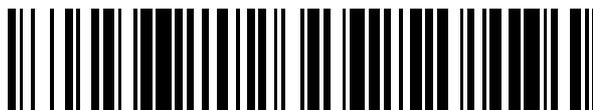


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 454**

51 Int. Cl.:

C12N 9/24 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

C12P 19/02 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2013** **E 13006045 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018** **EP 2886648**

54 Título: **Composición enzimática para hidrolizar biomasa**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.07.2018

73 Titular/es:

CLARIANT INTERNATIONAL LTD (100.0%)
Rothausstrasse 61
4132 Muttenz, CH

72 Inventor/es:

REISINGER, CHRISTOPH;
RÖCHER, LUTZ;
KRAUS, MICHAEL y
GAMAUF, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 676 454 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 enzimática para hidrolizar biomasa

5 La presente invención se dirige a una composición enzimática para hidrolizar biomasa que comprende al menos una celulasa, al menos una hemicelulasa y al menos una pectinasa. En un aspecto adicional, la presente invención se dirige a un método para hidrolizar biomasa que implementa esta composición enzimática y el uso de la composición enzimática para hidrolizar biomasa.

10 La biomasa procedente de fuentes tales como remolacha azucarera, maíz, paja y otro material que contiene sacáridos o polisacáridos y pectinas es una fuente valiosa de sacáridos refinados tales como azúcares monoméricos o diméricos.

Dentro del estado de la técnica, se han aplicado diversos procesos para separar o extraer estos compuestos de dicha biomasa. Generalmente, estos métodos permiten la simple separación o extracción de azúcares monoméricos y diméricos del material de biomasa tal como la remolacha azucarera, sin embargo, la mayoría de los compuestos que contienen sacáridos tales como celulosa, hemicelulosa, lignina y/o pectina se descartan regularmente.

15 En un método bien establecido, el azúcar monomérico y dimérico se separan de, p. ej. la remolacha azucarera mediante extracción de remolacha azucarera triturada con agua caliente en un proceso continuo a contraflujo. Generalmente, estos métodos requieren la adición de agentes adicionales tales como CaO en una cantidad de alrededor de 1 a 3 kg de CaO por 100 kg de remolacha azucarera. Los productos de este método son la solución de azúcar llamada jugo bruto y la llamada pulpa de remolacha, esta última se seca en un secador de pulpa. El jugo
20 bruto se mueve a través de varias etapas de purificación y filtración para retirar las impurezas y sustancias no azucaradas para producir jugo espeso (65 a 70% de contenido de materia seca) o, después de la cristalización, azúcar refinado. Las condiciones de temperatura y pH elevadas durante este método causan la destrucción de una cantidad crucial de azúcares monoméricos contenidos en la solución debido a la formación de compuestos ácidos y coloreados. Además, se libera amoníaco a la atmósfera debido a la descomposición de compuestos de nitrógeno haciendo especial referencia a amidas. Además, la llamada pulpa de remolacha todavía contiene no solo la mayoría
25 de las proteínas de la remolacha azucarera sino también la mayoría de polisacáridos tales como celulosa, hemicelulosa y pectina. Según la German Zuckerverband, en 2011/2012, se produjo un total de 4266670 t de azúcar en Alemania (dado como "t Weibzuckerwert") correspondiente a 1907302 t Schnitzel ("remanente") (indicado como "t Trockenschnitzelwert"). Como consecuencia, aproximadamente 0,45 t de remanente por t de azúcar surgen como material de desecho (<http://www.zuckerverbaende.de/zuckermarkt/zahlen-und-fakten/zuckermarkt-deutschland/ruebenanbau-zuckererzeugung.html>).
30

Para superar estos inconvenientes, se han ensayado otras posibilidades de degradación de biomasa, tales como el uso de enzimas hidrolíticas. Ya existen composiciones enzimáticas comerciales procedentes de fuentes fúngicas naturales disponibles para la hidrólisis de biomasa, p. ej. el producto "Pectinex®" que contiene pectinasas,
35 hemicelulasas y celulasas como actividad secundaria y el producto "Celluclast®" que contiene principalmente celulasas y hemicelulasas (ambas por Novozymes®). El uso de tales productos comerciales se describe en los documentos US 4.886.672 y EP 2 256 208 A1.

Hasta ahora, estos productos son, sin embargo, apenas aplicables a los métodos de producción a gran escala ya que la tasa de degradación de biomasa es todavía relativamente baja. Por lo tanto, el tiempo de proceso necesario
40 para una hidrólisis sustancial de la biomasa es todavía considerablemente elevado y, por lo tanto, la aplicación de estos productos comercialmente disponibles para fines industriales es limitada.

Por lo tanto, existe la necesidad de una composición enzimática nueva y de alto rendimiento que permita la degradación y/o hidrólisis completa de biomasa que contiene sacáridos y/o polisacáridos dentro de un tiempo razonable. Además, existe la necesidad dentro del estado de la técnica de una composición enzimática de tan alto
45 rendimiento que se pueda producir de forma rentable en grandes cantidades. Además, existe la necesidad de una composición enzimática de tan alto rendimiento que se pueda aplicar a métodos de hidrólisis a escala industrial.

Por lo tanto, el objeto subyacente de la presente invención es proporcionar un método para hidrolizar biomasa que no muestre ninguna de las desventajas de los métodos conocidos dentro del estado de la técnica.

50 Los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que los problemas asociados con las composiciones enzimáticas conocidas dentro del estado de la técnica se pueden resolver mediante una composición enzimática que comprende al menos una celulasa, al menos una hemicelulasa y al menos una pectinasa, en donde la al menos una hemicelulasa comprende una Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa (EC 3.2.1.99) con una actividad degradante de arabinano de al menos 10 U/mg de proteína

55 en donde la actividad degradante de arabinano de la Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa de (EC 3.2.1.99) es de 8 a 100 veces más que la actividad degradante de celulosa de la al menos una celulasa,

en donde la actividad degradante de arabinano de la Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa (EC 3.2.1.99) es de 10 a 250 veces más que la actividad degradante de pectina de la al menos una pectinasa, y

en donde cuando está presente otra hemicelulasa en la composición, la actividad degradante de arabinano de la Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa (EC 3.2.1.99) es de 0,25 a 5 veces más que la actividad degradante de hemicelulosa de la al menos una hemicelulasa.

