra insoluble se determina a continuación mediante el método DNS mencionado anteriormente. La actividad de celobiasa en un producto de celulasa normalmente se determina usando celobiasa como sustrato, y la cantidad de glucosa liberada se determina usando un método de glucosa oxidasa (GO).

Tabla I. Clasificación de celulasa

Celulasa	Nombre	Nomenclatura de enzima	Ensayo enzimático
Endo-nucleasa	$\beta$ -Glucanasa	E.C.3.2.1.4	CMC o HEC como sustrato, y uso del método DNS para medir el contenido de azúcar reductor
Exo-nucleasa	Exo-celobiohidrolasas (CBHI y CBHII)	E.C.3.2.1.91	Fibra celulósica como sustrato, y uso del método DNS para medir el contenido de azúcar reductor
Celobiasa	$\beta$ -Glucosidasas	E.C.3.2.1.21	Celobiasa como sustrato, usando el método de Glucosa Oxidasa para determinar la glucosa liberada

Una celulasa derivada de microorganismos puede contener los tres tipos de celulasas. Aunque dicho producto puede funcionar sinérgicamente para atacar la celulosa cristalina y convertirla en azúcares pequeños, y finalmente en glucosa, no es preferida para uso en aplicaciones de fabricación de papel para mejorar la resistencia en seco del papel. La actividad de endo-celulasa del producto de celulasa ataca las anomalías amorfas de la celulosa cristalina y rompe la estructura cristalina. Esto potencia la eficacia del refinado mecánico en la fibrilación de fibra celulósica y contribuye a mejorar la resistencia en seco de un papel. Sin embargo, la actividad de exo-celulasa que existe en el producto de celulasa puede desfibrilar la fibra celulósica y generar finos de celulosa. En teoría, la actividad de exo-celulasa puede ayudar a mejorar el drenaje de la pulpa a través de la desfibrilación, pero también podría tener un efecto negativo sobre las propiedades de resistencia en seco del papel. No todas las celulasas son efectivas para aplicaciones de resistencia de papel y en realidad algunas pueden afectar negativamente a las propiedades de resistencia en seco.

Una celulasa derivada de un microorganismo puede tener múltiples componentes con más de una endo-celulasa y exo-celobiohidrolasa. Por ejemplo, una celulasa de *Trichoderma longibrachiatum* puede tener dos componentes CBH, CBH I y CBH II, y tres componentes endo-celulasa, EG I, EG II y EG III. Se puede producir una celulasa mono-componente clonando una secuencia de ADN de celulasa específica que codifica la celulasa individual y que es expresada en un organismo hospedante. En otras palabras, una endo-celulasa mono-componente es un único componente de endo-celulasa esencialmente libre de otras celulasas tales como exo-celulasas y  $\beta$ -glucosidasa que normalmente existen en un producto de celulasa producido por un microorganismo convencional. Se pueden usar las endo-celulasas individuales en la presente invención para mejorar la resistencia en seco de un producto de papel en la fabricación de papel.

Las Patentes de EE.UU. n° 5169497, n° 5423946, n° 6770170, n° 6939437, y la Solicitud de Patente de EE.UU. n° 20110168344, describen que se puede usar un producto de celulasa para mejorar el drenaje de una pulpa de madera cuando se usa en combinación con polímeros catiónicos. Sin embargo, las referencias no especifican cómo dichas combinaciones afectan a la resistencia en seco del papel, qué celulasas específicas pueden usarse en la aplicación o cómo afecta la dosis de celulasa al resultando en términos de resistencia en seco del papel.

La Patente de EE.UU. n° 5507914 (la patente '914) describe un proceso para potenciar la soltura de la pulpa así como resistencia del papel empleando una combinación de una celulasa con un polímero catiónico. La patente '914 muestra que se usó un nivel de dosis de 0,05-0,25% de celulasa en base a la pulpa seca. Esto es equivalente a aproximadamente 2500 ECU/kg a aproximadamente 12500 ECU/kg de fibra seca en base a la presente invención. Nuestros estudios indican que a esos niveles de adición tan elevados, las propiedades de resistencia en seco se ven afectadas negativamente.

La Patente de EE.UU. n° 6635146 (la patente '146) describe un método para tratar fibras de madera para la fabricación de papel usando una o más enzimas hidrolíticas truncadas en cantidades de 5.000 ECU a 200.000 ECU por kilogramo de fibra.

La Solicitud de Patente de EE.UU. n° 20020084046 (la solicitud '046) describe un proceso para fabricar papel añadiendo un material enzimático en una etapa de almacenamiento que es posterior a la etapa de pulpación o de refinado para un producto de papel que tiene una suavidad, cuerpo y capacidad de absorción mejoradas, a la vez que mantiene la resistencia.

La bibliografía general muestra que la actividad de celulasa puede mejorarse en un ensayo enzimático cuando se usa en combinación con tensioactivos aniónicos y no iónicos. El posible mecanismo es que los tensioactivos reducen la adsorción de celulasa en componentes no celulósicos tales como la lignina, liberan la celulasa para el sustrato celulósico y contribuyen a la estabilidad térmica de la proteína de celulasa. Tween 20 y Tween 80 son dos ejemplos de dichos tensioactivos. El polietilenglicol y sus derivados tensioactivos también pueden ayudar a mejorar la actividad de celulasa en ensayos de celulasa. Sin embargo, hay poca información disponible públicamente sobre el uso de una combinación de celulasa y tensioactivos en la aplicación de fabricación de papel, y sobre cómo dichas combinaciones afectarían a las actividades específicas de los tres tipos diferentes de celulasas.

La Solicitud de Patente de EE.UU. n° 20040038841 describe una formulación de celulasa producida a partir de tensioactivos no iónicos junto con endo-glucanasas derivadas de Zygomycetes, que pueden usarse en el tratamiento de textiles.

La Patente Japonesa n° 5507615 describe un alcohol de polivinilo y poli(vinilpirrolidona) en una formulación de celulasa para potenciar la actividad de celulasa.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una composición de celulasa para fabricación de papel que comprende: celulasa; polímero(s) de control de contaminantes, en donde el polímero de control de contaminantes puede ser polímero(s) fijador(es) catiónico(s), polímero(s) antiadherente(s), y mezclas de los mismos; estabilizante de proteína celulasa; y potenciador de celulasa, como se define adicionalmente en la reivindicación 1.

La composición de celulosa de la presente invención exhibe una actividad de celulasa y una estabilidad durante el almacenamiento mejoradas con respecto a la celulosa original.

En otra realización, la presente invención se refiere al uso de una composición de celulosa para mejorar las propiedades de resistencia en seco de un producto de papel a través del tratamiento de las fibras celulósicas en una pulpa, reserva o acabado con una composición de celulosa antes del refinado mecánico en un proceso de fabricación de papel, tal como se define adicionalmente en la reivindicación 12. El refinado mecánico de sustancias vegetales celulósicas (p.ej., madera) se usa en el proceso de fabricación de papel para generar pulpa, la base y la materia prima para fabricar productos de papel. La pulpa se genera extrayendo las fibras de celulosa de su matriz de madera. Esto se puede lograr usando reactivos químicos, calor y presión, p.ej., pulpación química, o energía mecánica, calor y presión, p.ej., pulpación mecánica. Adicionalmente, se pueden liberar fibras de pulpa individuales de la fibra reciclada o de la pulpa terminada seca, p.ej., pulpa de mercado, a través de la aplicación de energía mecánica a la vez que se pone en una suspensión de agua. Este material resultante puede denominarse pulpa, suspensión de pulpa, reserva o acabado, térmicos que se usan intercambiamente y que pretenden indicar una suspensión de fibras celulósicas, tanto antes como después de un refinado mecánico. El refinado mecánico, tal como se usa en la presente memoria, se refiere al tratamiento de una suspensión de pulpa preparada principalmente a partir de fibras de pulpa individuales rotando entre discos que contienen barras metálicas en un refinador de reserva. Esta acción mecánica desarrolla una microestructura fibrilada en la superficie de las fibras individuales, lo que permite una mejor unión entre ellas durante la consolidación de la hoja y el secado. Este tipo de refinador es una operación unitaria habitual en las fábricas de papel.

Dependiendo del tipo de papel o carbón que se esté produciendo, el fabricante de papel refinará la pulpa hasta un grado de soltura deseado. "Soltura" se refiere a la mitad del drenaje de agua de la pulpa o la capacidad de una mezcla de pulpa y agua para liberar o retener agua o drenarla. Las pulpas que tienen mayores solturas se caracterizan por un drenaje más rápido, y por pulpas más gruesas. La soltura típicamente se presenta como Soltura Estándar Canadiense (CSF, de las siglas en inglés). La soltura depende tanto de las propiedades mecánicas del refinador como de las propiedades físicas de las astillas de madera. Un operario puede variar los parámetros del refinador para alcanzar una soltura objetivo. La soltura objetivo o deseada depende del grado de papel o cartón que esté siendo producido.

Las celulosas usadas en la presente invención están disponibles a partir de uno cualquiera de diversos productores de enzimas. Pueden ser productos de celulasa mono-componente o multi-componentes. Una endo-celulasa mono-componente es un producto de celulasa esencialmente libre de exo-celulasas y celobiasa. Los ejemplos de endo-celulasa mono-componente incluyen, aunque sin limitación, FiberCare® R y FiberCare® U de Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca), Optimase® CX 56L de DuPont Industrial Biosciences (Palo Alto, CA, EE.UU.) y EcoPulp® R de AB Enzymes (Fort Mill, SC, EE.UU.). Los ejemplos de celulosas multi-componente incluyen, aunque sin limitación, FiberCare® D, Celluclast® 1.5L de Novozymes y Optimase® CX 40L de DuPont Industrial Biosciences.

Las endo-celulasas, exo-celulasas y celobiasa celulosas son conocidas en la técnica por actuar sinérgicamente sobre fibras celulósicas convirtiéndolas en glucosa. En la fabricación de papel, la fibra celulósica puede modificarse mediante una endo-celulasa específica con un efecto mínimo sobre la longitud de fibra. Está aceptado generalmente que la resistencia en seco del papel depende principalmente de los enlaces entre las fibras de celulosa y de la longitud de fibra. De forma similar al refinado mecánico, la fibrilación de fibras por endo-celulasas crea un área superficial más grande con una interacción inter-fibra más fuerte, dando como resultado una menor permeabilidad del producto de papel y una mejor resistencia en seco del papel y una mejor rigidez. En esta invención se puede emplear un producto de celulasa multi-componente derivado de un microorganismo. Sin embargo, si la celulasa contiene una cantidad significativa de exo-celulasas, que podrían actuar desfibrilando la fibra celulósica, y teniendo por tanto un efecto negativo sobre la resistencia en seco del papel. Las endo-celulasas y las celulosas mono-componente que están libres de cualquier exo-celulasa pueden usarse para mejorar las propiedades de resistencia en seco de un producto de papel. Cabe destacar que una celulasa multi-componente puede exhibir una mayor actividad de celulasa en el ensayo DNS de celulasa descrito en la sección experimental, y podría ser más efectiva que una celulasa mono-componente para tratar la pulpa de madera para mejorar el drenaje de la pulpa.

