

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 725**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2013 PCT/NL2013/050918**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14098589**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2013 E 13818498 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2935604**

54 Título: **Proceso para la hidrólisis enzimática de la celulosa con adición de proteína**

30 Prioridad:

18.12.2012 NL 2010006

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

17.04.2019

73 Titular/es:

**STICHTING ENERGIEONDERZOEK CENTRUM
NEDERLAND (100.0%)
Westerduinweg 3
1755 LE Petten, NL**

72 Inventor/es:

**SMIT, ADRIANUS THEODORUS y
HUIJGEN, WOUTER JOHANNES JOSEPH**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 709 725 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

Proceso para la hidrólisis enzimática de la celulosa con adición de proteína

[0001] La presente invención está en el campo de utilización de la biomasa y se dirige a un proceso avanzado para la hidrólisis enzimática de la celulosa.

5 Antecedentes

[0002] La biomasa, especialmente la biomasa lignocelulósica, es un recurso valioso para la producción de (bio)combustibles, productos químicos, productos de análisis del rendimiento y energía. La lignocelulosa es la biomasa renovable más abundante disponible en la tierra y, por lo tanto, relativamente económica. Comprende principalmente celulosa, hemicelulosa y lignina. Se han dedicado muchos esfuerzos de investigación al desarrollo de los procesos para la conversión rentable en costes de la biomasa, especialmente biomasa de lignocelulosa, en compuestos valiosos. Un ejemplo de lo mismo es la conversión de celulosa en glucosa, que a su vez puede servir como un precursor de bioetanol "de segunda generación" (por fermentación de glucosa), y es por tanto adecuada para la preparación de biocombustibles.

[0003] La hidrólisis enzimática de la celulosa a glucosa todavía no se puede aplicar en una escala comercial, puesto que todavía no puede competir con la glucosa producida a partir de fuentes de biomasa de primera generación (almidón, sacarosa, etc.), entre otras, en vista de los altos costes de las cantidades requeridas de enzima celulolítica. Alternativas a la hidrólisis enzimática de la celulosa, por ejemplo, tratamiento de ácido concentrado, no son deseables debido a cuestiones medioambientales y porque producen más productos derivados por reacciones de degradación de azúcar. Por lo tanto, uno de los desafíos de la investigación actual es encontrar medios para reducir el coste de la hidrólisis enzimática de celulosa, para permitir la aplicación industrial, por ejemplo, aumentando la actividad enzimática y reduciendo la dosis enzimática requerida.

[0004] El pretratamiento de la biomasa es un proceso en el que los polímeros de celulosa se hacen más accesibles para enzimas hidrolíticas. Sin pretratamiento, la celulosa dentro de la biomasa lignocelulósica es difícilmente accesible para las enzimas hidrolíticas, entre otras cosas, porque está blindada por lignina y hemicelulosas. El pretratamiento descompone (y a menudo elimina parcialmente) este protector de lignina y hemicelulosa, y afecta a la estructura cristalina de celulosa y puede incluso reducir el grado de polimerización de la celulosa. El pretratamiento puede implicar una alteración de la estructura celular de la biomasa y puede eliminar lignina y/o hemicelulosa de la biomasa, dependiendo del tipo de pretratamiento. Se conocen en la técnica diferentes tipos de pretratamiento (por ejemplo, de Zheng et al., Int. J. Agric. & Biol. Eng. 2009, 2,51-68). Estos tipos se pueden clasificar en general como pretratamiento químico o mecánico. El pretratamiento químico incluye la explosión por vapor catalizada, pretratamiento ácido, pretratamiento alcalino, explosión por vapor con amoníaco, organosolventes, acuatermolisis, pretratamiento con agua caliente líquida con pH controlado y pretratamiento con líquido iónico. El pretratamiento físico incluye la explosión por vapor no catalizada, trituración mecánica y radiación de energía alta.

[0005] El producto con celulosa (algunas veces llamado pulpa) obtenido por el pretratamiento comprende a menudo cantidades significativas de componentes no celulósicos. Aunque el pretratamiento implique la eliminación de (grandes partes de) hemicelulosa y lignina, estos componentes están todavía presentes en alguna medida en el producto que contiene celulosa. El tratamiento con un solvente orgánico miscible en agua a temperatura elevada, conocido como tratamiento "organosolvente", por ejemplo, separa lignina y hemicelulosa de la pulpa de celulosa (véase: Wildschut et al. Bioresource Technology, 135 (2013), 58- 66). Sin embargo, este producto celulósico comprende aproximadamente del 10 al 30 % en peso de la lignina, basado en el contenido total original de lignina de la biomasa. Esta fracción de la lignina presente en biomasa de lignocelulosa es muy resistente a la deslignificación. Las impurezas en la pulpa rica en celulosa pueden obstaculizar el acceso de la enzima a la celulosa durante la hidrólisis enzimática. Además, la enzima hidrolítica se adsorberá irreversiblemente sobre la lignina, con lo que la enzima se desactiva. El documento no del estado de la técnica Rahikainen et al., Biores. Technol., 2013, 133, 270-278 enseña que la lignina aislada de píceas y paja de trigo pretratada por explosión por vapor tiene un efecto inhibitorio en la hidrolizabilidad.