5 Los términos "celulasa", "hemicelulasa" y "pectinasa" como se utilizan en la presente invención se refieren a cualquier enzima que está implicada en la escisión hidrolítica de celulosa polimérica, hemicelulosa y/o pectina, respectivamente, a azúcares monoméricos. Como se utiliza en la presente invención, los términos "celulasa", "hemicelulasa" y "pectinasa" se refieren tanto a enzimas de origen natural como de origen no natural o mezclas que incluyen una pluralidad de enzimas producidas por un organismo, por ejemplo un hongo filamentoso. Las
10 "celulasas", "hemicelulasas" y "pectinasas" se obtienen preferiblemente a partir de hongos tales como los pertenecientes a la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota*, que incluyen, pero no se limitan a, los siguientes géneros: *Aspergillus*, *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Beauveria*, *Cephalosporium*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochiobolus*, *Cryptococcus*, *Cyathus*, *Endothia*, *Endothiamucor*, *Fusarium*, *Gilocladium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Myceliophthora*, *Myrothecium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Phanerochaete*, *Podospora*, *Paecilomyces*,
15 *Pyricularia*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Schizophyllum*, *Stagonospora*, *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Thermomyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trichophyton* y *Trametes*. En una realización preferida, el hongo filamentoso es una especie de *Trichoderma*.

En una realización preferida de la composición enzimática según la presente invención, a al menos una celulasa, hemicelulasa y/o pectinasa procede de una fuente fúngica. Dentro de una realización particularmente preferida de la
20 composición enzimática según la presente invención, esta fuente fúngica es *Trichoderma reesei*.

El término "mezcla de enzimas" se refiere preferiblemente a una mezcla de enzimas secretadas a partir de una o más fuentes microbianas. En algunas realizaciones, las enzimas para uso en esta/s mezcla/s de enzimas se pueden preparar a partir de una o más cepas de hongos filamentosos de origen natural o modificadas por ingeniería genética. Las cepas preferidas se enumeran arriba. La proporción deseada de componentes enzimáticos dentro de
25 la/s mezcla/s final/es se puede lograr alterando la cantidad relativa de enzima en la mezcla final, p. ej. mediante la suplementación de enzima/s purificada/s o parcialmente purificada/s.

Como se utiliza en la presente invención, el término "celulasa" se refiere a cualquier enzima o mezcla de enzimas capaces de hidrolizar polímeros de celulosa a oligómeros más cortos y/o glucosa.

La al menos una celulasa en la composición enzimática según la presente invención se selecciona preferiblemente
30 entre celobiohidrolasas (EC 3.2.1.-), endo-1,4-β-glucanasa (EC 3.2.1.4), β-glucosidasa (EC 3.2.1.4), celobiosa hidrolasa (EC 3.2.1.21), glucósido hidrolasa 61 (GH61 y CBM33), proteínas Expansinas, Swolleninas, Looseninas y CIP (EC 3.1.1.-; CE15).

En una composición enzimática preferida, el término "celulasa" comprende al menos una enzima seleccionada del grupo de celobiohidrolasas (EC 3.2.1.-) y endo-1,4-β-glucanasa (EC 3.2.1.4).

35 Como se utiliza en la presente invención, el término "hemicelulasa" se refiere a cualquier enzima o mezcla de enzimas capaces de degradar o ayudar a la degradación de la hemicelulosa.

El término "Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa" se refiere a Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidase EC 3.2.1.99. Dentro de la presente invención, la Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa EC 3.2.1.99 tiene una actividad degradante de arabinano de 10 a 100 U/mg de proteína, preferiblemente de 10 a 65 U/mg de proteína, más
40 preferida de 20 a 65 U/mg de proteína y de 20 a 50 U/mg de proteína.

La Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa, tal como se utiliza en la composición enzimática de la presente invención, se puede expresar mediante una fuente bacteriana o fúngica. La Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidase se deriva preferiblemente de hongos tales como *Aspergillus terreus*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae*, *Fomes fomentarius*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus aculeatus*, *Cylindro carponcongoense*, *Nectria haematococca*, *Myceliophthora thermophile*, *Chaetomium globulosum*, *Trametes versicolor* o *Aspergillus nidulans*. La Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa se puede producir mediante expresión en un organismo endógeno o se puede producir mediante expresión en un organismo heterólogo. Preferiblemente, las enzimas primarias y accesorias se producen mediante expresión en *Trichoderma reesei*.
45

Cualquiera de las hemicelulasas adicionales contenidas en la composición enzimática según la presente invención además de la Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa, cualquiera de las hemicelulasas se seleccionan preferiblemente de las β-glucanasas (EC 3.2.1.-), endoxilanasas (EC 3.2.1.8), β-xilosidasas (EC 3.2.1.37), acetilxilano esterasa (EC 3.1.1.72), acetilgalactano esterasa (3.1.1.6), acetilmanano esterasa, feruloil esterasa (EC 3.1.1.73), glucuronoil esterasa (EC 3.1.1.-), α-L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55), α-arabinopiranosidasa (3.2.1.-), α-galactosidasa (EC 3.2.1.22), β-galactosidasa (EC 3.2.1.23), α-glucuronidasa (EC 3.2.1.139), β-manasa (EC 3.2.1.78), β-manosidasa (EC 3.2.1.25), manano 1,4-manobiosidasa (EC 3.2.1.99), arabinogalactano endo-beta-1,4-galactanasa (EC 3.2.1.89), endo-beta-1,3-galactanasa (EC 3.2.1.90), galactano endo-beta-1,3-galactanasa (EC 3.2.1.181), glucuronoarabinoxilano endo-1,4-beta-xilanasas (EC 3.2.1.136), alfa-L-fucosidasa (EC 3.2.1.51), coniferina beta-glucosidasa (EC 3.2.1.126), xiloglucano hidrolasas (EC 3.2.1.150, 151, 155), xilano α-1,2-glucuronosidasa (EC 3.2.1.131), endo-xilogalacturonano hidrolasas (EC 3.2.1.-; GH28), α-amilasa (EC 3.2.1.1),
50
55

