

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 816 651**

51 Int. Cl.:

C12P 19/14 (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)
C12P 7/24 (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01)
C12P 7/14 (2006.01)
C12P 7/40 (2006.01)
C12P 7/46 (2006.01)
C12P 7/50 (2006.01)
C13K 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2013 PCT/EP2013/073411**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2014 WO14076012**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2013 E 13789296 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 2920317**

54 Título: **Proceso para obtener derivados de azúcar**

30 Prioridad:

14.11.2012 AT 505112012

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.04.2021

73 Titular/es:

**ANNIKKI GMBH (100.0%)
Dr. Auner Strasse 20/1
8074 Raaba-Grambach, AT**

72 Inventor/es:

**WIRTZ, DÖRTHE HENDRIKE y
MAYER, BERND**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 816 651 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 obtener derivados de azúcar

- 5 La presente invención se refiere a un método para la obtención de ácido arabónico a partir de un material que contiene hemicelulosa.

10 En los últimos años se ha producido un replanteamiento con respecto a las materias primas renovables. Se hace un intento de cambiar de una materia prima fósil a una materia prima renovable como fuente de energía y productos químicos. Una materia prima renovable ("nachwachsender Rohstoff" – abreviado "Nawaro") incluye una materia prima agrícola y forestal de un origen vegetal o animal que no se usa como un alimento o pienso. Se puede utilizar de una manera material, pero también energética. Los Nawaros tienen muchas ventajas como la protección de las materias primas fósiles proporcionadas solo a un grado limitado, suficiente disponibilidad y la apertura de nuevos mercados para la producción extra en agricultura.

15 La lignocelulosa también gana significado como Nawaro (Kamm y Kamm 2004, *Appl Microbiol Biotechnol.* 64(2):137-45). Consiste en 3 principales fracciones químicas: celulosa, un polímero C6 de unidades de glucosa; hemicelulosa, que consiste en diferentes azúcares C5 como, por ejemplo, xilosa; y lignina como un polímero de fenol. Una posibilidad de utilizar la lignocelulosa es la gasificación de modo que se obtiene la llamada "plataforma syngas". La materia prima se quema con un suministro limitado de oxígeno con el fin de producir un gas de síntesis rico en CO₂, CO, H₂, CH₄ y N₂, así como alquitrán (Bridgewater, 2003). El gas de síntesis se puede después, a su vez, usar para producir combustible y sustancias químicas, por ejemplo, a través de la síntesis de Fischer-Tropsch (Tijmensen *et al.*, 2002). Una segunda posibilidad es la llamada "plataforma de azúcar". En la misma, la lignocelulosa primero se rompe en los 3 componentes principales, y esos se convierten después además en productos. La xilosa se puede convertir, por ejemplo, en xilitol o también furfural. La glucosa se puede usar para fermentación o convertir en hidroximetilfurfural (HMF). La lignina con frecuencia se usa para para la producción de energía y simplemente solo se quema (Saake y Lehnen, 2007, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.*)

20 Los azúcares están en la lignocelulosa en estructuras poliméricas estrechamente entrecruzadas en forma de una celulosa parcialmente cristalina y hemicelulosas amorfas que rodean la celulosa. En el curso de la síntesis de la pared celular, las cavidades se rellenan con lignina, mediante lo cual se forma un complejo extremadamente apretado. La opresión de las estructuras hace imposible la accesibilidad para enzimas tales como celulasas o hemicelulasas, debido a su peso molecular relativamente alto, son incapaces de entrar en los poros (Himmel *et al.*, 2007, *Science.* 315 (5813): 804-7). Por tanto, es necesario que, antes del tratamiento enzimático, se produzca una etapa química que aumenta la porosidad de la lignocelulosa. Esta etapa se denomina pretratamiento (digestión). En la digestión la matriz de lignocelulosa polimérica se rompe y las fibras de celulosa se exponen así de modo que se vuelven accesibles para las enzimas. La digestión es una etapa crítica que se describe como una de las etapas más caras en biorrefinería (Mosier *et al.*, 2005, *Bioresour Technol.* 96(6):673-86). Por otra parte, también tiene un gran impacto en las etapas siguientes tal como hidrólisis, fermentación, procesos posteriores y también los residuos de los procesos (Alvira *et al.*, *Bioresour Technol.* 101 (13): 485161).