El(los) polímero(s) de control de contaminantes de la presente composición de celulasa puede contener uno o más polímero(s) antiadherente(s) de fabricación de papel seleccionado(s) entre poli(etileno glicol) acabado hidrofóbicamente, poli(vinil alcohol-co-vinil acetato), proteínas tensioactivas tales como proteína de suero, proteína de huevo y proteína de soja, copolímeros de bloque hidrofóbicos/hidrofílicos, e hidroxietil celulosa (HEC) modificada, y mezclas de los mismos. Los antiadherentes no iónicos disponibles comercialmente se encuentran disponibles en Ashland Inc, Wilmington, DE, EE.UU., entre otros. Los antiadherentes no iónicos incluyen, aunque sin limitación, DeTac® DC779F, DeTac® DC3970 y DeTac® DC7225. También se contemplan antiadherentes aniónicos tales como DeTac® DC720. Además de la capacidad de estabilizar y potenciar la actividad de endo-celulasa, los antiadherentes de la presente composición de celulasa proporcionan beneficios de control de brea ("pitch") y depósitos pegajosos ("stickies") en un proceso de fabricación de papel.

El(los) polímero(s) de control de contaminantes de la presente composición de celulasa también puede(n) ser uno o más polímero(s) fijador(es) catiónico(s) para fabricación de papel seleccionado(s) entre poli(DADMAC) (poli(cloruro de dialildimetilamonio), poli(DMA-EPI-EDA) (polímeros de condensación de dimetilamina-epiclorhidrina-

- etilendiamina), poli(acrilamida) catiónica, GPAM (poliacrilamida glioxilada), poli(etilenimina), poli(amidoamina) reaccionada con epiclorhidrina (EPI), poli(vinilamina), polímeros catiónicos modificados hidrofóticamente tales como polietilenimina alquilada (PEI), poli(lisina) alquilada, homo- y co-polímeros alquilados de vinilamina, poli(aminoamida alquilada, poliacrilamida alquilada, copolímeros de vinilamina que contienen grupos amino con monómeros hidrofóuticos, copolímeros de cloruro de dimetil dialil amonio con monómeros hidrofóuticos, copolímeros de acrilato que contienen grupos amino con monómeros hidrofóuticos, y polisacáridos naturales y modificados que contienen amino alquilado, proteínas catiónicas alquiladas y mezclas de los mismos, poli(aminoamida) modificada con C8-C10 alquil glicidilo, productos catiónicos naturales, y polímeros anfotéricos que tienen una unidad catiónica específica y una unidad aniónica tal como un polímero de acrilamida anfotérico formado con monómeros aniónicos y catiónicos, el polímero de vinilamida anfotérico formado con monómeros aniónicos y catiónicos, un derivado de cloruro de dimetil dialil amonio anfotérico, copolímero de poli(acrilamida-co-ácido acrílico-co-cloruro de dimetil alil amonio), copolímero de poli(ácido acrílico-co-cloruro de dimetil dialil amonio), almidón anfotérico, polisacáridos anfotéricos, polímero de micropartículas poliméricas anfotéricas, y mezclas de los mismos. Los polímeros fijadores catiónicos para uso en la presente invención se encuentran disponibles comercialmente en Ashland Inc, Wilmington, DE, EE.UU., entre otros, e incluyen, por ejemplo, Zenix DC® 7429, Zenix® DC7479, Hercobond® 6363, Hercobond® 6350 y DeTac® DC786C. Los polímeros fijadores catiónicos y los antiadherentes de control de contaminantes se puede usar por separado o juntos en la composición de celulosa. Adicionalmente, se puede aplicar un producto polimérico catiónico separado con propiedades de control de contaminantes a un sistema de fabricación de papel en combinación con la presente composición de celulosa para mejorar el resultado final.
- Adicionalmente, se pueden usar otros aditivos usados en el proceso de fabricación de papel en combinación con la presente composición de celulosa, que incluyen, por ejemplo, aditivos de fabricación de papel catiónicos tales como aditivos de resistencia en seco, aditivos de resistencia en húmedo, floculantes, aditivos para retención y aditivos para drenaje. Estos aditivos de fabricación de papel catiónicos pueden poseer propiedades fijadoras para los componentes aniónicos en un proceso de fabricación de papel.
- La presente composición de celulosa también contiene estabilizantes de proteína celulosa que incluyen, por ejemplo, propilenglicol, glicerol, etilenglicol, azúcar, sorbitol, ácido láctico, glucosa, galactosa, maltodextrina, oligosacáridos, jarabe de maíz, y sales inorgánicas tales como cloruro sódico y potásico; un sistema tamponante del pH tal como fosfatos sódico y potásico, ácido cítrico sódico, tris(hidroximetil)metilamina (Tris), ácido 4-2-hidroxietyl-1-pierazinaetanosulfónico (HEPES), piperazina-N,N-bis(ácido 2-etanosulfónico), ácido 2-(N-morfolino)jetanosulfónico, y ligandos de proteína tales como glucosa y N-acetil-D-glucosamina, y otros estabilizantes de proteína que son bien conocidos en la técnica para estabilizar una estructura terciaria de proteína y contribuir a mantener la actividad enzimática.
- La composición de celulosa de la presente invención también puede contener una o más sales de ion metálico que potencian la estabilidad y la actividad de celulosa. Las sales de ion metálico incluyen, por ejemplo, cloruro de calcio, cloruro de cinc y cloruro de magnesio.
- En una realización la composición de celulosa es una endo-celulosa mono-componente y el polímero de control de contaminantes es un poli(vinil acetato-co-vinil alcohol), anti-adherente de polietilenglicol modificado hidrofóticamente o una mezcla de los mismos; el estabilizante de celulosa es propilenglicol, glicerol, sorbitol o mezclas de los mismos; y el potenciador es cloruro de calcio.
- En otra realización adicional, la composición de celulosa es una endo-celulosa mono-componente; el(los) polímero(s) de control de contaminantes es(son) un(os) polímero(s) fijador(es) catiónico(s) tal como poli(DADMAC), poli(DMA-EPI-EDA), fijador catiónico modificado hidrofóticamente, o mezclas de los mismos; el estabilizante de celulosa es propilenglicol, glicerol, sorbitol o mezclas de los mismos; y el potenciador de celulosa es cloruro de calcio.
- La proporción de los cuatro componentes principales en la composición de celulosa se puede cambiar en un rango específico para proporcionar una actividad de celulosa y una estabilidad de proteína optimizadas a un pH, fuerza iónica y condiciones de temperatura específicas. La proporción también puede afectar a su eficiencia de celulosa para tratar fibras celulósicas para aplicaciones de resistencia en seco de papel y al resultado de los polímeros de control de contaminantes de la fabricación de papel en un sistema de fabricación de papel. La composición de celulosa de la presente invención es una formulación acuosa con hasta aproximadamente 95% de agua y entre aproximadamente 5% y aproximadamente 50% de otros componentes no acuosos.
- En una realización, la composición de celulosa tiene una concentración activa de una endo-celulosa mono-componente de entre aproximadamente 2% p/p y aproximadamente 80% p/p de la composición total en base activa; puede ser de entre aproximadamente 3% p/p y aproximadamente 40% p/p de la composición total en base activa; y puede ser de entre aproximadamente 5% p/p y aproximadamente 25% p/p de la composición total en base activa; la concentración de polímero de control de contaminantes está entre aproximadamente 2% p/p y aproximadamente 50% p/p en base activa; puede estar entre aproximadamente 5% p/p y aproximadamente 40% p/p en base activa; y puede estar entre 10% p/p y 20% p/p en base activa; el contenido de estabilizante de proteína está entre aproximadamente 0,1% p/p y aproximadamente 50% p/p en base no acuosa o seca; puede estar entre aproximadamente 5% p/p y aproximadamente 40% p/p en base seca; y puede estar entre aproximadamente 10%

p/p y aproximadamente 30% p/p en base seca. El potenciador de celulasa está entre 0,1% p/p y aproximadamente 0,5% p/p en base seca; puede estar entre 0,001% p/p y 0,25% p/p en base seca; y puede estar entre aproximadamente 0,005% p/p y aproximadamente 0,1% p/p en base seca.

5 En otra realización, la composición de celulasa tiene una concentración activa de una celulasa multi-componente de entre aproximadamente 2% p/p y aproximadamente 80% p/p de la composición total en base activa; puede estar entre aproximadamente 3% p/p y aproximadamente 40% p/p de la composición total en base activa; y puede estar entre aproximadamente 5% p/p y aproximadamente 25% p/p de la composición total en base activa; la concentración de polímero de control de contaminantes está entre aproximadamente 2% p/p y aproximadamente 50% p/p en base activa; puede estar entre aproximadamente 5% y aproximadamente 40% p/p en base activa; y puede estar entre 10% p/p y 20% p/p en base activa; el contenido de estabilizante de proteína está entre aproximadamente 0,1% p/p y aproximadamente 50% p/p en base no acuosa o seca; puede estar entre aproximadamente 5% p/p y aproximadamente 40% p/p en base seca; y puede estar entre aproximadamente 10% p/p y aproximadamente 30% p/p en base seca. El potenciador de celulasa está entre 0,1% p/p y aproximadamente 0,5% p/p en base seca; puede estar entre 0,001% p/p y 0,25% p/p en base seca; y puede estar entre aproximadamente 0,005% p/p y aproximadamente 0,1% p/p en base seca.

15 Los porcentajes activos del polímero de control de contaminantes, el estabilizante de proteína y el potenciador de celulasa en la composición de celulasa se definen como partes no acuosas de dichos polímeros o productos químicos en la composición de celulasa. El porcentaje en peso activo de la endo-celulasa o celulasa activa en la composición de celulasa está basado en el supuesto de que la celulosa original es 100% activa tal como se obtiene en la fuente comercial.

20 El pH de la composición de celulasa de la presente invención afecta a la estabilidad del estabilizante de proteína y a la actividad de la enzima celulasa. Un pH apropiado previene la desnaturalización de la proteína que puede resultar en la desactivación de la celulasa. El pH de la presente composición de celulasa puede estar en el rango de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 10; puede estar en el rango de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8, y puede estar en el rango de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7. Típicamente, en un proceso de producción de la presente composición de celulasa, el polímero de control de contaminantes puede mezclarse con el estabilizante de proteína y el potenciador de celulasa en agua durante aproximadamente 5 a aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de la adición del producto de endo-celulasa mono-componente. Los cuatro componentes pueden añadirse juntos en una secuencia aleatoria antes de la introducción en el acabado de la fabricación de papel del proceso de fabricación de papel. El pH de la composición de celulasa puede ajustarse con un ácido o una base si es necesario después de que la composición adquiera una apariencia homogénea. También se puede usar un sistema tamponante para controlar el pH de la composición de celulasa en un rango específico.