[0006] Se ha propuesto usar proteínas purificadas comerciales en la hidrólisis enzimática de celulosa para contrarrestar el efecto inhibitorio de los productos derivados de biomasa, tales como proteínas de rastrojos de maíz (Han y Chen, Biochemical Engineering Journal, 48 (2010), 218-224), albúmina de suero bovino (Yang y Wyman, Biotechnology and Bioengineering, 94 (2006), 611-617, o Pan et al., Applied Biochemistry and Biotechnology, 121-124 (2005), 1069-1079). Esto no da todavía como resultado un proceso comercialmente realizable, a causa del coste de las proteínas purificadas comerciales. La extracción de proteínas de la biomasa se ha descrito por Bals y Dale (Biotechnology and Bioengineering, 198 (2011), 530-537) y por Chiesa y Gnansounou (Bioresource Technology, 102 (2011), 427-436). El conocimiento no del estado de la técnica sobre el papel de la eliminación de

proteína en la digestibilidad enzimática de la celulosa se puede encontrar en Kim et al., *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2013, 36(6): 687-94.

[0007] Hasta la fecha no hay ningún método comercialmente realizable para contrarrestar el efecto de la lignina residual. La presente invención soluciona la necesidad que existe en la técnica para este tipo de método.

5 Resumen de la invención

[0008] Sorprendentemente, los inventores han descubierto que la actividad enzimática durante la hidrólisis enzimática de la celulosa mejora significativamente cuando un extracto acuoso, en particular un extracto que contiene proteínas, se añade a partir de biomasa durante la hidrólisis enzimática. Como tal, la carga de enzima durante la etapa de hidrólisis enzimática puede reducirse significativamente, sin afectar negativamente al rendimiento de la glucosa. Sorprendentemente, el extracto acuoso de biomasa rico en proteínas, adecuado para aumentar la actividad de la enzima hidrolizante, puede prepararse eficazmente lavando la biomasa con agua y filtrando posteriormente la mezcla. No son necesarias más etapas de purificación para conseguir un aumento significativo de la actividad enzimática durante la hidrólisis enzimática. Otros componentes que pueden coextraerse de la biomasa durante la extracción acuosa, no inhiben la enzima hidrolítica (celulasa) durante la hidrólisis enzimática de la celulosa, o esta inhibición es más que compensada por el aumento de actividad causado por el proceso según la invención. La proteína de la biomasa en sí misma constituye una fuente de proteínas relativamente económica y fácilmente accesible. Como resultado del requisito reducido de enzima, esta invención soluciona la necesidad de reducir los costes de la hidrólisis enzimática de la celulosa.

[0009] Sin quedar limitados por la teoría, los inventores dan por hecho que las proteínas del extracto acuoso se adsorben en la lignina presente en el sustrato celulósico. Como tal, se reduce la cantidad de enzima hidrolítica inactivada por adsorción sobre la lignina liberada.

Descripción detallada

[0010] La invención se refiere a un proceso para la hidrólisis enzimática de la celulosa contenida en la biomasa, que comprende:

- 25 (a) la extracción de biomasa que contiene tanto proteína como celulosa con un líquido acuoso para producir una biomasa extraída y un extracto acuoso con un contenido de proteína de al menos 0,01 g por litro de agua;
- (b) pretratamiento mecánico, químico y/o térmico de biomasa que contiene celulosa; y
- (c) poner en contacto la biomasa pretratada en la etapa (b) con:
 - 30 (i) una enzima capaz de hidrolizar celulosa; y
 - (ii) el extracto acuoso obtenido en la etapa (a).

El extracto acuoso contiene al menos una parte de la proteína de la biomasa, y se refiere abajo como extracto que contiene proteínas.

[0011] La biomasa adecuada para el proceso según la invención incluye biomasa lignocelulósica, tal como residuos forestales, residuos agrícolas, residuos de campo, residuos de animales y humanos. Dicha biomasa comprende en general del 40 al 80% en peso de carbohidratos (en base a la sustancia seca), que son materias primas valiosas para la biorrefinería. La biomasa que contiene celulosa usada preferiblemente también contiene cantidades significativas de proteínas; si no, por ejemplo, en el caso de biomasa de madera, la biomasa usada para la extracción de proteína es diferente de la biomasa usada para hidrolizar celulosa. Preferiblemente, se usa biomasa herbácea en el proceso según la invención. Más preferiblemente, la biomasa herbácea está en forma de un residuo (agrícola) tal como paja y hierba.

[0012] En una forma de realización preferida, la biomasa extraída obtenida en la etapa (a) del proceso se usa como la biomasa que contiene celulosa de la etapa (b).

Preextracción

45 [0013] En una forma de realización preferida, el proceso según la invención implica una etapa de preextracción antes del pretratamiento. La preextracción según la invención implica la extracción de proteínas (hidrosolubles) de la biomasa, antes de cualquier tratamiento térmico de dicha biomasa a una temperatura de al menos 75°C como se describe más detalladamente abajo. La biomasa sometida a la fase de preextracción puede ser una biomasa

fresca o seca, opcionalmente después de la eliminación de impurezas grandes tales como piedras y trozos de metal, y opcionalmente después de cortar o triturar en trozos para facilitar la manipulación (por ejemplo, trozos de 0,01 a 50 cm, en particular 0,1-10 cm de longitud o diámetro, dependiendo del tipo de biomasa).