5 glucano 1,4- α -glucosidasa (EC 3.2.1.3), galactano 1,3-galactosidasa (GH43), -1,4-endogalactanasas (EC 3.5.1.89; GH53), α -ramnosidasa (EC 3.2.1.40), β -ramnosidasa (EC 3.2.1.43), lignina peroxidasa (EC 1.11.1.14), Mn peroxidasa (EC 1.11.1.13), aril-alcohol oxidasa (EC 1.1.3.7), glioxal oxidasa (EC 1.1.3.), carbohidrato oxidasas (EC 1.1.3.4, 9, 10) y celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.18).

En una composición enzimática preferida, el término "hemicelulasa" comprende al menos una hemicelulasa seleccionada del grupo de xilanasas, xilosidasas, esterases, arabinofuranosidasas, galactanasas, peroxidadas y oxidasas. Se prefiere particularmente que la composición enzimática según la presente invención comprenda al menos una xilanasas, arabinofuranosidasa y/o galactanasas.

10 Como se utiliza en la presente invención, el término "pectinasa" se refiere a cualquier enzima o combinación de enzimas capaz de degradar o ayudar a la degradación de la pectina.

15 La al menos una pectinasa en la composición enzimática según la presente invención se selecciona preferiblemente de poligalacturonasas (EC 3.2.1.15, 67, 82; GH28), pectina-/pectatoliasas (EC 4.2.2.2, 6, 9, 10), pectin metilesterasa (EC 3.1.1.11), pectin acetilesterasas (EC 3.1.1.-), ramnogalacturonasas (EC 3.2.1.-; GH28), ramnogalacturonano acetilesterasa (EC 3.1.1.86), ramnogalacturonanoendoliasa (EC 4.2.2.23), ramnogalacturonanoliasas (EC 4.2.2.-), ramnogalacturonano galacturonohidrolasas (EC 3.2.1.-), xilogalacturonano hidrolasas (EC 3.2.1.-), pectin metilesterasa (EC 3.1.1.11), beta-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55), beta-1,4-galactanasas (EC 3.2.1.89), beta-1,3-galactanasas (EC 3.2.1.90), beta-galactosidasa (EC 3.2.1.23), alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22), feruloil acetil esterases (EC 3.1.1.-), alfa-fucosidasa (EC 3.2.1.51), beta-fucosidasa (EC 3.2.1.38), beta-apiosidasas (EC 3.2.1.-), alfa-ramnosidasa (EC 3.2.1.40), beta-ramnosidasa (EC 3.2.1.43), alfa-arabinopiranosidasas (EC 3.2.1.-), beta-glucuronidasa (EC 3.2.1.31), alfa-glucuronidasa (EC 3.2.1.139), beta-xilosidasa (EC 3.2.1.37) y alfa-xilosidasas (EC 3.2.1.-).

En una composición enzimática preferida, el término "pectinasa" comprende al menos una pectinasa seleccionada del grupo de pectinesterasas, poligalacturonasas, pectinliasas, manosidasas y ramnogalacturonasas.

25 La actividad degradante de arabinano de la Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa (EC 3.2.1.99) es de 8 a 100 veces, preferiblemente de 10 a 70 veces más que la actividad degradante de celulosa de la al menos una celulasa.

La actividad degradante de arabinano de la Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa (EC 3.2.1.99) es de 10 a 250 veces, preferiblemente de 12 a 100 veces, más preferida de 15 a 70 veces más que la actividad degradante de pectina de la al menos una pectinasa.

30 Cuando está presente otra hemicelulasa en la composición, la actividad degradante de arabinano de la Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa (EC 3.2.1.99) es de 0,25 a 5 veces, preferiblemente de 0,5 a 2 veces más que la degradación de actividad de hemicelulosa de la al menos una hemicelulasa.

35 La composición enzimática según la presente invención preferiblemente carece de cualquier enzima invertasa (E.C. 3.2.1.26). Esto es particularmente preferido en caso de que el uso de la composición enzimática en un método para hidrolizar biomasa esté destinado a producir azúcar granulado para aplicaciones alimentarias.

Las enzimas a las que se hace referencia en la presente invención se clasifican según nomenclaturas que están basadas en la International Union of Biochemistry and Molecular Biology's Enzyme Nomenclature and Classification (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>) o en la base de datos Carbohydrate-Active EnZymes (<http://www.cazy.org/>).

40 El término "actividad" de una enzima como se utiliza en la presente invención se refiere a la actividad catalítica de la enzima bajo condiciones apropiadas bajo las cuales la enzima sirve como catalizador de proteína, que convierte sustratos poliméricos o artificiales específicos en productos oligoméricos o monoméricos específicos. En este contexto, el término "condiciones apropiadas" es bien conocido y aplicable por una persona experta en la técnica.

45 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una composición enzimática como se definió anteriormente para hidrolizar biomasa.