25 Los métodos de digestión habituales se dirigen o bien a licuar principalmente las hemicelulosas (por ejemplo, pretratamiento de explosión con vapor, con ácido diluido) o a alcanzar un aumento en la porosidad al licuar la lignina (por ejemplo, pretratamiento con cal, amoniaco). Estos métodos tienen una grave desventaja: o bien son intensos en energía, o proceden predominantemente a temperaturas ligeramente por debajo de 200°C. O también requieren una recuperación costosa de las sustancias químicas de la digestión. El tipo de pretratamiento puede tener una fuerte influencia en la actividad enzimática y el rendimiento durante los procesos biocatalíticos posteriores. A altas temperaturas de reacción surgen con frecuencia productos de descomposición tóxicos (por ejemplo, furfural), que podrían inhibir las levaduras en caso de una fermentación de etanol directamente conectada (Chandra *et al.*, 2007, *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 108: 67-93; Mansfield *et al.*, 1999, *Biotechnol Prog.* 15 (5): 804816).

30 Como una hemicelulosa el xilano es un polímero no homogéneo. Las hemicelulosas comprenden principalmente pentosas (C5) tal como D-xilosa y L-arabinosa, pero también hexosas (C6) tal como D-glucosa, D-manosa y D-galactosa y también azúcares ácidos tal como ácido glucurónico y ácido 4-O-metil-D-glucurónico. Las hemicelulosas habitualmente tienen un grado de polimerización menor de 200 (Jørgensen *et al.*, 2007). Las hemicelulosas se nombran según los azúcares de los que están compuestas, por ejemplo, el arabinoglucuronoxilano contenido en la paja de trigo que consiste en el esqueleto de xilosa y contiene cadenas laterales de arabinosa y ácido glucurónico. Las unidades de xilosa pueden, además, estar esterificadas con acetato y ácido ferúlico o cumárico, respectivamente (Polizeli *et al.*, 2005, *Appl Microbiol Biotechnol.* 67(5): 577-91). Para la degradación enzimática del xilano, se requieren endoxilanasas, β-xilosidasas, α-glucuronidasas, α-L-arabinofuranidasas y estererasas (Polizeli *et al.*, 2005, *ibidem*). La endoxilanasas corta el enlace glucosídico en el esqueleto de xilano y así reduce el grado de polimerización del sustrato. El producto principal de la hidrólisis son oligómeros de β-D-xilopiranosilo, pero también pequeñas cantidades de mono-, di- y trisacáridos. Las β-xilosidasas cortan los xilooligosacáridos en xilosa monomérica. Las enzimas restantes muestran actividad contra las cadenas laterales y las separan. Las α-glucuronidasas cortan los residuos de ácido glucurónico del esqueleto, las α-L-arabinofuranidasas las cadenas laterales de arabinosa. Se divulga un método mediante el uso de varias α-L-arabinofuranidasas para la liberación de xilosa y arabinosa en el documento WO

2006/114095. Las esterasas rompen los enlaces éster del xilano en cadenas laterales tal como acetato o ácido p-cumárico o, respectivamente, ácido ferúlico (Collins *et al.*, 2005, *FEMS Microbiol Rev.* 29(1): 3-23). La separación de las cadenas laterales es crucial de modo que la endoxilanasas y la β -xilosidasas puedan romper el xilano por completo.

5 Estado de la técnica

La hidrólisis del xilano sirve para cortar el polímero de azúcar en oligómeros de azúcar o monómeros de azúcar. Aquí se pueden diferenciar distintos objetivos. En algunas aplicaciones, es útil cortar ambos polímeros de azúcar, celulosa y xilosa, en monómeros. En particular, este es el caso en la producción de azúcares fermentables a partir de biomásas. Sin embargo, en otras aplicaciones, la celulosa se debe conservar como un polímero, pero el xilano se debe cortar en oligómeros o monómeros. La hidrólisis del xilano se puede producir de forma química o enzimática. Además, la hidrólisis del xilano se puede producir simultáneamente con la separación de un material lignocelulósico o en una etapa separada.