5 [0014] La preextracción se realiza utilizando un solvente de extracción acuoso, en particular agua. El agua se puede desmineralizar, pero generalmente la desmineralización es innecesaria. El líquido acuoso puede contener agentes que contribuyen a la disolución de las proteínas, tales como ácidos, bases, sales y surfactantes. El pH puede ser desde ligeramente alcalino hasta ácido, por ejemplo, entre 2 y 10, preferiblemente entre 4 y 8. Si se desea, cantidades menores de un solvente orgánico, tales como alcoholes, polioles, éteres y similares, se pueden añadir al solvente de extracción. Sin embargo, el nivel de estos solventes orgánicos se mantiene preferiblemente bajo, por ejemplo, por debajo del 20% en peso, más preferiblemente por debajo del 10% en peso, puesto que pueden causar precipitación no deseada de algunas de las proteínas y/o coextracción no deseada de componentes adicionales de la biomasa. Se descubrió que se pueden usar convenientemente agua del grifo (no desmineralizada) o filtrada, agua de superficie relativamente limpia, mientras que también es adecuada el agua desmineralizada, con o preferiblemente sin solventes orgánicos añadidos u otros aditivos. También por 15 cuestiones de coste se minimiza preferiblemente el uso adicional de solventes orgánicos y aditivos.

[0015] La preextracción se puede realizar por cualquier técnica de extracción conocida en la técnica. Convenientemente, la preextracción se realiza lavando la biomasa con el solvente o remojando la biomasa en el solvente. En esta forma de realización, la biomasa se deja en remojo preferiblemente al menos 1 minuto en el solvente, más preferiblemente entre 5 minutos y 600 minutos, de la forma más preferible entre 10 minutos y 120 minutos. 20

[0016] La extracción también se puede realizar por fases, en un modo de contracorriente. En un modo por fases de este tipo, se usa agua relativamente limpia (con pocas proteínas) para la segunda fase o una fase posterior de la extracción y el extracto de la segunda fase o fase posterior se usa como un líquido de extracción para la fase precedente (o primera). De esta manera se minimiza la cantidad residual de proteínas hidrosolubles en la biomasa mientras se mantiene la cantidad de líquido de extracción y, por lo tanto, la carga líquida en la hidrólisis enzimática se mantiene relativamente baja. La extracción a contracorriente permite una reducción de la cantidad total de solvente de extracción. 25

[0017] La extracción se puede realizar con agua a una temperatura entre la temperatura de fusión (0°C) y la temperatura de ebullición (100°C o más alta si está presurizada), mientras que la temperatura se elige preferiblemente de manera que se minimiza la degradación de las proteínas. Las temperaturas de extracción preferidas están entre 10 y 75°C, de forma más preferida entre 15 y 60°C, de la forma más preferida de 20 a 50°C. La cantidad del líquido de extracción (por ejemplo, agua) es preferiblemente 1-20 litros de líquido por kg de biomasa. Para la extracción de fase única, la cantidad preferida es 2-12, de la forma más preferida 3-10 l de agua por kg de biomasa. Para la extracción a contracorriente, la cantidad preferida del solvente (agua) de extracción está entre 1 y 6, especialmente entre 1,5 y 4 l de agua por kg de biomasa. El peso de la biomasa se entiende aquí como el peso en seco, sin agua adherente. 30 35

[0018] La mezcla de la biomasa y solvente se puede filtrar después, utilizando un filtro que tiene poros suficientemente pequeños como para retener la biomasa cortada y lavada o empapada, y poros suficientemente grandes como para permitir el paso de las proteínas. Típicamente, los poros de tal filtro tienen un diámetro entre 10 µm y 10 mm, preferiblemente entre 100 µm y 1 mm. El permeado se recoge como extracto acuoso rico en proteínas, y el retenido que comprende biomasa se usa para tratamiento adicional. 40

[0019] En una forma de realización especialmente preferida, la biomasa que ha sido lavada (preextraída) para la extracción de las proteínas, se pretrata posteriormente y se somete a hidrólisis enzimática como se describe aquí posteriormente. Alternativamente, la preextracción de la biomasa para preparar el extracto acuoso rico en proteínas se realiza en un lote diferente que el lote usado para el pretratamiento e hidrólisis enzimática según la invención. El lote diferente se puede originar de la misma biomasa o de otra biomasa, por ejemplo, una biomasa con un contenido de proteína diferente. En este caso, la biomasa preextraída se puede usar para cualquier fin deseado. 45

[0020] En una forma de realización preferida, el mismo lote de la biomasa está sujeto a preextracción acuosa como se ha descrito anteriormente y pretratamiento como se describe más adelante, y la biomasa extraída obtenida en la preextracción acuosa se somete antes del pretratamiento a una etapa de extracción adicional con un líquido orgánico, es decir, un líquido que comprende al menos 20 % en peso de solvente orgánico, preferiblemente al menos 50 % en peso, incluso más preferiblemente al menos 70 % en peso, más preferiblemente al menos 90 % en peso, de la forma más preferible al menos 99 % en peso. Los solventes orgánicos adecuados para ser usados en esta etapa de extracción adicional opcional incluyen, pero no se limitan a amidas, cetonas, éteres, dioles y alcoholes inferiores, ácidos carboxílicos y alcanos inferiores. En el contexto de 50 55

la presente invención, "inferior" significa que contiene 1-6 átomos de carbono (C₁-C₆), especialmente C₁-C₄. El solvente orgánico se puede mezclar preferiblemente con agua o es capaz de disolver al menos el 10 % de peso de agua.