50 El término "biomasa" tal como se utiliza dentro de la presente invención se refiere a cualquier tipo de biomasa conocida por los expertos en la técnica como adecuada para el método inventivo. La biomasa de origen vegetal es particularmente preferida. En una realización preferida adicional, el contenido de materia seca inicial de la biomasa se selecciona de 5 a 50% en peso, preferiblemente de 10 a 45% en peso, más preferido de 15 a 42% en peso y lo más preferido de 20 al 40% en peso. El término "materia seca" (m.s.) se refiere a la relación entre la masa y la biomasa determinada después de que el agua y otros compuestos volátiles se hayan retirado del tejido fresco utilizando un balance IR. Por lo tanto, se prefiere particularmente seleccionar una biomasa en la que su materia seca contenga al menos 25% en peso de sacáridos tales como azúcares monoméricos, azúcares diméricos y oligosacáridos y/o polisacáridos, más preferido al menos 40% en peso, particularmente preferido al menos 60% en peso, más preferido al menos 80% en peso de sacáridos tales como azúcares monoméricos, azúcares diméricos y oligosacáridos y/o polisacáridos. Además, cualquier mezcla de biomasa adecuada se debe incluir dentro del término "biomasa".

- La biomasa particularmente preferida es "biomasa de remolacha azucarera" o "biomasa de caña de azúcar". El término "biomasa de remolacha azucarera" se refiere al tejido de la raíz completo y no procesado de *Beta vulgaris*, que incluye la cáscara externa y la pulpa interna. El tejido seco de *Beta vulgaris* contiene 80% en peso de sacarosa soluble, mientras que la pulpa de remolacha contiene aproximadamente 7% en peso de pectina, 7% en peso de celulosa y 7% en peso de hemicelulosa, 17% en peso de arabinosa, 20% en peso de glucosa y 3,5% en peso de fructosa y 10% en peso de proteínas, todas relativas a la materia seca (ms) de la biomasa. El término "biomasa de remolacha azucarera" comprende además pulpa de remolacha azucarera (virutas de remolacha azucarera).
- El término "biomasa de caña de azúcar" se refiere a los tallos completos y no procesados de *Saccharum sp.* que incluye la cáscara externa y la pulpa interna. El tejido seco de *Saccharum sp.* contiene 80% en peso de sacarosa soluble, mientras que el bagazo de caña seca está compuesto de aproximadamente 70% en peso de azúcares poliméricos, que incluye 45% en peso de celulosa, 23% en peso de lignina y 25% en peso de hemicelulosa principalmente en forma de xilano, todo relativo a la materia seca (ms) de la biomasa. El término "biomasa de caña de azúcar" comprende adicionalmente torta prensada de caña de azúcar (bagazo).
- Otra biomasa adecuada para el método de la presente invención comprende productos de desecho procedentes de silvicultura y agricultura, la industria del procesamiento de alimentos y de papel y los residuos comunales. En particular, el término "biomasa" como se utiliza en la presente invención incluye paja de cereal y espelta (tales como trigo, centeno, cebada, avena), paja de maíz y tallos del maíz, estiércol de establos, materiales herbáceos y pastos tales como *Sericea lespedeza*, pasto varilla (*Panicumvirgatum*), pasto de Napier (*Miscanthus*; caña de China) y pasto de Sudán (*Sorghum sudanense*, *Sorghum drummondii*), cortezas, virutas de madera y astillas, pulpa de fruta, residuos de agave, molindas de café y residuos de almazaras tales como torta prensada de colza y aguas residuales de molinos, caldos de la fabricación de papel y aguas residuales de fábricas de papel, papel usado, restos de verduras y frutas.
- En una realización preferida del método de la presente invención, la biomasa se selecciona de celulosa, hemicelulosa y/o biomasa que contiene lignina.
- En una realización particularmente preferida del método de la presente invención, la biomasa se selecciona de remolacha azucarera, caña de azúcar, paja, maíz, madera, semillas oleaginosas y mezclas de las mismas.
- En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para hidrolizar biomasa que comprende las etapas de
- a) Poner en contacto la biomasa con una composición enzimática como se definió anteriormente;
 - b) Someter al menos una parte de la biomasa a una filtración y separar el filtrado.
- Según la presente invención, el "contacto" se puede llevar a cabo mediante cualquier método, conocido por una persona experta en la técnica, adecuado para el método de la invención. En una realización preferida, el "contacto" de la biomasa con la composición enzimática se lleva a cabo añadiendo la composición enzimática a la biomasa. Preferiblemente, el contacto es seguido por la mezcla de la biomasa con la composición enzimática.
- Durante el contacto de la biomasa con la composición enzimática, la temperatura se selecciona preferiblemente de 25 a 80°C, más preferida seleccionada de 45 a 75°C y particularmente preferida de 48 a 70°C.
- En una realización particularmente preferida, el método para hidrolizar biomasa se lleva a cabo durante 1 minuto a 100 horas, más preferido durante 10 minutos a 80 horas, particularmente preferido durante 30 minutos a 40 horas, incluso más preferido durante 1 hora a 30 horas también particularmente preferido de 2 horas a 20 horas y lo más preferido de 3 a 12 horas.
- En otra realización preferida, la etapa (a) del método para hidrolizar biomasa se lleva a cabo durante 1 a 80 horas, preferiblemente de 2 a 40 horas, más preferido de 3 a 20 horas en donde la temperatura se selecciona de 45 a 75°C o de 48 a 70°C.
- De este modo, es posible seleccionar diferentes temperaturas durante ciertos períodos de tiempo mientras se lleva a cabo la etapa a) del método de la presente invención. En otra realización preferida del método para hidrolizar biomasa, la etapa a) del método se lleva a cabo preferiblemente durante un primer período de tiempo de 1 a 5 horas, preferiblemente de 2 a 3 horas a una temperatura de 35 a 45°C, preferiblemente 40 °C; posteriormente durante un segundo período de tiempo de 1 a 5 horas, preferiblemente de 2 a 3 horas a una temperatura de más de 45 a 55°C, preferiblemente 50°C; posteriormente durante un tercer período de tiempo de 1 a 4 horas, preferiblemente de 1,5 a 2 horas a una temperatura de más de 55 a 65°C, preferiblemente 60°C. Una ventaja particular de la composición enzimática de la presente invención es que después de un aumento subsiguiente de la temperatura del método a lo largo del tiempo como se describió anteriormente, se puede lograr un aumento adicional de la eficiencia e hidrólisis de la biomasa. La composición enzimática se añade preferiblemente a la biomasa en una cantidad de 0,025 a 8% en peso de la materia seca inicial de la biomasa, más preferida de 0,05 a 4% en peso de la materia seca de la biomasa, siendo particularmente preferido de 0,08 a 2% en peso de la materia seca de la biomasa y lo más preferido de 0,1 a 0,2% en peso de la materia seca de la biomasa.