25 La composición de celulasa de la presente invención presentó una actividad de celulasa mejorada respecto a la actividad de celulasa de una composición convencional. La presente composición de celulasa también presentó una mejor estabilidad en almacenamiento de la celulasa y una mejor estabilidad en almacenamiento física respecto a la celulasa original, particularmente a temperaturas más altas de aproximadamente 50°C o más. El término "estabilidad en almacenamiento de celulasa mejorada" significa que la presente composición de celulasa tras ser almacenada durante un periodo de tiempo a una determinada temperatura y sometida a las mismas condiciones estándar de ensayo que la celulasa convencional, exhibe una menor reducción de la actividad de celulasa en comparación con la de la celulasa original. El término "buena estabilidad física" significa que la composición de celulasa mantiene las propiedades físicas deseadas en apariencia, homogeneidad y color claro, sin deterioro en el olor.

35 Para las celulasas que se pretende usar en las presentes composiciones de celulasa, la actividad de celulasa que incluye actividad de endo-celulasa (ECU), actividad de exo-celobiohidrolasas y  $\beta$ -glucosidasas, fueron medidas usando métodos estándar como los descritos en la Tabla I. La actividad de endo-celulasa (ECU) de la celulasa original medida mediante un ensayo DNS, como se describe en la sección experimental, está en el rango de entre aproximadamente 500 ECU/g y aproximadamente 20000 ECU/g; puede estar entre aproximadamente 1000 ECU/g y aproximadamente 15000 ECU/g; y puede estar entre aproximadamente 2000 ECU/g y aproximadamente 10000 ECU/g. La actividad de celulasa puede variar entre lotes específicos de los productos de celulasa, y con los materiales procedentes de diferentes fuentes comerciales. La actividad de endo-celulasa de la composición de celulasa de la presente invención normalmente está en el rango de entre aproximadamente 25 ECU/g y aproximadamente 10000 ECU/g; puede estar entre aproximadamente 50 ECU/g y aproximadamente 5000 ECU/g; y puede estar entre aproximadamente 100 ECU/g y aproximadamente 3000 ECU/g. La actividad de celulasa de la composición de celulasa puede evaluarse en condiciones de pH y temperatura específicas con diferentes sustratos de celulosa según sea necesario. Las actividades de la composición de celulasa de la presente invención y la celulasa original en relación a la producción de azúcar reductor a partir de un derivado de celulosa soluble en agua y del azúcar reductor a partir de una fibra celulósica insoluble en agua, fueron comparadas para determinar la selectividad de la celulasa como endo-celulasa sobre una fibra. La presente composición de celulasa como endo-celulasa específica produce más azúcares reductores a partir de un derivado de celulosa soluble en agua y menos azúcares reductores a partir de una fibra celulósica insoluble en agua que la composición de celulasa original. Opcionalmente, se puede determinar la actividad de celobiasa en un producto de celulasa usando un método de glucosa oxidasa (GO) para medir la glucosa generada a partir de celobiosa por el producto de celulasa y compararla

con la de una endo-celulasa conocida. Cuanto menor es la actividad de celobiasa y exo-celulasa, más pura es la composición de celulasa como producto de endo-celulasa.

Las presentes composiciones de celulasa pueden usarse en el proceso de fabricación de papel para tratar todos los tipos de fibras celulósicas, incluyendo fibras vírgenes blanqueadas y no blanqueadas, fibras mecánicas y fibras recicladas, y pueden usarse para fibra virgen y fibra reciclada de buena calidad en fábricas de papel que usen refinadores. La modificación de la superficie de las fibras celulósicas mediante la presente composición de celulasa da como resultado una reducción del consumo de energía del refinador mecánico. Para evaluar la eficacia de una composición de celulasa sobre la fibra celulósica en una aplicación práctica en la fabricación de papel, se debería ser capaz de observar la misma eficacia de refinado con una menor energía de refinado, unas propiedades de resistencia en seco mejoradas del producto de papel y el cambio en los drenajes de la suspensión de pulpa antes y después del refinador. En general, una combinación de un aumento de la soltura o drenaje en la pulpa pre-refinado y una reducción o un mantenimiento de la soltura de la pulpa post-refinado es un indicio de tratamiento efectivo mediante la composición de celulasa.

Una realización de la presente invención es el proceso de fabricación de un producto de papel en el que una fibra celulósica en una suspensión acuosa que está siendo agitada es tratada con una composición de celulasa que comprende una endo-celulasa mono-componente; polímero(s) de control de contaminantes seleccionado(s) entre anti-adherentes y/o polímero(s) fijador(es) catiónico(s), o mezclas de los mismos; estabilizante de proteína celulasa; y potenciador de celulasa, y la actividad de celulasa está entre aproximadamente 5 ECU y aproximadamente 2500 ECU por kg de fibra seca a una temperatura de entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 70°C y un pH de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 9, y en donde la composición de celulasa está en contacto con la fibra celulósica durante al menos 10 minutos antes de que la fibra celulósica sea refinada en un refinador, y la fibra se conforme y se seque en un producto deseado.

Otra realización de la presente invención es el proceso de fabricación de un producto de papel en donde una fibra celulósica en una suspensión acuosa que está siendo agitada es tratada con una composición de celulasa que comprende una celulasa multi-componente; polímero(s) de control de contaminantes seleccionado(s) entre anti-adherentes y/o polímero(s) fijador catiónico, o mezclas de los mismos; estabilizante de proteína celulasa; y potenciador de celulasa, y la actividad de celulasa está entre aproximadamente 5 ECU y aproximadamente 2500 ECU por kg de fibra seca a una temperatura de entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 70°C y un pH de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 9, y en donde la composición de celulasa está en contacto con la fibra celulósica durante al menos 10 minutos antes de que la fibra celulósica sea refinada en un refinador, y la fibra se conforme y se seque en un producto deseado.

La endo-celulasa mono-componente y la composición de celulasa de la presente invención pueden usarse para aplicaciones de resistencia en seco de papel en un rango específico de dosis de actividad de endo-celulasa. Una dosis excesiva de una composición de celulasa puede producir daños en la fibra celulósica acortando la longitud de fibra, dando como resultado una reducción de la resistencia de enlace. La dosis de una endo-celulasa debe ser controlada a un nivel dado que no desfibra la fibra demasiado y que no acorte la longitud de fibra. Sorprendentemente, se ha descubierto que la presente composición de celulasa preparada con anti-adherentes no iónicos presenta poco o ningún efecto negativo sobre las propiedades de resistencia en seco, tal como en el test de estallido Mullen, en una situación de dosis excesiva. Sin embargo, cuando se usa un anti-adherente con la composición de celulasa original se observa una reducción en el estallido Mullen. Esto indica que la presente composición de celulasa es mucho más tolerable en una aplicación práctica cuando el acabado del papel se ve sometido accidentalmente a una dosis excesiva debido a situaciones tales como apagados de la máquina de papel u otros eventos no inesperados en la fábrica de papel.

La composición de celulasa de la presente invención preparada a partir de una celulasa multi-componente que contiene principalmente actividad de endo-celulasa también puede usarse para aplicaciones de resistencia en seco de papel. Cabe destacar que tratar fibra virgen o reciclada con esta composición podría generar más finos celulósicos que una composición de endo-celulasa mono-componente con la misma actividad general de celulasa debido a la presencia de componentes de exo-celulasa. Además, la composición de celulasa multi-componente puede ser más propensa a dañar la propiedad de resistencia cuando se aplica en una dosis excesiva.

Otra realización se refiere a un proceso de fabricación de productos de papel mediante el tratamiento de fibra de celulosa en una disolución acuosa que es agitada durante el contacto con la composición de celulasa, que comprende al menos aproximadamente 5 ECU de actividad de celulasa por kg de fibra seca celulósica.

Otra realización se refiere a un proceso de fabricación de un producto de papel mediante el tratamiento de fibras de celulosa en una suspensión acuosa con una composición de celulasa. Se añade una composición de celulasa según la presente invención a una etapa de acabado del papel con agitación. La composición de celulasa que comprende una cantidad que supera aproximadamente 2500 ECU de actividad de celulasa por kg de fibra seca celulósica; puede estar entre aproximadamente 20 ECU y aproximadamente 2000 ECU de actividad de celulasa por kg de fibra seca celulósica; y puede estar entre aproximadamente 50 ECU/kg y aproximadamente 1500 ECU de actividad de celulasa por kg de fibra seca de celulosa.

El pH del proceso de fabricación de un producto de papel con la presente composición de celulosa es al menos aproximadamente pH 3 pero no debe superar un pH de aproximadamente 9; el pH puede estar entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8,5; y puede estar entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 8. El tiempo de contacto de la composición de celulosa con la fibra celulósica es al menos de aproximadamente 10 minutos y puede ser de hasta aproximadamente 5 horas; puede estar entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 3 horas; y puede estar entre aproximadamente 0,3 horas y aproximadamente 2 horas. La temperatura es de al menos 10°C, pero no superior a aproximadamente 70°C; puede ser de entre aproximadamente 23°C y aproximadamente 50°C; y puede estar en el rango de entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 50°C. La temperatura de la suspensión de pulpa o de la etapa de acabado en un sistema de fabricación de papel varía con las máquinas de papel y los grados de papel específicos. Por lo tanto, a menudo se espera que la composición de celulosa tenga una mayor actividad en un sistema de fabricación de papel que tiene una mayor temperatura de reserva. La selectividad o la especificidad en relación a la actividad de endo-celulasa con respecto a la actividad de exo-celulasa de una composición de celulosa específica de la presente invención también pueden cambiar en fábricas de papel con diferente sistema de pH de reserva.

En otra realización adicional, se proporciona un método para mejorar el drenaje de una fibra celulósica en un proceso de fabricación de papel. Se proporciona una composición de celulosa que contiene celulosa, polímero(s) de control de contaminantes, y mezclas de los mismos, estabilizante(s) de proteína celulosa; y potenciador(es) de celulosa, en donde la composición de celulosa se añade a una suspensión de pulpa en una cantidad en actividad de celulosa que oscila entre aproximadamente 5 ECU/kg y aproximadamente 2.500 ECU/kg de fibra de madera seca.