5 [0021] Ejemplos de solventes orgánicos adecuados para la etapa de extracción adicional opcional incluyen metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol y sus isómeros, etilenglicol, propilenglicol, metoxietanol, dimetoxietano, dietilenglicol, dioxano, acetona, metiletilcetona, tetrahidrofurano, dimetilformamida, dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, etc. Se pueden usar también otros (co)solventes polares adicionales, aunque estos son ligeramente menos preferidos, por ejemplo, acetonitrilo, ácido fórmico, ácido acético, metilacetato, etilacetato, haloalcanos no apolares tal como diclorometano, y CO₂ (sc). Solventes apolares, tales como
10 hidrocarburos, por ejemplo, pentano, ciclopentano, hexano, tolueno o mezclas derivadas, tal como éter de petróleo, se pueden usar también como (co)solventes. En el contexto de la presente descripción también están comprendidas en el término "solvente orgánico" mezclas de solventes orgánicos miscibles. Preferiblemente, el solvente orgánico se selecciona a partir de metanol, etanol, propanol, butanol y acetona.

15 [0022] La fase acuosa o el permeado acuoso de la preextracción acuosa de biomasa comprende componentes hidrosolubles originados de la biomasa, tales como proteínas hidrosolubles. El extracto acuoso rico en proteínas puede comprender también otros componentes hidrosolubles a partir de la biomasa, tales como sales, carbohidratos no estructurales (mono- y oligosacáridos de pentosa y hexosa) y cualquier otro material hidrosoluble. La fase acuosa o el permeado acuoso se puede usar como tal, sin purificación adicional, en la hidrólisis enzimática de la celulosa, como se describe más adelante, o se puede procesar adicionalmente antes
20 de usarse en la hidrólisis enzimática. Tal tratamiento adicional puede incluir nanofiltración por una membrana con un peso molecular comprendido entre 500 Da y 3 kDa. Cuando se usa la nanofiltración, el retenido comprende proteínas y se considera que es el extracto acuoso de biomasa rico en proteínas en el contexto de la presente invención. El permeado se puede devolver a la etapa de extracción.

25 [0023] Típicamente, la biomasa lignocelulósica puede contener un 30 % de proteínas (en base al peso en seco), dependiendo del tipo de biomasa. Sin embargo, no se excluye el uso de biomasa con niveles más altos de proteínas, e incluso puede ser ventajoso. Las hierbas pueden contener, por ejemplo, 15-30 % en peso, mientras que la mayoría de pajas tienen entre un 2 y un 8 % en peso de proteínas (en base a la materia seca). Durante la preextracción acuosa, al menos un 10 % en peso de las proteínas hidrosolubles se extrae de la biomasa (típicamente de un 20 a un 100 % en peso). La concentración de la proteína en el extracto acuoso no es esencial
30 para la aplicación en la hidrólisis enzimática de celulosa según la invención.

[0024] El contenido de proteína del extracto acuoso obtenido en la etapa (a) es al menos 0,01, preferiblemente al menos 0,05, más preferiblemente al menos 0,1 g por litro de agua, hasta el límite de solubilidad, que puede estar entre 10 y 50 g/l, dependiendo de las proteínas particulares. En particular, el contenido de proteína es al menos 0,2 g/l, más preferiblemente al menos 0,5 g/l, más preferiblemente al menos 1 g/l, por ejemplo, hasta 20 g o hasta
35 15 g por litro de agua. El contenido de proteína del extracto como se usa en la etapa (c) puede tener el mismo contenido de proteína. Si el contenido de proteína se considera que es demasiado bajo, el extracto acuoso rico en proteínas se puede concentrar o diluir antes de usarse en la hidrólisis enzimática de celulosa según la invención, por ejemplo, por nanofiltración, para obtener una concentración de proteína de, por ejemplo, 0,2-30, en particular 1-20 g/l. En una forma de realización preferida, no se realizan más etapas de procesamiento sobre el extracto
40 acuoso rico en proteínas, aparte de la filtración o concentración del extracto.

Pretratamiento

[0025] El proceso según la invención puede implicar cualquier tipo de tratamiento mecánico, químico y/o térmico conocido en la técnica para el pretratamiento de biomasa lignocelulósica para el fin de la hidrólisis enzimática. El proceso se refiere también a veces como cocción o reducción a pasta. El pretratamiento de la biomasa es
45 necesario para hacer la celulosa accesible para la hidrólisis enzimática. Las etapas adecuadas de tratamiento mecánico y/o térmico incluyen, pero de forma no limitativa, explosión por vapor catalizada, pretratamiento ácido, pretratamiento alcalino, explosión por vapor con amoníaco, organosolventes, pretratamiento con agua caliente líquida con pH controlado, explosión por vapor no catalizada, acuatermolisis, pretratamiento con agua caliente líquida, trituración mecánica y radiación de alta energía.