5 En una realización preferida adicional, el contenido de materia seca inicial de la biomasa se selecciona de 5 a 50% en peso, preferiblemente de 10 a 45% en peso, más preferido de 15 a 42% en peso y lo más preferido de 20 al 40% en peso. El término "materia seca" (m.s.) se refiere a la proporción de masa a biomasa determinada después de que el agua y otros compuestos volátiles se hayan retirado del tejido fresco utilizando un balance IR.

En una realización preferida adicional, la biomasa se pone en contacto con todas las mezclas de enzimas y la Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa (EC 3.2.1.99) de la composición enzimática de la invención al mismo tiempo, sin embargo, también es posible poner en contacto la biomasa por etapas con las diferentes mezclas de enzimas y la Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa (EC 3.2.1.99) de la composición enzimática de la invención.

10 En una realización preferida adicional, el método para hidrolizar biomasa se lleva a cabo hasta que el contenido de sólidos secos insolubles restantes dentro de la biomasa es menor de 30% en peso, preferiblemente menor de 10% en peso, incluso más preferido menor de 2,5% en peso. En una realización preferida adicional, la etapa (a) del método para hidrolizar biomasa se lleva a cabo hasta que el contenido de sólidos secos insolubles restantes dentro de la biomasa es de 0,5 a 30% en peso, preferiblemente de 1 a 10% en peso y lo más preferido es de 1,5 a 5% en peso.

El término "sólidos secos insolubles" se refiere a la masa de sólidos insolubles determinada después de haber retirado agua y otros compuestos volátiles de la fracción sólida utilizando un balance IR para la masa de la muestra total que incluye tanto la fracción líquida como la fracción sólida. La fracción sólida de la muestra se puede separar de la fracción líquida mediante p.ej. centrifugación.

20 El pH de la biomasa se selecciona preferiblemente de 3 a 9, preferiblemente de 4 a 6, incluso más preferido de 4,5 a 5,5.

25 En una realización preferida del método para hidrolizar biomasa, la filtración es una ultrafiltración o una microfiltración. En una realización particularmente preferida, la ultrafiltración se lleva a cabo mediante el uso de una membrana de ultrafiltración que se prefiere además una membrana cerámica, una membrana de acero inoxidable, una membrana sintética (que comprende preferiblemente polisulfona) o silicio o una membrana que contiene silicio o cualquier combinación de las mismas. En una realización adicional particularmente preferida, el umbral de corte de la membrana se selecciona de 0,5 kDa a 100 kDa, más preferido de 1 kDa a 50 kDa, incluso más preferido de 2 kDa a 25 kDa. En una realización adicional particularmente preferida, la microfiltración se lleva a cabo mediante el uso de una membrana de microfiltración que se prefiere además una membrana cerámica, una membrana de acero inoxidable, una membrana sintética (que comprende preferiblemente polisulfona) o silicio o una membrana de silicio o cualquier combinación de las mismas.

Realizaciones particularmente preferidas de la presente invención

Las siguientes realizaciones se deben entender solamente como realizaciones particularmente preferidas y que no limitan el alcance de la presente invención en ningún aspecto.

35 A) Composición enzimática que comprende al menos una celulasa seleccionada de celobiohidrolasas (EC 3.2.1.-) y endo-1,4-β-glucanasa (EC 3.2.1.4), al menos una hemicelulasa seleccionada de xilanasas, arabinofuranosidasas y galactanasas y al menos una pectinasa seleccionada de poligalacturonasas, pectinliasas y ramnogalacturonasas, en donde la al menos una hemicelulasa comprende una Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa (EC 3.2.1.99) con una actividad degradante de arabinano de 10 a 100 U/mg proteína, en donde la actividad degradante de Arabinano de la Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa (EC 3.2.1.99) es de 8 a 100 veces más que la actividad degradante de celulosa de la al menos una celulasa y de 10 a 250 veces más que la actividad degradante de proteína de la al menos una pectinasa y cuando está presente otra hemicelulasa en la composición de 0,25 a 5 veces más que la actividad degradante de hemicelulosa de la al menos una hemicelulasa.

C) Método para hidrolizar la biomasa que comprende las etapas

45 a) Poner en contacto la biomasa con una composición enzimática como se definió anteriormente en la realización A;

b) Someter al menos una parte de la biomasa a una filtración y separar el filtrado,

50 en donde la etapa a) del proceso se lleva a cabo durante un primer período de tiempo de 1 a 5 horas, preferiblemente de 2 a 3 horas a una temperatura de 35 a 45°C, preferiblemente 40°C; posteriormente durante un segundo período de tiempo de 1 a 5 horas, preferiblemente de 2 a 3 horas a una temperatura de más de 45 a 55°C, preferiblemente 50°C; posteriormente durante un tercer período de tiempo de 1 a 4 horas, preferiblemente de 1,5 a 2 horas a una temperatura de más de 55 a 65°C, preferiblemente 60°C,

y/o en donde la biomasa se selecciona de remolacha azucarera, caña de azúcar, paja, maíz, madera, semillas oleaginosas y composiciones de las mismas,

y/o en donde el contenido de materia seca de la biomasa se selecciona de 5 a 50% en peso, preferiblemente de 10 a 45% en peso, más preferiblemente de 15 a 42% en peso y lo más preferido de 20 a 40% en peso.