En el documento US 3.523.911 se describe un método químico, en el que la biomasa se trata con un vapor ácido a temperaturas de 100-150°C, que después, durante la condensación, separa el azúcar del material. Sin embargo, en dicho método, se consume una cantidad muy grande de ácido, y se obtiene un hidrolizado con solo una concentración muy baja de xilosa. Por ejemplo, si se hidroliza xilano al 15%, basado en la materia seca del bagazo, el hidrolizado contendrá solo el 3% de xilosa, que se puede atribuir a la gran cantidad de agua absorbida durante el proceso. El alto consumo de ácido y los costes para la concentración de la solución de azúcar hacen el proceso no rentable.

En el documento US 7.932.063 se describe un método en el que la biomasa se digiere en principio con una solución acuosa que contienen amoníaco. El producto obtenido se hace reaccionar después con una "enzima de sacarificación", una enzima que corta azúcar, con el fin de obtener azúcares fermentables. La enzima puede incluir varias actividades tal como glucosidasa, peptidasa, lipasa, ligninasa y esterasa. De esta manera, se asegura que, si es posible, el polímero de azúcar entero que está presente se rompa en monómeros. Por tanto, se alcanza un alto rendimiento de azúcar con una alta concentración de azúcar del hidrolizado. Una desventaja es la inespecificidad de la hidrólisis. Este método no implica la posibilidad de cortar solo el xilano en un material lignocelulósico, al tiempo que se conserva la celulosa como polímero.

En el documento AT 509 307 A1 se describe un método en el que la biomasa, que se ha digerido mediante una solución alcalina de alcohol a temperaturas por debajo de 100°C, se trata con una enzima que corta hidratos de carbono con el fin de obtener monómeros de azúcar. Si aquí se usa una xilanasas pura como enzima, solo se degrada el xilano, la celulosa se conserva como polímero. La xilosa obtenida del xilano se puede convertir después con una xilosa reductasa a xilitol sin que sea necesaria una separación de la xilosa del hidrolizado. Por tanto, se obtienen azúcares C5 a altas concentraciones a partir de una biomasa que contiene hemicelulosa pretratada. Sin embargo, el método implica la desventaja de que los azúcares C5 de la hidrólisis, o también los productos posteriores reducidos, se pueden separar de la solución de reacción solo con un gran esfuerzo. En la solución están aun presentes restos de xilano soluble, xilooligosacáridos y enzimas o proteínas, respectivamente. Para aislar xilosa o xilitol de dicha solución, se requiere cristalización. Se divulga un método similar en el documento WO 2010/124312.

En la bibliografía los métodos de cristalizar xilitol de hidrolizados se describen como difíciles debido a la baja concentración (Wei *et al.*, 2010; *Frontiers of Chemical Engineering in China* 4(1): 57-64; Rivas *et al.*, 2006, *Agric Food Chem.* 54(12): 4430-5). Además, se debe realizar una etapa de purificación antes de la cristalización debido a la composición compleja de tales hidrolizados. Rivas y *col.*, (2006) describen un método en el que una etapa de purificación se realiza con carbón activo y la concentración del xilitol se alcanza después evaporando el solvente. Wei y *col.* emplean una etapa de purificación con carbón activo e intercambiadores iónicos antes de que aumente la concentración del xilitol por evaporación del solvente. En ambos casos, la cristalización se realiza añadiendo etanol en frío. En especial, la concentración de la solución de xilitol por evaporación del solvente es muy costosa y no es óptima para un proceso a escala industrial.

El documento US 2.463.784 divulga la producción de azúcares ácidos como aldopentosas en cultivos de bacterias del género *Pseudomonas*.