En el presente proceso la composición de celulosa puede usarse para tratar fibra celulósica virgen, por ejemplo, madera blanda tratada en el proceso kraft (SWBK), madera dura tratada en el proceso kraft (HWBK), o una mezcla de las mismas. La presente composición de celulosa también puede usarse para tratar fibra reciclada. En una instalación de laboratorio, el tratamiento se puede llevar a cabo con una agitación efectiva a aproximadamente 50°C durante aproximadamente 60 minutos. La fibra celulósica tratada es sometida a continuación a un refinador de laboratorio tal como un molino PFI o un batidor valley hasta obtener una soltura deseada. La pulpa refinada es usada a continuación para preparar un producto de papel, tal como hojas de mano en un peso base específico. Las propiedades de resistencia en seco de papel tales como estallido Mullen, resistencia a tracción en seco, etc... son evaluadas y los datos se normalizan en base al peso respecto a un blanco (la fibra que no ha sido tratada con una composición de celulosa) y un control usando la celulosa original. Además de mejorar la resistencia en seco, la presente composición de celulosa puede usarse para tratar fibra virgen o reciclada para mejorar el drenaje y la retención con o sin refino mecánico. La presente composición de celulosa también puede aplicarse a fibra celulósica después del refino y antes de que el producto de papel sea conformado.

Generalmente se usan polímeros de control de contaminantes tales como anti-adherentes o polímeros fijadores catiónicos en un proceso de fabricación de papel para limpiar de contaminantes las fibras celulósicas y las superficies de la máquina de papel. Una ventaja de mezclar un polímero de control de contaminantes tal como un anti-adherente no iónico o aniónico y/o un polímero fijador catiónico en la composición de celulosa es ayudar a eliminar los elementos pegajosos ("stickies") adheridos a la superficie de las fibras celulósicas y permitir un mejor acceso de la endo-celulasa a la fibra. El polímero fijador catiónico también puede interactuar con el grupo aniónico de la superficie de las fibras, interrumpiendo de este modo los enlaces de hidrógeno entre las fibras celulósicas de la estructura cristalina. Adicionalmente, el polímero fijador catiónico puede ayudar a que la celulosa penetre en la pared de la fibra.

El tratamiento de una pulpa reciclada que contiene elementos pegajosos ("stickies") y brea ("pitch") con la presente composición de celulosa mejoró el drenaje de pulpa y la eficacia de la celulosa hacia la fibra celulósica. En algunos casos, la endo-celulasa mono-componente y los polímeros de control de contaminantes presentaron un efecto sinérgico proporcionando unas propiedades mejoradas de resistencia en seco del papel. Cuando se introdujo un polímero de control de contaminantes en las presentes composiciones de celulosa, se observó una mejor retención de fibra que con la celulosa original. Adicionalmente, cabría esperar que la presente composición de celulosa tuviera un efecto positivo sobre la reducción de la demanda química de oxígeno (DQO) en una fábrica de papel. Los polímeros de control de contaminantes son compatibles con la endo-celulasa de la presente invención y forman composiciones acuosas homogéneas y estables con las celulasas.

La presente composición de celulosa puede usarse en combinación con otros aditivos del proceso de fabricación de papel que incluyen compuestos sintéticos catiónicos, aniónicos, anfotéricos, no iónicos, y polímeros naturales. Los ejemplos de compuestos adecuados para uso con la presente composición de celulosa incluyen, aunque sin limitación, aditivos de resistencia en seco tales como almidón, derivados de almidón, derivados de poli(acrilamida), goma guar, poli(vinilamina); aditivos de resistencia en húmedo tales como polietilenimina, resina de urea formaldehído, poli(aminoamida) reaccionada con epiclorhidrina, aldehído de almidón, GPAM; floculantes; coagulantes; aditivos de drenaje; aditivos de retención; agentes de encolado; adhesivos; desligantes; adhesivos "creping"; plastificantes; y modificantes. Se pueden aplicar los componentes individuales de cualquiera de las anteriores combinaciones juntos o secuencialmente en la fabricación de papel. Adicionalmente, los componentes individuales de cualquiera de las combinaciones anteriores se pueden mezclar antes del uso.



En otra realización, la composición de celulasa se combina con un derivado de poli(vinilamina) que mejora la soltura de la pulpa y potencia las propiedades de resistencia en seco de un producto de papel. La poli(vinilamina) interacciona con la fibra celulósica que ya ha sido tratada con una celulasa y refinada mediante un refinado mecánico vía floculación para preservar la estructura de celulosa fibrilada y mejorar el drenaje de la pulpa. La fibra celulósica puede ser atacada por la impureza de la actividad de exo-celulasa de un producto de endo-celulasa, dando como resultado la producción de restos de fibra o partículas finas de celulosa y produciendo una reducción de la retención de fibra fina o total en un proceso de fabricación de papel. Se ha descubierto que un aditivo de fabricación de papel catiónico con una elevada densidad de carga catiónica, tal como una poli(vinilamina), podría ser usado en una combinación con la presente composición de celulasa para mantener una buena retención de fibra total.

La presente composición de celulasa puede estar presente o ser introducida en un equipo de pulpación durante la etapa de pulpación, o puede ponerse en contacto en cualquier cofre de almacenamiento de reserva, cofre de alta consistencia u otro tanque de almacenamiento. También puede añadirse a la máquina de papel con agua o, alternativamente, puede aplicarse en los lazos de tratamiento con agua de los molinos vírgenes o de reciclado para tratar la fibra de madera. Sin embargo, la adición de la composición de celulasa debería ser al menos 10 minutos antes del refinador mecánico, dejando un tiempo de contacto de la composición de celulasa con la fibra celulósica. Es necesaria una agitación o mezclamiento efectivos para que la celulasa ejerza una acción efectiva sobre la fibra. La consistencia de la pulpa también contribuye a la eficacia del tratamiento por parte de la composición de celulasa. Una alta consistencia de la pulpa reduce la eficacia de transferencia de materia, dando como resultado interacciones no uniformes entre la celulasa y la fibra. Una baja consistencia de la pulpa disminuye la concentración de la celulasa en la pulpa para una proporción fija de celulasa/fibra seca, y reduce la eficacia de la celulasa. En general, la consistencia de la pulpa de la fibra de celulosa tratada por la composición de celulasa es de al menos aproximadamente 0,3% y no debería superar aproximadamente 10%. La consistencia de la pulpa puede estar en el rango de entre aproximadamente 1% y aproximadamente 5%; y puede estar en el rango de entre aproximadamente 2% y aproximadamente 4%.

El tratamiento de la suspensión de pulpa usando una combinación de la presente composición de celulasa con una o más enzimas adicionales puede lograr un resultado mejorado en el drenaje de la pulpa y en las propiedades de resistencia en seco de un producto de papel. Dichas enzimas incluyen típicamente hidrolasas tales como hemicelulasas, amilasas, proteasas, lipasas, esterases y pectinasas; liasas tales como pectato liasa. Adicionalmente, se pueden usar otras enzimas en combinación con la presente composición de celulasa. Otras enzimas incluyen oxidorreductasas tales como lacasa, lignina oxidasa, glucosa oxidasa y peroxidasas. Estas enzimas pueden usarse en cualquier forma, tal como forma líquida, gel o sólida. Las enzimas individuales o cualesquier combinaciones de diferentes enzimas pueden aplicarse juntas con la presente composición de celulasa, o se pueden aplicar secuencialmente antes o después de la adición de la presente composición de celulasa. También se pueden mezclar enzimas individuales con la presente composición de celulasa para formar una composición de mezcla antes de su uso.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención y no pretenden ser limitantes en modo alguno para el alcance de la invención tal cual es reivindicada.

### **Ensayos de celulasa**

#### **Estimación de azúcares reductores mediante ácido dinitrosalicílico (DNS) para actividad de endo-celulasa**

El ensayo de actividad de endo-celulasa se llevó a cabo usando un 1% de carboximetil celulosa (CMC, M7F, Ashland, Wilmington, DE, EE.UU.) como sustrato, en tampón de fosfato sódico 0,1 molar (M), pH 7,0. El azúcar reductor se determinó usando un método de ácido dinitrosalicílico (DNS), en el que el ácido dinitrosalicílico es reducido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico en condiciones alcalinas, produciendo un color que es medido a continuación espectrométricamente a una absorbancia UV de 540 nm. La glucosa fue el patrón de calibrado. Una unidad de endo-1,4-β-glucanasa (ECU) se define como la cantidad de celulasa que produce 1 micromolar (μmol) de azúcares reductores como glucosa a partir de CMC en un segundo a pH 7.0.

En un ejemplo típico, se añadieron 0,2 gramos (g) de una disolución al 0,1% de la composición de celulasa (equivalente a aproximadamente 0,1 ECU a 0,15 ECU de celulasa) a 1,8 g de una disolución de CMC (1,0%, pH 7,0) en un tubo de ensayo. La mezcla se incubó con agitación a 50°C durante 10 minutos, tras lo cual se añadieron 3 mililitros (mL) de reactivo DNS (recién preparado según Miller, G. L. 1959, Analytical Chemistry 31, pág. 426), a la mezcla y la mezcla resultante se calentó en agua hirviendo durante exactamente 5 minutos. La disolución en el tubo de ensayo se enfrió a temperatura ambiente y se midió la absorbancia UV a 540 nm. Simultáneamente se estableció la curva de calibrado (UV a 540 nm frente a concentración de glucosa) usando glucosa 0,1% con los mismos reactivos del ensayo DNS.

En general, la actividad de endo-celulasa (ECU) de la presente composición de celulasa estaba en el rango de entre aproximadamente 60 ECU/g y aproximadamente 3600 ECU/g de disolución de celulasa usando el anterior ensayo en condiciones específicas.

Medida de la reducción de viscosidad de CMC para determinar la actividad relativa de endo-celulasa

Se usó este método para determinar la actividad relativa de endo-celulasa en porcentaje de la presente composición de celulasa en comparación con la celulasa original. En este método, se incubó una disolución viscosa de carboximetil celulosa (CMC, M7F) a 40°C con una muestra de composición de celulasa. La degradación de CMC dio como resultado una viscosidad reducida de la disolución. Para ser precisos, la viscosidad final debería medirse en al menos el 40% sin exceder el 60% de la viscosidad original. El grado de disminución de la viscosidad es proporcional a la actividad de endo-celulasa. La viscosidad de una disolución de CMC que contiene la celulasa original y una disolución de CMC que contiene la presente composición de celulasa se midió usando un viscosímetro DV-E o DV-II (Brookfield Viscosity Lab, Middleboro, MA) con un husillo (número 3) y velocidad (30 rpm) seleccionados. Las unidades están en centipoises (cps).

A modo de ejemplo, se prepararon 60 gramos de disolución de CMC (2,6% en tampón de fosfato sódico 0,1M a pH 7,0, con una viscosidad de Brookfield alrededor de 1500 cps) y se midió la viscosidad (muestra Vo). La disolución se calentó a 40°C y se mantuvo a 40°C durante 5 minutos, y se añadió una pequeña cantidad de celulasa (equivalente a aproximadamente a entre 1 ECU y 2 ECU de celulasa) como una disolución al 1,0% en tampón de fosfato sódico 0,1 M a pH 7,0. La mezcla resultante se incubó con agitación a 40°C durante 10 minutos y la mezcla se enfrió a 23°C y se midió la viscosidad (muestra Ve). Se llevó a cabo el mismo análisis con la celulasa original con el mismo lote de disolución de CMC usado en la presente composición de celulasa. La viscosidad de la disolución de partida y la disolución final se midieron como patrón Vo y patrón Ve, respectivamente. Se calculó la actividad de celulasa relativa de la muestra como  $(muestra\ Vo - muestra\ Ve) * 100 / (patrón\ Vo - patrón\ Ve)$ .