50 [0026] Preferiblemente, la etapa de pretratamiento es una etapa organosolvente, es decir, pretratamiento con un solvente miscible en agua y posiblemente un catalizador (ácido), una etapa de explosión por vapor o una etapa de acuatermolisis, más preferiblemente una etapa organosolvente. El solvente miscible en agua para la etapa organosolvente puede ser un alcohol inferior, éter o cetona, tales como metanol, etanol, (iso)propanol, butanol, etilenglicol, metoxietanol, dimetoxietano, dioxano, acetona, metiletilcetona, etc. Los solventes miscibles en agua
55 preferidos incluyen etanol y acetona. Cuando se aplica la etapa de extracción adicional opcional anteriormente

descrita, se prefiere que el solvente a usar en la misma sea el mismo solvente que se usa en el pretratamiento (con organosolvente).

[0027] La etapa de pretratamiento se realiza preferiblemente a una temperatura de al menos 75°C, más preferiblemente al menos 100 °C, hasta 350 °C, preferiblemente hasta 280°C, más preferiblemente entre 120 y 240°C. El pH puede ser entre alcalino y fuertemente ácido, por ejemplo, entre 1 y 11, preferiblemente entre 1,5 y 7,0, más preferiblemente entre 2,0 y 5,0.

[0028] Durante el tratamiento organosolvente, partes de la lignina y la hemicelulosa se eliminan de la biomasa. Así, la biomasa resultante se enriquece en celulosa con un contenido reducido de lignina y de hemicelulosa. Durante la explosión por vapor y la acuatermolisis, típicamente, se hidroliza la hemicelulosa y la lignina permanece en gran medida en la biomasa. Como resultado, el contenido de la lignina es típicamente todavía suficientemente alto para desactivar marcadamente la enzima hidrolítica durante la hidrólisis enzimática.

[0029] Así, se prefiere que la etapa (b) del proceso de la invención comprenda el tratamiento con un solvente orgánico miscible en agua, seleccionado preferiblemente de alcoholes inferiores, éteres inferiores y cetonas inferiores, opcionalmente en presencia de un ácido. Alternativamente, o adicionalmente, la etapa (b) del proceso de la invención comprende una etapa de explosión por vapor o una etapa de acuatermolisis.

Hidrólisis enzimática

[0030] La hidrólisis enzimática de celulosa a glucosa se realiza por una enzima o combinación de enzimas capaz de hidrolizar celulosa, referidas como celulasas. La hidrólisis de la celulosa se conoce también como celulolisis. La actividad de las enzimas celulasas se mide típicamente en FPU (unidad de papel de filtro); véase Ghose, T. K. Measurement of cellulase activities. Pure Appl. Chem. 1987, 59,257-268. El proceso según la invención se puede realizar utilizando cualquier enzima celulasa. Las enzimas celulasas adecuadas son endocelulasas (que rompe la celulosa en posiciones internas), exocelulasas (celobio-hidrolasas, que rompen la celulosa en posiciones más externas para producir celobiosa o celutetraosa), beta-glucosidasas (celobiasas, que escinden los productos de la exocelulasa en unidades de glucosa). Otras enzimas de celulosa, tales como celulasas oxidantes y fosforilasas de celulosa, son menos preferidas. Preferiblemente se usa una combinación de enzimas celulasas, en particular una combinación de endocelulasa, exocelulasa y β -glucosidasa. Además, ventajosamente pueden estar presentes hemicelulasas para descomponer cualquier hemicelulosa residual restante después de la etapa de pretratamiento. Las hemicelulasas que pueden estar presentes incluyen principalmente xilanasas y pueden incluir además xilosidasas, arabinosidasas, mananasas, galactanasas, etc.

[0031] En el proceso según la invención, la hidrólisis enzimática de la celulosa se puede realizar de cualquier manera conocida en la técnica. El proceso según la invención se caracteriza por la presencia de un extracto acuoso rico en proteínas durante la hidrólisis enzimática, donde el extracto acuoso rico en proteínas se origina en la extracción de biomasa. Así, la pulpa rica en celulosa o la biomasa pretratada se pone en contacto simultáneamente con (i) un enzimático capaz de hidrolizar celulosa, preferiblemente una mezcla de celulasas, y con (ii) un extracto acuoso rico en proteínas originado en la extracción acuosa de biomasa. En una forma de realización especialmente preferida, el extracto acuoso de biomasa rico en proteínas usado durante la hidrólisis enzimática de la biomasa se origina en la extracción acuosa de la misma biomasa, antes del pretratamiento. El extracto rico en proteínas puede ser el extracto obtenido directamente o un concentrado del mismo.

[0032] El extracto acuoso rico en proteínas comprende proteínas nativas. Así, la biomasa, antes de la extracción acuosa, y el extracto acuoso rico en proteínas mismo, antes del uso de lo mismo durante la hidrólisis enzimática, preferiblemente no se someten a un tratamiento térmico a una temperatura por encima de 100°C, preferiblemente no por encima de 75°C. Así, se prefiere especialmente que la biomasa usada para preparar el extracto acuoso rico en proteínas no sufra pretratamiento antes de la extracción acuosa. Las proteínas que están presentes durante la hidrólisis enzimática no necesitan mostrar una actividad determinada durante la hidrólisis enzimática. Se asume que su papel es su adsorción sobre lignina, que previene así que las enzimas se adsorban en la lignina. La concentración de la proteína en el extracto acuoso no es esencial para la aplicación en la hidrólisis enzimática de celulosa según la invención. Típicamente, cuanto mayor es el contenido de proteína, mayor es el aumento de la actividad que se observa durante la hidrólisis enzimática.