En Watanabe y *col.* se describe una ruta metabólica de arabinosa en microorganismos, en donde la arabinosa se convierte en α -cetoglutaratato en 5 etapas independientemente de fosforilación (Watanabe *et al.*, 2005; *Nucleic Acids Symp Ser (OxJ)*. (49):309-10; Watanabe *et al. J Biol Chem.* 281(44):33521-36, 2006, documento WO2007/046417). En primer lugar, el azúcar se oxida a L-arabino- γ -lactona mediante una L-arabinosa-1-deshidrogenasa. Durante la reacción la enzima transfiere los electrones del sustrato a NADP⁺ o NAD⁺, respectivamente. Mediante la L-arabinolactonasa, la L-arabino- γ -lactona se abre para formar L-arabonato. La enzima no requiere un cofactor. Sobre el arabonato, siguen dos etapas de deshidratación. La primera está catalizada por la L-arabonato deshidratasa, que convierte el L-arabonato a L-2-ceto-3-desoxiarabonato (L-KDA). La L-KDA deshidratasa convierte después el último a semialdehído del ácido α -cetoglutárico (α -KGS). Las dos deshidratasas catalizan también las reacciones sin cofactor soluble (Watanabe *et al.*, 2006, *J Biol Chem.* 281(39):2887688). Al final, el semialdehído se oxida después a α -cetoglutaratato mediante la α -KGS deshidrogenasa. Dicha enzima requiera, a su vez, NAD⁺ o NADP⁺, respectivamente, para la catálisis de la oxidación (Watanabe *et al.*, 2006, *ibidem*). Sin embargo, dicha conversión no es adecuada para

una aplicación a escala industrial en esta forma, puesto que dos de las cinco etapas requieren los cofactores NAD(P)⁺ en cantidades estequiométricas, lo que produciría costes muy altos. También Novick y Jyler describen una ruta metabólica de arabinosa catalizada por enzimas en un microorganismo (Novick et al. 1982, Journal of Bacteriology, 149(1): 364-7).

En el documento US 2006/0234363 A1, se usa parcialmente la ruta metabólica descrita por Watanabe *et al.* (2006) con el fin de producir 1,2,4-butanotriol en microorganismos a partir de arabinosa y xilosa. Para ello, primero el azúcar se oxida a lactona y se hidroliza al correspondiente ácido por medio de deshidrogenasa y lactonasa. A continuación, se produce una deshidratación en C3 en las células de modo que se forma ácido D- o L-3-desoxi-glicero-pentulosónico, respectivamente, dependiendo de qué azúcar se usa. Posteriormente, sin embargo, tiene lugar una descarboxilación del grupo ácido, de modo que se forma el D- o L-dihidrobutoanal, respectivamente. Después de ello, el aldehído en C1 también se reduce, de modo que se forma D- o L-1,2,4-butanotriol, respectivamente. Puesto que, en esta aplicación, la operación se produce en células enteras, no es necesario añadir las cantidades estequiométricas de cofactor para las etapas redox. Sin embargo, es una desventaja que en células en general se puede operar con menores concentraciones de sustrato que en un sistema sin células. También está el hecho de que el sistema no es tan eficaz si las operaciones se producen en células enteras, ya que una parte de los azúcares usados contribuyen a la supervivencia de los organismos y, por tanto, no se convierten en producto.

En el documento US 6.284.904 se describe un método que sirve para la eliminación de ácidos orgánicos tal como, por ejemplo, succinato, de soluciones industriales tal como lotes de fermentación o hidrolizados. Al hacerlo, la solución se coloca sobre un intercambiador aniónico, que se lava en condiciones en las que los ácidos orgánicos no se eluyen. Posteriormente, los ácidos orgánicos se eluyen por adición de aniones inorgánicos, más fuertes. De esta manera se pueden aislar y también concentrar aniones orgánicos de una solución compleja como, por ejemplo, un hidrolizado.

En el documento US 6.187.570 se describe un método mediante el que se pueden aislar derivados del ácido glucónico de un lote de fermentación o un lote biocatalítico sin células por electrodiálisis. Entre el cátodo y el ánodo se montan alternativamente varias membranas de aniones y cationes. El bloque del cátodo, ánodo y membranas intermedias se llena con un electrolito. Hay "compartimentos de alimentación" en los que se introduce la solución, un lote de fermentación o un lote biocatalítico sin células. Además, hay "compartimentos de concentración" en los que se concentran los ácidos. Ambos compartimentos están separados entre sí por una membrana aniónica y una membrana catiónica. Si se aplica un voltaje, los ácidos cargados negativamente se mueven a través de la membrana aniónica en el compartimento de concentración, mientras que los componentes no cargados de la solución permanecen en el compartimento de alimentación. De esta manera, el ácido glucurónico o los derivados de dicho ácido, respectivamente, se separa(n) de los componentes neutros y se concentra(n).