Actividad relativa de exo-celulasa usando el método de ácido dinitrosalicílico (DNS)

Se añadió una cantidad de la presente composición de celulasa (equivalente a aproximadamente 2 ECU/g a 3 ECU/g de fibra seca) a fibra celulósica suspendida en agua a pH 7,0, formando una suspensión de pulpa. La suspensión resultante se incubó a 50°C durante 8 horas. La pulpa se filtró y se determinó el contenido de azúcar reductor mediante el método DNS descrito anteriormente. Se incubó un mililitro (mL) del filtrado con 4 mL de reactivo DNS en agua hirviendo durante exactamente 5 minutos. La muestra fue enfriada a temperatura ambiente y se midió la absorbancia UV a 540 nm. Se estableció una curva de calibrado simultáneamente usando el método del test DNS referido anteriormente y una disolución al 0,1% de glucosa a concentraciones variables.

**Ensayo de proteína**

La concentración de proteína de las presentes composiciones de celulasa fue determinada usando un método de ensayo de proteína Bio-Rad, que es un ensayo de unión a colorante basado en un método desarrollado por M. M. Bradford (véase Bradford M. M., "A rapid and sensitive method of determining microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", Analytical Biochemistry 72: 248-254, 1976). Se añade un reactivo colorante ácido a una disolución de proteína y se mide la absorbancia UV a 595 nm con un espectrómetro UV. La comparación de estos resultados con una curva de calibrado de albúmina de suero bovino (BSA) proporciona una medida relativa de la concentración de proteína. El reactivo de ensayo de proteína Bio-Rad se obtuvo en Bio-Rad Laboratories. Como procedimiento estándar, el reactivo colorante se preparó de nuevas diluyendo 1 parte del reactivo colorante de ensayo de proteína Bio-Rad con 4 partes de agua. Se prepararon cinco diluciones patrón de BSA en un rango lineal desde 0,2 miligramos por mililitro (mg/mL) hasta 0,9 mg/mL. En el ensayo, se pipetearon 100 microlitros (µL) de las diluciones de BSA y la muestra de proteína de concentración desconocida en tubos de ensayo, y se añadieron 5 mL del reactivo de colorante diluido a la muestra de proteína. Las mezclas de los tubos de ensayo fueron sometidas a vórtice e incubadas a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se midió la absorbancia UV a 595 nm.

Se usó el ensayo de proteína para medir el contenido de proteína como un porcentaje de la composición de celulasa y se determinó la actividad específica de celulasa. En general, la concentración de proteína en porcentaje en peso de la presente composición de celulasa estaba en el rango de entre aproximadamente 0,02% y aproximadamente 1%.

Ejemplo 1. Formulación de la composición de celulasa

Este ejemplo ilustra un método general de preparación de la presente composición de celulasa usando una endo-celulasa o una celulasa multi-componente; un polímero de control de contaminantes, un estabilizante de proteína celulasa; y un potenciador de celulasa.

Se preparó una disolución homogénea añadiendo secuencialmente un polímero de control de contaminantes, un estabilizante de proteína celulasa y un potenciador de celulasa en una cantidad deseada de agua a una temperatura de aproximadamente 20°C con agitación constante, formando una disolución homogénea. Se añadió lentamente una disolución de celulasa a la disolución homogénea a lo largo de un periodo de tiempo de 20 minutos a una temperatura que no superó los 28°C, dando como resultado mezclas según los Ejemplos mostrados en la Tabla II. La temperatura de cada mezcla se tomó a 20°C y se agitó durante 20 minutos. A continuación se ajustó el pH de cada mezcla a 6 usando HCl o NaOH según fuese necesario, para obtener una composición de celulasa homogénea y transparente. Los porcentajes activos del polímero de control de contaminantes, el estabilizante de proteína y el

potenciador de celulasa en la presente composición de celulasa se definen como partes no acuosas de dichos polímeros o compuestos químicos en la composición de celulasa. El porcentaje de peso activo de la endo-celulasa o de la celulasa activa en la presente composición de celulasa se basa en la suposición de que la celulasa original es 100% activa tal como se obtiene de la fuente comercial. Se llevó a cabo de forma ocasional un ensayo de proteína Bio-Rad para determinar la concentración de proteína de la composición de celulasa y para verificar el porcentaje activo de la celulasa original en la composición de celulasa.

Ejemplo 2. Actividad de celulasa de las composiciones de celulasa

El Ejemplo 2 demuestra mejoras en la actividad de endo-celulasa de las presentes composiciones de celulasa en comparación con las composiciones de celulasa originales. En este experimento, se usó una endo-celulasa mono-componente en la forma de FiberCare® R y una celulasa multi-componente en la forma de FiberCare® D.

Los polímeros de control de contaminantes usados para las composiciones de celulasa se encuentran todos disponibles comercialmente en Ashland Inc, Wilmington, DE, EE.UU. Los polímeros fijadores catiónicos usados en el experimento incluyeron Zenix® DC7429 y Zenix® DC7479. También se usó el fijador catiónico modificado hidrofóbicamente DeTac® DC786C, y los anti-adherentes de fabricación de papel no iónicos DeTac® DC779F y DeTac® DC3970.

La endo-celulasa mono-componentes usada en las presentes composiciones de celulasa (Ejemplo 2-3 a Ejemplo 2-9) también fue usada en el Ejemplo Comparativo 1 y en los Ejemplos 2-1 a 2-2, tal como se muestra en la Tabla II. Adicionalmente, todas las composiciones de celulasa usadas en este estudio fueron preparadas frescas y evaluadas después de un día de almacenamiento a temperatura ambiente. Los resultados presentados en la Tabla II indican que los polímeros de control de contaminantes potenciaron la acción de la actividad de celulasa hacia el sustrato de CMC.

La celulasa multi-componente usada en las presentes composiciones de celulasa (Ejemplo 2-10 a Ejemplo 2-11) también se usó en el Ejemplo Comparativo 2, como se muestra en la Tabla II. Los resultados indican que los polímeros de control de contaminantes, Zenix® DC7429 y DeTac® DC3970, potenciaron la acción de la actividad de celulasa hacia el sustrato de CMC.

Tabla II. Actividad de celulasa de las composiciones de celulasa

Ejemplos	Descripción de las preparaciones	ECU/g (DNS)	Actividad relativa (viscosidad CMC)
Ejemplo Comparativo 1	15% de endo-celulasa mono-componente	750	100%
Ejemplo Comparativo 2	15% de celulasa multi-componente	1875	370%
Ejemplo 2-1	15% de endo-celulasa mono-componente, 11% de propilenglicol, y 11% de glicerol	740	101%
Ejemplo 2-2	15% de endo-celulasa mono-componente, 11% de propilenglicol, y 11% de glicerol, 0,05% de cloruro cálcico	810	114%
Ejemplo 2-3	15% de endo-celulasa mono-componente, 15% de Zenix® DC7429, 3,5% de propilenglicol, y 3,5% de glicerol, 0,05% de cloruro cálcico	820	128%
Ejemplo 2-4	15% de endo-celulasa mono-componente, 30% de Zenix® DC7429, 0,05% de cloruro cálcico	820	120%
Ejemplo 2-5	15% de endo-celulasa mono-componente, 15% de Zenix® DC7479, 3,5% de propilenglicol, y 3,5% de glicerol, 0,05% de cloruro cálcico	825	122%
Ejemplo 2-6	15% de endo-celulasa mono-componente, 15% de DeTac® DC786C, 3,5% de propilenglicol, y 3,5% de glicerol, 0,05% de cloruro cálcico	805	115%
Ejemplo 2-7	15% de endo-celulasa mono-componente, 15% de DeTac® DC779F, 0,05% de cloruro cálcico	820	119%
Ejemplo 2-8	15% de endo-celulasa mono-componente, 5% de DeTac® DC779F, 8,5% de propilenglicol, y 8,5% de glicerol, 0,05% de cloruro cálcico	815	123%
Ejemplo 2-9	15% de endo-celulasa mono-componente, 5% de DeTac® DC3970, 8,5% de propilenglicol, y 8,5% de glicerol, 0,05% de cloruro cálcico	827	125%

Ejemplo 2-10	15% de celulasa multi-componente, 15% de Zenix DC® 7429	2081	426%
Ejemplo 2-11	15% de celulasa multi-componente, 15% de DeTac® C3970	1988	444%

La Tabla II también ilustra la actividad de endo-celulasa mejorada de la presente composición de celulasa que contiene una pequeña cantidad de cloruro cálcico (Ejemplo 2-1) frente a la misma composición sin cloruro cálcico (Ejemplo 2-2).

5 Ejemplo 3. Estabilidad de celulasa de las composiciones de celulasa

El Ejemplo 3 demuestra que las presentes composiciones de celulasa formuladas con polímeros de control de contaminantes fueron más estables que las composiciones de celulasa originales en términos de actividad de endo-celulasa tras almacenamiento. Se determinó la actividad relativa de endo-celulasa de la presente composición de celulasa como el porcentaje de la celulasa original tras almacenamiento a 50°C durante 46 días y se usó un método de reducción de viscosidad CMC para evaluar la actividad relativa como se describe a continuación.

La actividad relativa de una composición de endo-celulasa convencional almacenada en un frigorífico (Ejemplo Comparativo 1 a 4°C) se midió y se usó como control de referencia como 100% activa. Cabe destacar que todos los ensayos se llevaron a cabo usando la misma celulasa activa. También cabe destacar que la diferencia entre la actividad de celulasa y la celulasa activa en una composición de celulasa es que el término “actividad de celulasa” se refiere a la actividad de celulasa medida mediante los ensayos DNS y de reducción de viscosidad CMC, mientras que la “celulasa activa” se refiere al porcentaje en peso de un producto de celulasa comercial en la composición de celulasa, y una celulasa comercial o convencional u original normalmente se considera 100% activa tal cual.