[0033] La cantidad de la proteína (contenida en u originada en el extracto acuoso) que se va a usar durante la hidrólisis enzimática puede variar. En particular la cantidad puede ser proporcional a la cantidad de biomasa pretratada. Se prefiere usar entre 0,001 y 0,1 g de proteína por g de biomasa pretratada (en base al peso en seco), más preferido entre 0,02 y 0,05 g de proteína por g de biomasa pretratada.

[0034] La biomasa tratada se pone en contacto simultáneo con la enzima hidrolítica y con el extracto acuoso rico en proteínas, los que significa que tanto la enzima hidrolítica como el extracto acuoso rico en proteínas deben

estar presentes durante al menos parte de la hidrólisis enzimática. Así, la enzima hidrolítica puede añadirse primero a la biomasa pretratada, o el extracto acuoso rico en proteínas puede añadirse primero a la biomasa pretratada, o la enzima hidrolítica y el extracto acuoso rico en proteínas se ponen simultáneamente en contacto con la biomasa tratada. "Contactando" o "poner en contacto" indica que cada uno de dos o más componentes se pueden añadir a los otros por cualquier medio conocido en la técnica. El método y orden de la adición no son críticos para el efecto beneficioso en la actividad de la enzima hidrolítica. Además, como la hidrólisis enzimática típicamente tarda de uno a cuatro días, no es esencial si la hidrólisis enzimática ya ha comenzado en algún periodo de tiempo antes de que el extracto acuoso rico en proteínas se añada a la mezcla reactiva que comprende biomasa pretratada y enzima hidrolítica. Durante la hidrólisis enzimática de la celulosa, la estructura polimérica de la celulosa se descompone lentamente, liberando así lentamente lignina adicional. A lo largo del tiempo, más lignina libre puede estar disponible en la mezcla reactiva y, así, más sitios de adsorción para las proteínas o la enzima hidrolítica. Así, es importante que, durante al menos parte de la hidrólisis enzimática, la enzima hidrolítica y el extracto acuoso rico en proteínas estén presentes simultáneamente. Preferiblemente, el extracto acuoso rico en proteínas está presente durante al menos un 75 % de la hidrólisis enzimática (es decir, del 75 al 100 %), más preferiblemente al menos un 90%, más preferiblemente al menos un 95 %.

[0035] El hidrolizado resultante es rico en glucosa, que puede ser procesado adicionalmente, opcionalmente después de la separación de los residuos sólidos, tal como fermentado para producir, por ejemplo, etanol u otros alcoholes, o tratado químicamente para producir, por ejemplo, 5-hidroximetil-furfural y otros furanos, o la glucosa se puede usar como tal, como se conoce en la técnica.

20 Ejemplos

Ejemplo 1: organosolvente e hidrólisis enzimática y para la paja de trigo:

[0036] La paja de trigo se cortó en trozos de aproximadamente 1 cm a 20 cm de tamaño. La paja de trigo cortada se lavó (preextraída) con agua (10 l por kg de paja) a 50°C durante 60 minutos. La mezcla se filtró sobre un filtro de 185 µm, dando como resultado un extracto acuoso que comprende proteína ("extracto acuoso rico en proteínas"). 100 ml del extracto acuoso rico en proteínas se filtró sobre un sistema de filtración de membrana de flujo tangencial con un corte de 1 kDa para eliminar las proteínas del extracto, pero no componentes solubles con un PM <1kDa tales como sales. El permeado resultante es referido como el extracto sin proteínas.

[0037] La paja de trigo de otro lote (no sometido a extracción de agua) se cortó y se sometió a condiciones de organosolvente (OS) en un reactor de autoclave por lotes. Las condiciones OS fueron: 190°C, 60 minutos, solvente = etanol/agua (60/40% peso/peso, 10 l/kg de materia seca), 30 mM H₂SO₄. El OS proporcionó una recuperación sólida (rendimiento de pulpa) de 43,0 % (peso en seco).

[0038] La pulpa de celulosa restante después del tratamiento de la biomasa se sometió a hidrólisis enzimática, usando 5, 10, 15 o 20 FPU por gramo de pulpa (sustrato) de la enzima celulasa (Accellerase 1500, DuPont Industrial Biosciences). En la hidrólisis enzimática, se usaron 1,50 g de pulpa (procedente de 3,49 g de paja de trigo) en un volumen total de 50,0 ml (34,9 ml de extracto acuoso obtenido de la extracción acuosa de otro lote de la misma paja de trigo + 15,1 ml de agua, tamponado a pH 4,8, o 50 ml de agua, tamponada a pH 4,8 (control)). Se añadieron diferentes cantidades de celulasa (5, 10, 15 o 20 FPU por gramo de pulpa) y el progreso de la hidrólisis enzimática se monitoreó por determinación de la concentración de glucosa a varios intervalos durante 72 h. Se realizó un experimento de control cruzado, donde la hidrólisis enzimática se realizó en 50,0 ml (34,9 ml de extracto sin proteínas + 15,1 ml de agua), en presencia de 10 FPU por gramo de pulpa.