5 Métodos

Los siguientes métodos se utilizaron dentro de los ejemplos de la presente invención:

Ensayos enzimáticos

Ensayo de arabinasa

La actividad de la arabinasa se determina utilizando arabinano desramificado rojo como sustrato (S-RDAR®, Megazyme International, Irlanda). Las mezclas de reacción (200µl) contienen 100µl de solución enzimática y 20mg/ml de arabinano desramificado rojo (concentración final) en tampón de acetato de sodio 50mM (pH5), se incuban durante 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min a 50°C. La cantidad de colorante rojo liberado se mide a A520 después de la adición de EtOH al 95% a las mezclas de reacción y a una incubación adicional durante 10 minutos. Una unidad (U) de actividad hidrolítica de arabinano desramificado rojo se define como la cantidad de enzima equivalente a la liberación de 1AU (unidad de absorción) de colorante rojo por minuto bajo las condiciones descritas anteriormente (pH5, 50°C y concentración de sustrato de 20mg/ml).

Ensayo de proteínas

Las concentraciones de proteína se determinaron según el método de Bradford (Bradford M. M. (1976). Anal.Biochem. 72, 248 - 254).

20 Composiciones enzimáticas

Las siguientes enzimas se utilizaron para preparar composiciones enzimáticas:

Arabinasa (E-EARAB, Megazymes® Inc., Irlanda), celulasa (Celluclast®, Novozymes®, Dinamarca), beta-glucosidasa (Novo 188®, Novozymes®, Dinamarca) y pectinasa (Pectinex Ultra SP-L®, Novozymes, Dinamarca). Cuando fue necesario, las enzimas se desalaron y se concentraron con 45 ml de tampón de acetato de sodio (50 mM, pH 5) utilizando 50 ml de dispositivos de ultrafiltración Amicon (corte de 10 kDa, Millipore®, Maidstone, Reino Unido).

Composición enzimática de referencia

Se utilizaron las siguientes enzimas: 43,4% en peso de Celluclast®, 6,3% en peso de Novo 188® y 50,3% en peso de Pectinex Ultra SP-L®. Estos productos se mezclaron en tampón NaAc 50 mM (pH 5).

Composición enzimática comparativa (CE)

Se utilizaron las siguientes enzimas: 43,2% en peso de Celluclast®, 6,3% en peso de Novo 188® y 50,3% en peso de Pectinex Ultra SP-L® con 5% en peso de arabinano endo-1,5-alfa-L- arabinosidasa (E-EARAB, Megazymes® Inc., Irlanda). Estos productos se mezclaron en tampón NaAc 50 mM (pH 5).

Ejemplos y figuras

La presente invención se describe ahora mediante los siguientes ejemplos y figuras. Todos los ejemplos y figuras son solo para fines ilustrativos y se no debe entender que limitan la invención.

- Figura 1 muestra la licuefacción mejorada de las raíces de remolacha azucarera dentro de las primeras 5 horas para la composición enzimática según el ejemplo comparativo 1 en comparación con la composición enzimática de referencia a una temperatura de 50°C.
- Figura 2 muestra la liberación mejorada de arabinosa de las raíces de remolacha azucarera dentro de las primeras 5 horas para la composición enzimática según el ejemplo comparativo 1 en comparación con la composición enzimática de referencia a una temperatura de 50°C.
- Figura 3 muestra la licuefacción mejorada de las raíces de remolacha azucarera después de 24 horas a una temperatura de 50°C, dependiendo de la arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinasa añadida a la composición enzimática de referencia.
- Figura 4 muestra la liberación mejorada de arabinosa de las raíces de remolacha azucarera después de 24 horas a una temperatura de 50°C, dependiendo de la arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinasa añadida a la composición enzimática de referencia.

Ejemplo comparativo 1: Licuefacción enzimática de remolacha entera a una temperatura de 50°C

5 El material entero de remolacha azucarera se preparó a partir de muestras de raíces de remolacha azucarera fresca tomadas en Sulzemoos, Alemania. Las raíces de remolacha se lavaron para retirar la tierra restante y se cortaron en piezas de aproximadamente 10 mm x 10 mm utilizando una mezcladora Waring. El material de remolacha azucarera tenía un contenido promedio de m.s. del 23%.

10 La mezcla de reacción (20 ml) contenía 0,1% de E/S de la composición enzimática (CE) comparativa o de la composición enzimática de referencia y un contenido de m.s. de remolacha azucarera de 15% en tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 5). La mezcla de reacción se incubó durante 30 min a 5 horas a una temperatura de 50°C. Después de la licuefacción y la hidrólisis, la mezcla de reacción se centrifugó durante 30 minutos a 3200 g y el líquido sobrenadante se separó y se pesó. 1 ml del sobrenadante se inactivó por calor a una temperatura de 95°C durante 10 min y la cantidad de azúcar liberada se analizó mediante HPLC (Agilent®, Alemania) con una columna de intercambio iónico Aminex® HPX 87 (BioRad Labs, Hercules, EE. UU.) (Eluente: 100% de agua, T: 85°C, flujo: 0,6 ml/min, detección IR).

15 La licuefacción se determinó según la fórmula:

$$\frac{\text{peso neto del sobrenadante}}{20} \times 100$$

Los resultados se muestran en las figuras 1 y 2.