Tabla III. Estabilidad de celulasa de las composiciones de celulasa

Ejemplos	Descripción de las preparaciones	Tiempo (días)	Temp. (°C)	Actividad relativa (viscosidad CMC)
Ejemplo Comparativo 1	15% de endo-celulasa mono-componente	46	4	100%
Ejemplo Comparativo 1	15% de endo-celulasa mono-componente	46	50	54%
Ejemplo 2-2	15% de endo-celulasa mono-componente, 11% de propilenglicol, y 11% de glicerol, 0,05% de cloruro cálcico	46	50	67%
Ejemplo 2-3	15% de endo-celulasa mono-componente, 15% de Zenix® DC7429, 3,5% de propilenglicol, y 3,5% de glicerol, 0,05% de cloruro cálcico	46	50	98%
Ejemplo 2-5	15% de endo-celulasa mono-componente, 15% de Zenix® DC7479, 3,5% de propilenglicol, y 3,5% de glicerol, 0,05% de cloruro cálcico	46	50	94%
Ejemplo 2-6	15% de endo-celulasa mono-componente, 15% de DeTac® DC786C, 3,5% de propilenglicol, y 3,5% de glicerol, 0,05% de cloruro cálcico	46	50	86%
Ejemplo 2-7	15% de endo-celulasa mono-componente, 15% de DeTac® DC779F, 0,05% de cloruro cálcico	46	50	81%
Ejemplo 2-8	15% de endo-celulasa mono-componente, 5% de DeTac® DC779F, 8,5% de propilenglicol, y 8,5% de glicerol, 0,05% de cloruro cálcico	46	50	85%

20 Tal como se muestra en la Tabla III, la presente composición de celulasa (Ejemplo 2-3, 2-5, 2-6, 2-7 y 2-8) retuvo más del 81% de la actividad de la celulasa original tras ser almacenada a 50°C durante 46 días. La composición de celulasa en ausencia de un polímero de control de contaminantes presentó una actividad de tan solo el 54% de la composición convencional. Dos composiciones de celulasa (Ejemplo 2-3 y 2-5) formuladas con Zenix® DC7429 y Zenix DC® 7479 exhibieron más del 90% de la actividad de la celulasa original y fueron más activas que la celulasa original (Ejemplo Comparativo 1) tras el almacenamiento.

25 La celulasa puede sufrir desnaturalización proteínica y desactivación de forma rápida a temperaturas de 50°C o superiores. Por tanto, la caducidad de un producto de celulasa es un factor a considerar para aplicaciones industriales a gran escala, particularmente durante los meses calurosos de verano. Las presentes composiciones de celulasa han demostrado una estabilidad mejorada a temperaturas elevadas. También se monitorizó la estabilidad

física y se observó que las presentes composiciones de celulasa enumeradas en la Tabla III permanecieron homogéneas y transparentes sin sedimentación o sin desarrollo de color u olor a lo largo de los 46 días.

Ejemplo 4: Resistencia en seco de muestras de papel fabricadas a partir de fibra virgen

5 El Ejemplo 4 demuestra la mejora en las propiedades de resistencia en seco de muestras de papel fabricadas a partir de fibra virgen que había sido tratada con la presente composición de celulasa frente a la fibra tratada con la celulasa original. Se sometió a pulpación kraft blanqueada de madera blanca (SWBK) en agua con una consistencia del 3% y a continuación se trató con las presentes composiciones de celulasa y con las celulasa originales. La celulasa original se usó como control y se usó en la misma dosis que la celulasa activa a 50°C durante 1 hora con agitación efectiva como la composición de celulasa de la presente invención. La dosis activa de celulasa del control a 0,1% frente a fibra seca fue equivalente a aproximadamente 750 ECU por kg de pulpa seca. La pulpa de SWBK tratada fue mezclada a continuación con acabado de pulpa de kraft blanqueada de madera dura (HWBK) que había sido preparada a un 3% de consistencia en una proporción másica 30/70 (SWBK/HWBK). La pulpa de fibra virgen resultante presentó una soltura de 530 CSF (Canadian Standard Freeness) y se refinó hasta 480-490 CSF mediante un batidor valley de laboratorio usando el Método de Ensayo TAPPI 200 sp-01.

10

15 Se fabricaron muestras de papel que tenía una base de peso de 11,3 kg/278,7 m<sup>2</sup> (25 lb./3000 sq. ft.) en una máquina de laminación Noble and Wood a pH 7,0. Las muestras de papel fueron sometidas a prensa en húmedo hasta obtener un 33% de sólido y se secaron en un secadero de tambor a 115°C (240°F) durante 1 minuto produciendo un contenido de humedad de 3% a 5%. Se determinó la resistencia a tracción en seco (Método de Ensayo TAPPI T494, om-01) y el estallido Mullen (Método de Ensayo TAPPI T403). Las propiedades de resistencia en seco de las muestras de papel fabricadas con las presentes composiciones de celulasa fueron comparadas con muestras de papel fabricadas con la celulasa original en ausencia de los polímeros de control de contaminantes (Ejemplo 2-2, como control). Las propiedades de resistencia a la tracción en seco y el estallido Mullen de las muestras de papel se pueden observar en la Tabla IV, y están expresadas en % respecto al control.

20

Tabla IV. Resultados de resistencia en seco de las composiciones de celulasa

Ejemplos	Descripción de las preparaciones	Dosis (% p/p en base a fibra)	Resistencia a tracción en seco %	Estallido Mullen %
Ejemplo 2-2	15% de endo-celulasa mono-componente, 11% de propilenglicol, y 11% de glicerol, 0,05% de cloruro cálcico	0,1	100	100
Ejemplo 2-3	15% de endo-celulasa mono-componente, 15% de Zenix® DC7429, 3,5% de propilenglicol, y 3,5% de glicerol, 0,05% de cloruro cálcico	0,1	105	111
Ejemplo 2-7	15% de endo-celulasa mono-componente, 15% de DeTac® DC779F, 0,05% de cloruro cálcico	0,1	108	106
Ejemplo 2-9	15% de endo-celulasa mono-componente, 5% de DeTac® DC3970, 8,5% de propilenglicol, y 8,5% de glicerol, 0,05% de cloruro cálcico	0,1	107	103

25

Los resultados del Ejemplo 4 demuestran que la composición de celulasa de la presente invención (Ejemplo 2-3, 2-7 y 2-9) mejoró el resultado de resistencia en seco tanto en el estallido Mullen como en la resistencia a tracción en seco de las muestras de papel, en comparación con el control (Ejemplo 2-2). Experimentos separados indicaron que los polímeros de control de contaminantes usados solos con una celulasa, no generaron beneficios en la resistencia en seco del papel.

30

Ejemplo 5. Efecto de la dosis de celulasa en las propiedades de resistencia en seco de papel

El estallido Mullen de un producto de papel puede variar con las condiciones de tratamiento y la calidad de la fibra. Esto puede explicarse mediante la hipótesis de que el estallido Mullen es una combinación de diferentes propiedades del papel, que combinan la longitud de fibra y la unión inter-fibra. Se ha descubierto que la longitud de fibra dentro de un producto de papel se resiente cuando la pulpa de madera es tratada con una composición de celulasa antes del refinado.

35

El Ejemplo 5 demuestra el efecto de la dosis de una composición de celulasa sobre el estallido Mullen en comparación con la celulasa original. El Ejemplo 5 también proporciona una comparativa del estallido Mullen de una muestra de papel fabricada con endo-celulasa mono-componente frente a una celulasa multi-componente en el efecto de dosis sobre un producto de papel. Una mezcla con una proporción 30/70 p/p de SWBK/HWBK se sometió a pulpación en agua con una consistencia del 3% formando una suspensión. La temperatura de la suspensión se

40

ajustó a 50°C y se trató con una composición de celulasa en una dosis de 500 ECU a 5500 ECU por kg de pulpa seca y se agitó durante 1 hora. La pulpa tratada resultante se refinó a entre aproximadamente 400 CSF y aproximadamente 480 CSF mediante un molino PFI usando el Método de Ensayo TAPPI T-248. Se prepararon muestras de papel que tenían un peso base de 11,3 kg/278,7 m<sup>2</sup> (25 lb./3000 sq. ft.) en una máquina de papel Noble and Wood a pH 7 usando el mismo método descrito en el Ejemplo 3. El estallido Mullen de las muestras de papel fabricadas con la presente composición de celulasa (Ejemplo 2-7) se comparó con los Ejemplos Comparativos 1 y 2, expresado como porcentaje frente al blanco sin ningún tratamiento de celulasa de la fibra virgen antes del refinado.

Tabla V. Efecto de la dosis de celulasa de las presentes composiciones de celulasa frente a las composiciones de celulasa originales en el estallido Mullen de muestras de papel

Ejemplos	Descripción de la preparación	Dosis % p/p en base a fibra	ECU/kg de fibra	Estallido Mullen %
Ejemplo Comparativo 1	100% de endo-celulasa mono-componente	0,01	500	114
		0,02	1000	111
		0,04	2000	106
		0,1	5000	103
Ejemplo Comparativo 2	100% de celulasa multi-componente	0,01	1250	116
		0,02	2500	100
		0,04	5000	87
Ejemplo 2-7	15% de endo-celulasa mono-componente, 12% de DeTac® DC779F, 0,05% de cloruro cálcico	0,067	549	116
		0,133	1091	120
		0,67	5490	114

Como se muestra en la Tabla V, las muestras de papel fabricadas usando la celulasa original (Ejemplo Comparativo 1) muestran una tendencia a reducir el estallido Mullen desde un 14% de aumento a un 3% de aumento, según aumenta la dosis de celulasa desde 500 ECU/kg de fibra seca a 5000 ECU/kg de fibra seca. Esta tendencia en la propiedad de estallido Mullen no se observa con la composición de celulasa de la presente invención (Ejemplo 2-7), que presentó un incremento del 14% en el estallido Mullen a una dosis de 5490 ECU/kg de fibra y un 20% de aumento en el estallido Mullen a 1091 ECU/kg de fibra. Las muestras de papel fabricadas a partir de una celulasa multi-componente (Ejemplo Comparativo 2) contenían una cantidad significativa de actividad de exo-celulasa y presentaban un 16% de aumento en el estallido Mullen a 1.250 ECU/kg de fibra sobre la fibra tratada con la celulasa original. Sin embargo, cuando se incrementó la dosis a 5.000 ECU/kg de fibra con la presente composición, el estallido Mullen solo fue el 87% del control de celulasa mono-componente (Ejemplo Comparativo 2) en dosis comparables.

El Ejemplo 5 indica que tanto la selección del tipo de celulasa como el manejo de la dosis de actividad de celulasa desempeñan una función en la aplicación de resistencia en seco del papel. Una dosis excesiva de una celulasa multi-componente convencional respecto a la fibra celulósica puede dar como resultado una menor longitud de fibra y propiedades de resistencia en seco reducidas. Esto es particularmente cierto para el estallido Mullen de un producto de papel, debido a la acción de la actividad de exo-celobiohidrolasa que existe en el producto. Una dosis excesiva de una endo-celulasa mono-componente respecto a la fibra podría neutralizar la mejoría en las propiedades de resistencia en seco del papel que se puede obtener a una menor y apropiada dosis de actividad de celulasa. En una situación práctica, la concentración de celulasa puede desarrollarse inesperadamente elevada en un sistema de fabricación de papel si el licor blanco es recirculado en un sistema cerrado, o si la máquina de papel es desconectada para limpieza u otro mantenimiento. Adicionalmente, el Ejemplo 5 demuestra que las muestras de papel fabricadas usando la presente composición de celulasa a altas dosis de celulasa no presentan efecto negativo en el estallido Mullen.