[0039] La figura 1 resume los resultados obtenidos en el ejemplo 1 (hidrólisis enzimática de la paja de trigo que se sometieron a un pretratamiento organosolvente). Las líneas continuas representan los valores obtenidos sin extracto de proteína (experimentos de control), las líneas discontinuas representan los valores obtenidos con el extracto de proteína. La línea punteada representa los valores de 10 FPU/g obtenidos con extracto sin proteínas. A mayores concentraciones enzimáticas (5-20 FPU/g), mayor el porcentaje de conversión. Claramente, las líneas discontinuas (hidrólisis enzimática en agua + extracto) representan una actividad enzimática más alta con la misma carga de enzima que las líneas continuas (hidrólisis enzimática en agua). Después de 72 h, los rendimientos de glucosa aumentaron aproximadamente un 30 % a la carga de enzima más baja (5 FPU/g). También a mayor carga de enzima, se observaron rendimientos aumentados cuando el extracto rico en proteínas estaba presente durante la hidrólisis enzimática. Cuando se usó extracto sin proteínas, no se observó ningún aumento en el rendimiento de glucosa.

Ejemplo 2: acuatermolisis para paja de trigo:

[0040] Paja de trigo se cortó y se sometió a condiciones de acuatermolisis (AT) en un reactor de autoclave por lotes. Las condiciones AT fueron: 190°C, 60 minutos, solvente = agua (15 l/kg de materia seca). La AT dio un rendimiento de peso en seco de 59,9 %.

5 [0041] La pulpa de celulosa restante después del tratamiento de la biomasa se sometió a hidrólisis enzimática, usando 5, 10, 15 o 20 FPU por gramo de pulpa (sustrato) de la enzima celulasa (Accellerase 1500, DuPont Industrial Biosciences). En la hidrólisis enzimática, 1,50 g de pulpa (procedente de 2,50 g de paja de trigo) en un volumen total de 50,0 ml (25,0 ml de extracto acuoso rico en proteínas obtenido del otro lote de paja de trigo como se describe en el ejemplo 1, + 25,0 ml de agua (tamponado a pH 4,8) o 50 ml de agua (control)). Se
10 añadieron diferentes cantidades de celulasa (5, 10, 15 o 20 FPU por gramo de pulpa) y se monitoreó el progreso de la hidrólisis enzimática a varios intervalos durante 72 h.

[0042] La figura 2 resume los resultados obtenidos en el ejemplo 2 (hidrólisis enzimática de la paja de trigo que se sometieron a acuatermolisis). Las líneas continuas representan los valores obtenidos sin extracto de proteína (experimentos de control), las líneas discontinuas representan los valores obtenidos con el extracto de proteína. A
15 mayores concentraciones enzimáticas (5-20 FPU/g), mayor el grado de conversión. En vista del alto contenido de lignina de la pulpa resultante, la enzima hidrolítica se desactivó más rápidamente, ya que las curvas se aplanaron rápidamente después de 24 h. Sin embargo, para todas las cargas enzimáticas, el rendimiento resultante de glucosa aumentó cuando la hidrólisis enzimática se realizó en agua + extracto, en comparación con la hidrólisis enzimática con la misma carga de enzima en solo agua.

20 *Ejemplo 3: organosolvente para paja de arroz:*

[0043] La paja de arroz se cortó y se extrajo como se describe en el ejemplo 1, y se sometió a OS: 200°C, 60 minutos, solvente = etanol/agua (60/40,10 l/kg de materia seca), 34 mM H₂SO₄. El OS proporcionó una recuperación sólida (rendimiento de pulpa) de 43,4 %. La pulpa obtenida se sometió a hidrólisis enzimática: 1,50 g de pulpa (procedente de 3,46 g de paja de arroz) en un volumen total de 50,0 ml (34,6 ml de extracto acuoso
25 rico en proteínas obtenido de la misma paja de arroz + 15,4 ml de agua (pH 4,8) o 50 ml de agua (control)). Se añadieron diferentes cantidades de celulasa (5, 10, 15 o 20 FPU por gramo de pulpa) y el progreso de la hidrólisis enzimática se monitoreó a varios intervalos durante 72 h. Los resultados fueron comparables a los obtenidos para paja de trigo (ejemplo 1). Los resultados usando 34,6 ml de extracto sin proteínas + 15,4 ml de agua, en presencia de 10 FPU por gramo de pulpa, fueron iguales que los resultados obtenidos del control (50 ml de agua)
30 (no mostrados).

[0044] Para todas pulpas de celulosa evaluadas, tanto con alto contenido de lignina (después de la acuatermolisis) o contenido de lignina reducido (después del organosolvente), se observó actividad enzimática hidrolítica aumentada cuando el extracto acuoso de biomasa rico en proteínas estaba presente durante la hidrólisis enzimática.