Ejemplo comparativo 2: Licuefacción enzimática de remolacha entera en diferentes actividades de Arabinano endo-1,5- α -L-Arabinanasa

20 La mezcla de reacción (20 ml) contenía 0,05% de E/S de mezcla de enzimas de referencia y cantidades variables de arabinano endo-1,5- α -L-arabinanasa. El contenido de m.s. se ajustó a 15% mediante adición de tampón de acetato sódico 50 mM (pH 5). La mezcla de reacción se incubó durante 24 h a una temperatura de 50°C. Después de la licuefacción y la hidrólisis, la mezcla de reacción se centrifugó durante 30 minutos a 3200 g y el líquido sobrenadante se separó y se pesó. 1 ml del sobrenadante se inactivó por calor a una temperatura de 95°C durante 10 min y la cantidad de azúcar liberada se analizó mediante HPLC (Agilent®, Alemania) con una columna de intercambio iónico Aminex® HPX 87 (BioRad Labs, Hercules, EE. UU.) (Eluente: 100% de agua, T: 85°C, flujo: 0,6 ml/min, detección IR).

La licuefacción se determinó según la fórmula:

$$\frac{\text{peso neto del sobrenadante}}{20} \times 100$$

30 Los resultados se muestran en las figuras 3 y 4.

REIVINDICACIONES

1. Composición enzimática que comprende al menos una celulasa, al menos una hemicelulasa y al menos una pectinasa, en donde la al menos una hemicelulasa comprende una Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa (EC 3.2.1.99) con una actividad degradante de arabinano de 10 a 100 U/mg de proteína,
- 5 en donde la actividad degradante de la Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa (EC 3.2.1.99) es de 8 a 100 veces más que la actividad degradante de celulosa de la al menos una celulasa,
- en donde la actividad degradante de arabinano de la Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa (EC 3.2.1.99) es de 10 a 250 veces más que la actividad degradante de pectina de la al menos una pectinasa, y
- 10 en donde cuando está presente otra hemicelulasa en la composición, la actividad degradante de arabinano de la Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa (EC 3.2.1.99) es de 0,25 a 5 veces más que la actividad degradante de hemicelulosa de la al menos una hemicelulasa.
2. Composición enzimática según la reivindicación 1, en donde la al menos una celulasa comprende al menos una enzima seleccionada del grupo de celobiohidrolasas y endo-1,4-β-glucanasa.
- 15 3. Composición enzimática según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la al menos una pectinasa comprende al menos una enzima seleccionada del grupo de pectinesterasas, poligalacturonasas, pectinliasas, manosidasas y ramnogalacturonasas.
- 20 4. Composición enzimática según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición enzimática contiene al menos una hemicelulasa seleccionada del grupo de xilanasas, xilosidasas, esterases, arabinofuranosidasas, galactanasas, peroxidasas y oxidasas.
5. Composición enzimática según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las hemicelulasas, celulasas y/o pectinasas se producen por expresión en *Trichoderma reesei*.
- 25 6. Uso de una composición enzimática según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para hidrolizar biomasa.
- 30 7. Uso según la reivindicación 6, en donde la biomasa se selecciona de remolacha azucarera, caña de azúcar, paja, maíz, madera, semillas oleaginosas y composiciones de los mismos.
8. Método para hidrolizar biomasa, que comprende las etapas
- 35 a) poner en contacto la biomasa con una composición enzimática como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;
- b) someter al menos una parte de la biomasa a una filtración y separar el filtrado.
- 40 9. Método según la reivindicación 8, en donde la filtración es una ultrafiltración o una microfiltración.