Ejemplo 6. Resistencia en seco y resultado de drenaje de la composición de celulasa sobre la fibra recirculada

El Ejemplo 6 demuestra la mejora de las propiedades de resistencia en seco de la muestra de papel fabricada a partir de fibra reciclada tratada con la presente composición de celulasa y la celulasa original. Se sometió a pulpa de fibra reciclada de un medio 100% reciclado con una consistencia del 3% y se trató con las composiciones de celulasa de la presente invención y con la celulasa original como control. Se usaron dosis activas de celulasa de 0,02% en base a pulpa seca. El tratamiento se llevó a cabo a 50°C durante 1 hora con agitación efectiva. La pulpa resultante se refinó mediante un batidor valley de laboratorio usando el Método de Ensayo TAPPI 200 sp-01, durante 6 minutos en las mismas condiciones. Se midió la soltura antes y después del refinado. Se prepararon muestras de papel con una de peso de 36,3 kg/278,7 m<sup>2</sup> (80 lb./3000 sq. ft.) en una máquina de papel Noble and Wood a pH 7,0. Las muestras de papel fueron sometidas a prensa en húmedo hasta obtener un 33% de sólidos, y se secaron en un

secador de tambor a 115,6 °C (240 °F) durante 1 minuto para obtener una humedad del 3-5%. Se determinó la resistencia a tracción en seco (Método de Ensayo TAPPI T 494 om-01) y el aplastamiento de anillo (Método de Ensayo TAPPI T822 om-02) de las muestras de papel. Las propiedades de resistencia a tracción en seco y de aplastamiento de anillo fueron normalizadas y expresadas como % respecto al blanco.

5

Tabla VI. Resultados de resistencia en seco de las presentes composiciones de celulosa frente a las composiciones de celulosa originales en papel reciclado con alta base de peso

Ejemplos	Descripción de la preparación	Dosis (% p/p en base a fibra)	CSF pre-refino	CSF post-refino	Resistencia a tracción en seco %	Aplastamiento de anillo %
Blanco	Ninguna	0	357	322	100	100
Ejemplo Comparativo 1	100% de endo-celulosa mono-componente	0,02	415	360	105	115
Ejemplo 2-8	15% de endo-celulosa mono-componente, 5% de DeTac® DC779F, 8,5% de propilenglicol y 8,5% de glicerol, 0,05% de cloruro cálcico	0,133	425	390	109	114
Ejemplo 2-9	15% de endo-celulosa mono-componente, 5% de DeTac® DC3970, 8,5% de propilenglicol y 8,5% de glicerol, 0,05% de cloruro cálcico	0,133	433	398	106	123

Los resultados mostrados en la Tabla VI demuestran que la composición de celulosa de la presente invención (Ejemplo 2-9) proporcionó una mejora del 8% en el aplastamiento de anillo y un resultado equivalente en la resistencia a tracción en seco con respecto a la celulosa original (Ejemplo Comparativo 1). Se produjo una mejora de casi 40 CSF en el acabado de la fibra reciclada cuando la fibra fue tratada con la composición de celulosa de la presente invención (Ejemplo 2-9) sobre la fibra que fue tratada con la celulosa original después del refinado mecánico. Adicionalmente, una composición de celulosa alternativa según la presente invención (Ejemplo 2-8) proporcionó una mejora de 30 CSF en la soltura para el acabado post-refino.

#### Ejemplo 7. Drenaje de pulpa de fibra reciclada

El Ejemplo 7 demuestra la mejora del drenaje de la pulpa mediante el tratamiento de fibra reciclada con las presentes composiciones de celulosa con respecto a fibra celulósica tratada con la celulosa original. Se preparó una suspensión de pulpa reciclada usando un medio 100% reciclado a una consistencia de 3,3%. La temperatura de la suspensión se ajustó a 50°C y se trató con una composición de celulosa en una dosis de 0,03% de celulosa activa en base a la fibra seca, y la suspensión tratada se agitó durante 1 hora. La eficacia del drenaje de la presente composición de celulosa se comparó con la de la celulosa original y un blanco (que no tenía tratamiento de celulosa), usando un ensayo de drenaje a vacío (VDT, de las siglas inglés) como se describe a continuación. La comparación de la eficacia de drenaje también se llevó a cabo en presencia de una poli(vinilamina) catiónica, Hercobond® 6350 (Ashland Inc, Wilmington, DE, EE.UU.) a 0,2% en base a pulpa seca. Los resultados se resumen en la Tabla VII.

La instalación para el ensayo de drenaje a vacío (VDT) es similar a un ensayo en embudo Buchner, y consiste en un embudo de filtración Gelman magnético de 300 mL, una probeta de 250 mL, una desconexión rápida, una trampa de agua y una bomba de vacío con un indicador de vacío y un regulador. El ensayo VDT se llevó a cabo fijando primero el vacío en 33,9 kPa (10 pulgadas de Hg) y colocando el embudo sobre la probeta. Se cargaron doscientos cincuenta gramos de reserva de pulpa al 0,5% p/p en un vaso de precipitados y se añadió el polímero catiónico Hercobond® 6350 a la reserva mientras se agitaba con un mezclador de cabeza. La reserva se vertió entonces en el embudo de filtración y se encendió la bomba de vacío, a la vez que se puso en marcha simultáneamente un cronómetro. La eficacia de drenaje se presenta como el tiempo (segundos) requerido para obtener 230 mL de filtrado. Cuanto menor es el tiempo mejor es el drenaje de la pulpa.

Tabla VII. Mejora en el drenaje de fibra reciclada con composiciones de celulasa

Ejemplos	Descripción de la preparación	Dosis % p/p vs. fibra	Hercobond® 6350, % activo vs. fibra	VDT (segundos)
Blanco	Ninguna	-	-	79,5
Ejemplo Comparativo 1	100% de endo-celulasa mono-componente	0,03	-	72,4
Ejemplo Comparativo 4	DeTac® DC779F	0,1	-	78,6
Ejemplo Comparativo 5	DeTac® DC3970	0,1	-	77,8
Ejemplo 7-1	15% de endo-celulasa mono-componente, 5% de DeTac® DC779F	0,2	-	67,7
Ejemplo 7-2	15% de endo-celulasa mono-componente, 5% de DeTac® DC3970	0,2	-	69,0
Ejemplo Comparativo 6	Ninguna	-	0,2%	63,2
Ejemplo 7-3	Endo-celulasa mono-componente	0,03	0,2%	56,2
Ejemplo 7-4	15% de endo-celulasa mono-componente, 5% de DeTac® DC779F	0,2	0,2%	49,6
Ejemplo 7-5	15% de endo-celulasa mono-componente, 5% de DeTac® DC3970	0,2	0,2%	54,5

5 Tal como se muestra en la Tabla VII, la pulpa reciclada tratada con la presente composición de celulasa (Ejemplo 7-1 y 7-2) dieron como resultado una mejora del drenaje con un tiempo VDT reducido de 67,7 segundos y 69,0 segundos, respectivamente, en comparación con 72,4 segundos cuando la pulpa reciclada fue tratada con la celulasa original (Ejemplo Comparativo 1) y 79,5 segundos para el blanco. Los polímeros de control de contaminantes (anti-adherentes no iónicos) (Ejemplo Comparativo 4 y 5) no redujeron el tiempo VDT cuando se usaron solos. El Ejemplo 7 sugiere un efecto sinérgico de la endo-celulasa mono-componente y anti-adherentes no iónicos para mejorar el drenaje de un acabado de fibra reciclada.

10 La combinación de la presente composición de celulasa y poli(vinilamina) catiónica Hercobond® 6350 (Ejemplo 7-4) redujo adicionalmente el tiempo VDT hasta 49,6 segundos, mientras que la celulasa original y el Hercobond® 6350 (Ejemplo 7-3) redujo el tiempo VDT hasta 56,2, que fueron aproximadamente 6-7 segundos más que en el Ejemplo 7-4. Estos resultados del test de drenaje ilustran adicionalmente que la presente composición de celulasa proporciona mayores velocidades de drenaje de la pulpa cuando se usan también otros aditivos catiónicos para la fabricación de papel.

Ejemplo 8. Resistencia en seco de papel usando una combinación de la composición de celulasa y poli(vinilamina)

20 El Ejemplo 8 demuestra la mejora en el resultado de resistencia en seco de la presente composición de celulasa con respecto a la celulasa original cuando la composición de celulasa se usó en combinación con poli(vinilamina) Hercobond® 6350. Se sometió a pulpación una muestra de 100% de fibra reciclada hasta una consistencia del 3%. La suspensión de pulpa resultante fue tratada con composiciones de celulasa en una dosis de 0,2% en base a fibra seca durante 1 hora a 50 °C. A continuación, la suspensión tratada resultante fue refinada usando un batidor valley durante 3 minutos usando el Método de Ensayo TAPPI 200 sp-01. Se fabricaron muestras de papel de 22,7 kg/278,7 m<sup>2</sup> (50 lb./3000 sq. ft.) usando la suspensión tratada con celulasa con la adición de 0,2% de Hercobond® 6350 activo en base a pulpa seca usando los métodos descritos en los ejemplos previos. Los experimentos fueron llevados a cabo usando tanto la presente composición de celulasa como la celulasa original, en la misma dosis activa de celulasa. Se evaluó la resistencia a tracción en seco. Adicionalmente, se evaluó la resistencia a compresión de corto alcance STFI usando el Método TAPPI T-815. Estas propiedades de resistencia en seco se expresan como % respecto al control sin celulasa y Hercobond® 6350.

30



Tabla VIII. Resultados de resistencia en seco de la combinación de composición de celulasa y poli(vinilamina) sobre papel reciclado

Ejemplos	Descripción de la preparación	Dosis (% / fibra)	Hercobond® 6350, % activo vs. fibra	Resistencia a tracción en seco %	STFI %
Blanco	Ninguna	0	0,2	108	112
Ejemplo Comparativo 1	100% de endo-celulasa mono-componente	0,03	0,2	110	121
Ejemplo 7-5	15% de endo-celulasa mono-componente, 5% DeTac® DC3970	0,2	0,2	113	127

5 Los datos de la Tabla VIII indican que la presente composición de celulasa (Ejemplo 7-5) proporciona una mayor mejora en la resistencia a tracción en seco (113%) y en la STFI (127%), cuando se usa en combinación con Hercobond® 6350, que la fibra tratada con la celulasa original (Ejemplo Comparativo 1) en las mismas condiciones de tratamiento. El Ejemplo 8 también demuestra que el resultado diferenciador de la presente composición de celulasa frente a la celulasa original en la aplicación de resistencia en seco.