35 *Ejemplo 4: preextracción de proteínas de biomasa*

[0045] Paja de trigo se cortó y se sometió a preextracción con agua (10 l por kg de paja) a varias temperaturas (25, 50, 75, 100°C) y duraciones (15, 30, 60 min). Las mezclas se filtraron sobre un filtro de 185 µm, resultando en un extracto acuoso rico en proteínas. Muestras de paja de trigo de otro lote se sometieron a condiciones de organosolvente (190°C, 60 minutos, solvente = etanol/agua (60/40% peso/peso, 10 l/kg de materia seca), 30 mM H₂SO₄, y posteriormente a hidrólisis enzimática (véase el ejemplo 1, 1,5 g de pulpa, 10 FPU Accellerase 1500 por g de sustrato y 34,9 ml de extracto de proteína). Se observó que temperaturas de preextracción entre 25 y 50°C y duraciones de 30 y 60 min resultan en índices de conversión de hidrólisis enzimática aproximadamente iguales por encima de 36 h hidrólisis (± 2%), mientras que 75°C/30 min y 100°C/15 min resultan en índices de hidrólisis algo inferiores (menos 7-10%).

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la hidrólisis enzimática de celulosa, que comprende:
 - (a) extraer biomasa que contiene tanto proteína como celulosa con un líquido acuoso para producir una biomasa extraída y un extracto acuoso que tiene un contenido de proteína de al menos 0,01 g por litro de agua;
 - (b) pretratar mecánica, química y/o térmicamente biomasa que contiene celulosa; y
 - (c) poner en contacto la biomasa pretratada en la etapa (b) con:
 - (i) una enzima capaz de hidrolizar celulosa; y
 - (ii) el extracto acuoso obtenido en la etapa (a), opcionalmente después de la concentración.
2. Proceso según la reivindicación 1, donde la biomasa extraída obtenida en la etapa (a) se usa como la biomasa que contiene celulosa en la etapa (b).
3. Proceso según la reivindicación 2, donde la biomasa extraída obtenida en la etapa (a) se somete antes de la etapa (b) a una extracción con un líquido orgánico que comprende al menos un 20 % en peso de un solvente orgánico.
4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde, en la etapa (a), la biomasa se extrae con agua que tiene una temperatura de 10-75°C.
5. Proceso según la reivindicación 4, donde, en la etapa (a), la biomasa se extrae con agua que tiene una temperatura de 15-60°C.
6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde, en la etapa (a), la biomasa se extrae con 2-12 l de agua por kg de biomasa.
7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el extracto acuoso obtenido en la etapa (a) tiene un contenido de proteínas de 0,01-50 g/l.
8. Proceso según la reivindicación 7, donde el extracto acuoso obtenido en la etapa (a) tiene un contenido de proteínas de 0,1-20 g/l.
9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde una cantidad de extracto acuoso se usa en la etapa (c) que contiene entre 0,001 y 0,1 g de proteína por g biomasa pretratada en base al peso seco.
10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde la etapa (b) comprende calentar a una temperatura por encima de 75°C.
11. Proceso según la reivindicación 10, donde la etapa (b) comprende calentar a una temperatura por encima de 120°C y hasta 240°C.
12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde la etapa (b) comprende tratar con un solvente orgánico miscible en agua, opcionalmente en presencia de un ácido.
13. Proceso según la reivindicación 12, donde el solvente orgánico miscible en agua se selecciona de alcoholes inferiores y cetonas inferiores.
14. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde la etapa (b) comprende una etapa de explosión por vapor o una etapa de acuatermolisis.
15. Proceso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde, en la etapa (c), la enzima capaz de hidrolizar celulosa comprende una mezcla de celulasas.

Fig. 1

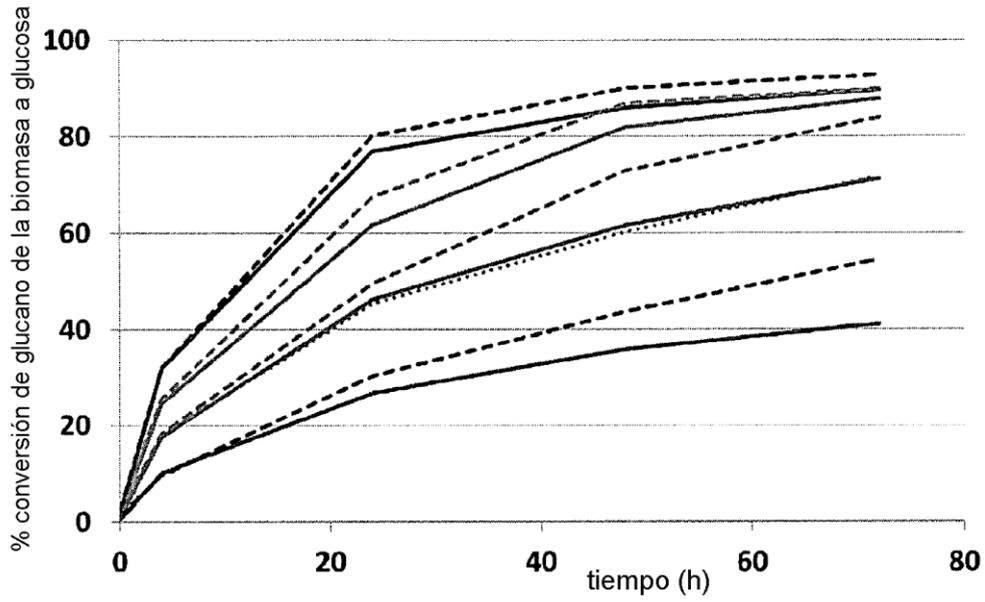


Fig. 2