Fig.1

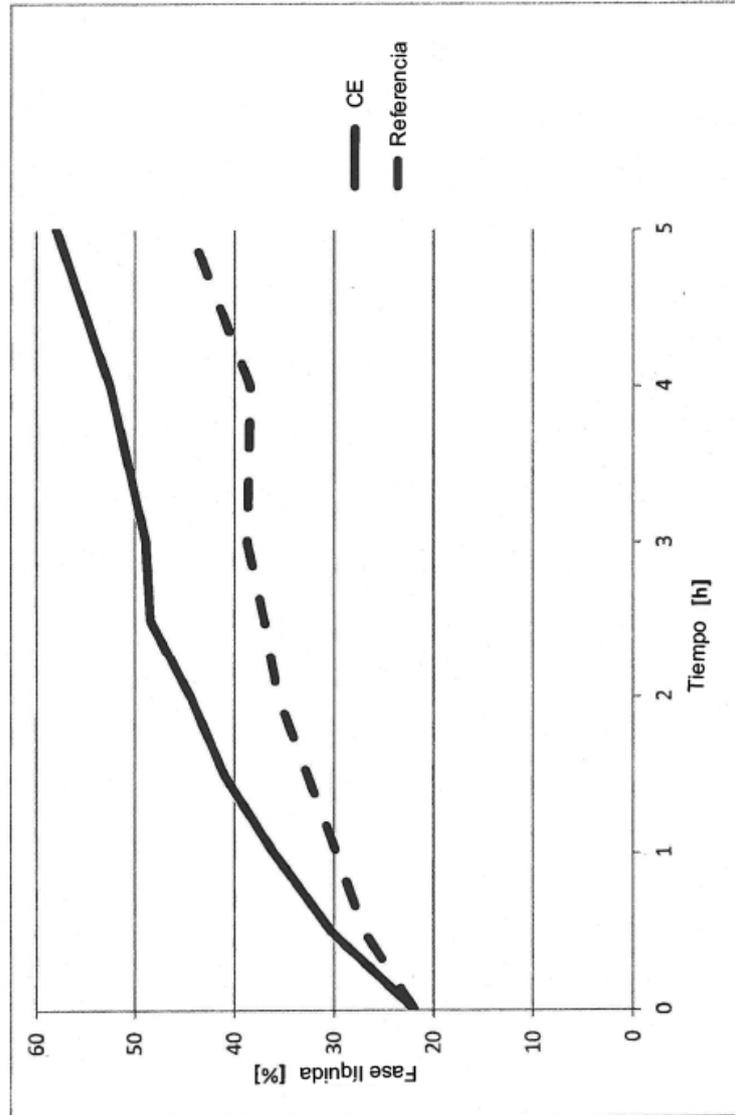


Fig. 2

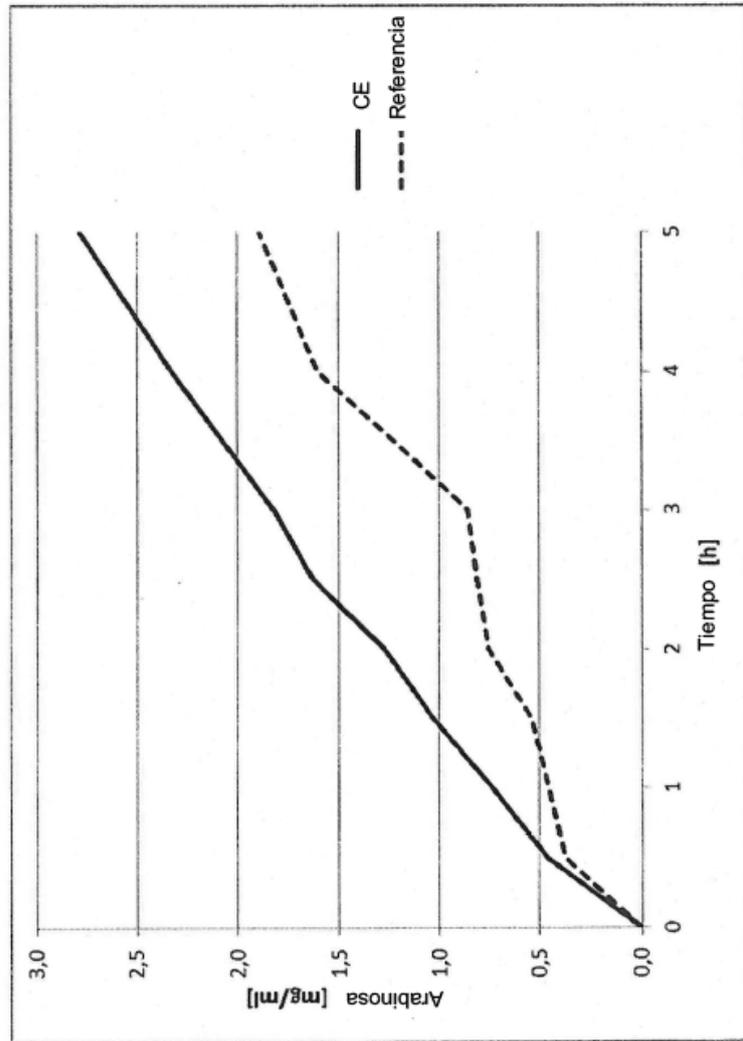


Fig. 3

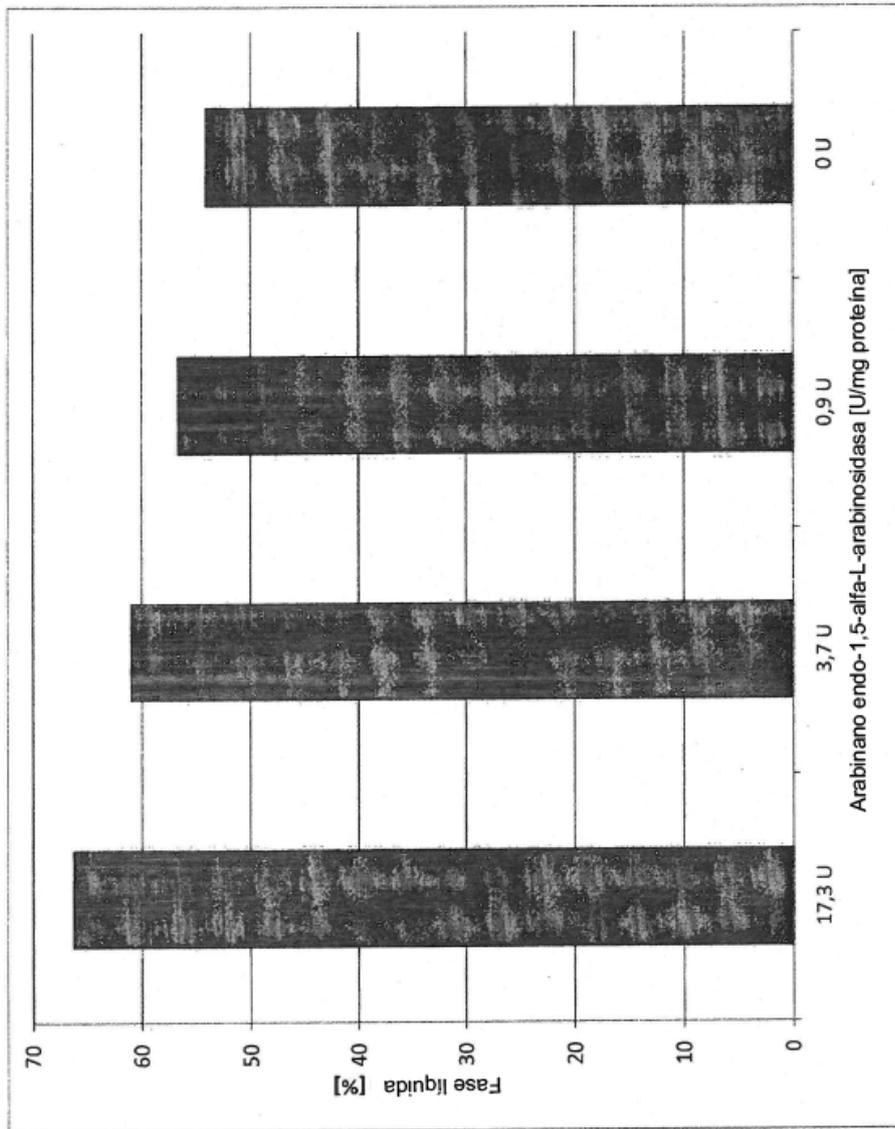


Fig. 4