10 Ejemplo 9. Propiedades fijadoras y de retención usando las composiciones de celulasa

El Ejemplo 9 demuestra una menor turbidez de la pulpa de madera obtenida tratando la fibra con la presente composición de celulasa con respecto a la de la celulasa convencional, lo que indica una retención de fibra y unas propiedades fijadoras potencialmente mejores con la presente composición de celulasa. Se sometió a pulpación una mezcla de fibras vírgenes 30/70 p/p SWBK/HWBK hasta un 3,3% de consistencia, y la suspensión de pulpa resultante se trató con la composición de celulasa de la presente invención y las celulastas originales. El tratamiento se realizó a la misma concentración de celulasa activa a 50°C durante 1 hora a pH 7,0 con agitación efectiva. La pulpa tratada fue enfriada hasta aproximadamente 25°C y refinada a entre aproximadamente 480 CSF y aproximadamente 420 CSF con un batidor valley usando el Método de Ensayo TAPPI 200 sp-01. La suspensión de pulpa tratada fue añadida a una jarra Britt con papel de filtro Whatman 541 y se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente usando un agitador mecánico a 1000 rpm. La pulpa se filtró a vacío y se recogieron 150 mL de filtrado. Se usó un turbidímetro para medir la turbidez del filtrado como unidades de atenuación de formazina (FAU, de las siglas en inglés). Cuanto menor es el número FAU, mejor propiedad fijadora o de retención tiene la pulpa. Los datos de turbidez (FAU) se resumen en la Tabla IX, y las propiedades fijadoras de las presentes composiciones de celulasa y las celulastas originales también se expresan como porcentaje de turbidez de la muestra de papel del blanco (la muestra preparada con fibra sin tratar) y se muestran en la última columna de la Tabla IX. Cuanto menor es el porcentaje, mejores son las propiedades fijadoras y de retención de la muestra de papel.

Tabla VIII. Resultados de resistencia en seco de la combinación de composición de celulasa y poli(vinilamina) sobre papel reciclado

Productos	Descripciones	Dosis (% / fibra)	Turbidez (FAU)	% de turbidez del blanco
	Ninguna	-	87	100%
Ejemplo Comparativo 1	100% de endo-celulasa mono-componente	0,015	50	58%
Ejemplo 9-1	15% de endo-celulasa mono-componente, 15% Zenix® DC7429, 3,5% de propilenglicol y 3,5% de glicerol	0,1	30	35%
Ejemplo 9-2	15% de endo-celulasa mono-componente, 15% DeTac® DC786C, 3,5% de propilenglicol y 3,5% de glicerol	0,1	27	31%
Ejemplo 9-3	15% de endo-celulasa mono-componente, 5% DeTac® DC779F, 8,5% de propilenglicol y 8,5% de glicerol	0,1	34	39%

30 Tal como se muestra en la Tabla IX, la suspensión de pulpa tratada con las presentes composiciones de celulasa (Ejemplo 9-1 a 9-3) proporciona filtrados que tienen un 20-30% menos de turbidez que cuando son tratadas con la

celulasa original (Ejemplo Comparativo 1). Estos resultados indican que las presentes composiciones de celulasa proporciona una mejor retención de fibra que las celulasas originales.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición para tratar fibras celulósicas usadas para fabricar papel o cartón que comprende:

a) celulasa;

5 b) polímero(s) de control de contaminantes seleccionado(s) del grupo que consiste en polímero(s) anti-adherente(s), polímero(s) fijador(es) catiónico(s), y mezclas de los mismos;

c) estabilizante(s) de proteína celulasa; y

d) potenciador(es) de celulasa,

10 en donde la concentración de celulasa activa está entre aproximadamente 2% en peso de la composición total y aproximadamente 80% en peso de la composición total; el anti-adherente de control de contaminantes y/o el polímero fijador catiónico está entre aproximadamente 2% en peso de la composición total y aproximadamente 50% en peso de la composición total; el contenido de estabilizante de proteína está entre 0,1% en peso de la composición total y aproximadamente 50% en peso de la concentración total, y el contenido del potenciador de celulasa está entre 0,1% en peso de la composición total y aproximadamente 0,5% en peso de la composición total;

15 en donde el porcentaje en peso activo de la endo-celulasa o celulasa activa en la composición de celulasa se basa en la suposición de que la celulasa convencional es 100% activa tal cual se obtiene de una fuente comercial;

20 en donde los porcentajes activos del polímero de control de contaminantes, el estabilizante de proteína y el potenciador de celulasa de la composición de celulasa se definen como partes no acuosas de dichos polímeros o compuestos químicos en la composición de celulasa;

en donde el polímero anti-adherente se selecciona del grupo que consiste en poli(vinil alcohol-co-vinil acetato), polietilenglicol modificado hidrofóticamente, hidroxietil celulosa modificada hidrofóticamente, copolímeros de bloque hidrofóbicos/hidrofílicos, proteínas tensioactivas tales como proteína de suero, proteína de huevo y proteína de soja, y mezclas de los mismos; y

25 en donde el polímero fijador se selecciona del grupo que consiste en poli(cloruro de dialildimetilamonio), polímeros de condensación de dimetilamina-epiclorhidrina-etilendiamina, poli(acrilamida) catiónica, poli(acrilamida glioxilada, poli(etilenimina), poli(amidoamina) reaccionada con epiclorhidrina, poli(vinilamina), polímeros catiónicos modificados hidrofóticamente, poli(aminoamida) modificada con C8-C10 alquil glicidil éter, polímeros anfotéricos que son catiónicos netos, y mezclas de los mismos.

30 2. La composición de la reivindicación 1, en donde la celulasa es una endo-celulasa.

3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en donde la celulasa es una endo-celulasa mono-componente.

4. La composición de la reivindicación 3, en donde la endo-celulasa mono-componente es una celulasa que deriva de una fuente de microorganismo.

5. La composición de la reivindicación 1, en donde la celulasa es una celulasa multi-componente.

35 6. La composición según la reivindicación 1, en donde los polímeros catiónicos modificados hidrofóticamente se seleccionan del grupo que consiste en polietilenimina (PEI) alquilada, poli(lisina) alquilada, homo- y co-polímeros de vinilamina alquilados, poli(aminoamida) alquilada, poli(acrilamida) alquilada, copolímeros de vinilamina que contienen grupos amino con monómeros hidrofóbicos, copolímeros de cloruro de dimetil dialil amonio con monómeros hidrofóbicos, copolímeros de acrilato que contienen grupos amino con monómeros hidrofóbicos, y polisacáridos naturales y modificados alquilados que contienen amino, proteínas catiónicas alquiladas y mezclas de los mismos.

40 7. La composición según la reivindicación 1, en donde los polímeros anfotéricos que son catiónicos netos se seleccionan del grupo que consiste en polímero de acrilamida anfotérico formado a partir de monómeros tanto aniónicos como catiónicos, el polímero de vinilamida anfotérico formado a partir de monómeros tanto aniónicos como catiónicos, un derivado de cloruro de dimetil dialil amonio anfotérico, un poli(copolímero de acrilamida-co-ácido acrílico-co-cloruro de dimetil alil amonio), poli(copolímero de ácido acrílico-co-cloruro de dimetil dialil amonio), almidón anfotérico, polisacáridos anfotéricos, polímero de micropartículas poliméricas anfotéricas, y mezclas de los mismos.

50 8. La composición de la reivindicación 1, en donde el estabilizante de proteína de celulasa se selecciona del grupo que consiste en propilenglicol, glicerol, etilenglicol, sorbitol, ácido láctico, glucosa, galactosa, maltodextrina, oligosacáridos, jarabe de maíz, sales inorgánicas tales como cloruro sódico y cloruro potásico, un sistema tampón de pH tal como fosfatos sódicos, fosfatos potásicos, ácido cítrico, tris(hidroximetil)metilamina (Tris), ácido 4-2-hidroxietil-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES); piperazina-N,N-bis(ácido 2-etanosulfónico), y ácido 2-(N-

morfolino)etanosulfónico; ligandos de proteínas tales como glucosa o N-acetil-D-glucosamina; y mezclas de los mismos.

**9.** La composición de la reivindicación 1, en donde el potenciador de celulosa es una sal de ion metálico seleccionada del grupo que consiste en cloruro de calcio, cloruro de cinc y cloruro de magnesio.

5 **10.** La composición según la reivindicación 1, en donde la celulosa es una endo-celulosa mono-componente; el polímero de control de contaminantes es poli(vinil acetato-co-vinil alcohol) o polietilenglicol modificado hidrofóbicamente, o una mezcla de los mismos; el estabilizante de celulosa es un propilenglicol, glicerol, sorbitol o mezclas de los mismos; y el potenciador de celulosa es cloruro de calcio.

10 **11.** La composición según la reivindicación 1, en donde la celulosa es una endo-celulosa mono-componente, el polímero de control de contaminantes es un polímero fijador catiónico o mezclas de polímeros de los mismos; el estabilizante de celulosa es propilenglicol, glicerol, sorbitol, o mezclas de los mismos; y el potenciador de celulosa es cloruro cálcico.

**12.** Un método para fabricar papel o cartón que comprende:

15 proporcionar una composición de celulosa según la reivindicación 1, que comprende: celulosa; un(os) polímero(s) de control de contaminantes; estabilizante(s) de proteína celulosa; y potenciador(es) de celulosa;

en donde la composición de celulosa tiene una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 70°C y un pH de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 9, y se añade a una suspensión de pulpa en una cantidad en actividad de celulosa que oscila entre aproximadamente 5 ECU y aproximadamente 2.500 ECU por kilogramo de fibra de madera seca para producir una suspensión de pulpa tratada;

20 poner en contacto la composición de celulosa con la suspensión de pulpa durante al menos 10 minutos antes de refinar la suspensión de pulpa tratada;

refinar la suspensión de pulpa tratada hasta un grado de soltura deseado; y

conformar un papel o cartón.

**13.** El método según la reivindicación 12, que además comprende:

25 añadir uno o más aditivos de fabricación de papel a la pulpa o a la suspensión de pulpa tratada.

30 **14.** El método según la reivindicación 13, en donde el aditivo de fabricación de papel se selecciona del grupo que consiste en aditivos de fabricación de papel para resistencia en seco seleccionados del grupo que consiste en almidón, derivados de almidón, derivados de poliacrilamida, goma guar, poli(vinilamina), aditivos de fabricación de papel de resistencia en húmedo seleccionados del grupo que consiste en polietilenimina, resina de urea formaldehído, poli(aminoamida) reaccionada con epíclorhidrina, aldehído de almidón y poliacrilamida glioxilada; floculantes, aditivos de retención, aditivos de drenaje, desligantes; agente de dimensionamiento para productos de papel, y adhesivos "creping"; enzimas de fabricación de papel seleccionadas del grupo que consiste en hemicelulasas, amilasas, proteasas, lipasas, esterases, pectinasas, liasas, pectato liasa, celulasa, oxidorreductasas, lacasas, glucosa oxidasas y peroxidasas.