En el documento US 5.464.514 se describe un método en el que los azúcares se separan según su diferente tendencia a unirse a un ácido débil. La separación se realiza después por electrodiálisis. Se elige ácido bórico como el ácido débil. Diferentes azúcares muestran una tendencia diferente a unirse a ácido bórico. El compuesto de azúcar y ácido bórico está cargado negativamente y se mueve en el campo eléctrico, mientras que los azúcares que no se unen al ácido bórico permanecen sin cargar. La célula de electrodiálisis consiste en un cátodo y un ánodo entre los que se montan dos membranas de intercambio de cationes. Entre las dos membranas de intercambio de cationes, se localiza una membrana de intercambio aniónico que divide el espacio intermedio en 2 compartimentos. El compartimento I está localizado en el lado del cátodo, y el compartimento II está localizado en el lado del ánodo. Si ahora se introduce una solución de azúcares que se van a separar en el compartimento I y se aplica un voltaje, los iones cargados negativamente, es decir, los azúcares que se han unido al ácido bórico, se mueven a través de la membrana de intercambio aniónico al compartimento II. Los azúcares sin cargar permanecen en el compartimento I. El método se ha probado para la separación de lactosa y lactulosa, así como para la separación de glucosa y fructosa. Sin embargo, dicho método se basa en el hecho de que existe una afinidad diferente de la unión a ácido bórico entre los azúcares. Sin embargo, parte de los azúcares con menor afinidad para ácido bórico también se unirá al ácido y, por tanto, se moverá al compartimento II. Por tanto, no es posible una separación de los azúcares, simplemente, la proporción de los azúcares entre sí cambia. En el caso de fructosa y glucosa, la proporción de tasas de transferencia fue de 1,4 a 1. La separación se puede aumentar por varias etapas de electrodiálisis. El ácido bórico y el azúcar se pueden separar posteriormente entre sí en una etapa adicional de electrodiálisis. El método tiene la desventaja de que solo se puede producir una separación apropiada mediante numerosas etapas de electrodiálisis. Además, este método no diferencia entre azúcares monoméricos y diméricos u oligoméricos, respectivamente. Solo se puede producir una buena separación si las sustancias que se van a separar son muy diferentes con respecto a su tendencia a unirse a ácido bórico. Además, una desventaja es que, con el ácido bórico, se debe emplear un componente (tóxico) adicional.

En el documento US 2003/0172850, se describe una composición que sirve como un aditivo para mezclas de cemento y que contiene

- (A) un ácido lignosulfónico o sales del mismo; un ácido aldohexónico o sales del mismo; un ácido hexurónico o sales del mismo, "ácidos hexáricos" o sales de mismos; o mezclas de los mismos; y
- (B) al menos un ácido aldopentónico o sales del mismo.

Descripción de la invención

Se ha encontrado ahora un proceso que permite una utilización directa de los azúcares formados durante la hidrólisis de materiales que contienen lignocelulosa (que contienen hemicelulosa, respectivamente).

5 En un aspecto la presente invención proporciona un proceso para la producción de ácido arabónico a partir de un material que contiene hemicelulosa, en donde

- a) el material que contiene hemicelulosa se hidroliza de forma enzimática o no enzimática y el hidrolizado obtenido contiene arabinosa y xilosa como azúcares liberados, y

10 b) el hidrolizado obtenido se somete a una conversión

caracterizado por las siguientes condiciones:

- 15 - la arabinosa se convierte a la γ -arabinolactona por medio de una oxidorreductasa y la γ -arabinolactona se hidroliza a ácido arabónico, en donde los cofactores redox se reducen a NADH y/o NADPH por la oxidorreductasa, y
- 20 - los cofactores redox reducidos NADH y/o NADPH se convierten al estado oxidado NAD⁺ y/o NADP⁺ en el mismo lote de reacción por medio de una alcohol deshidrogenasa, una lactato deshidrogenasa, una xilosa reductasa, una oxidasa y/o una o más enzimas redox, que están acopladas a un electrodo.

20 Un proceso proporcionado por la presente invención se denomina en el presente documento un "proceso de (según) la presente invención".

25 En un proceso según la presente invención, tanto la hidrólisis del material que contiene hemicelulosa como la conversión del azúcar liberado en ácido arabónico, como un compuesto que tiene al menos un sitio de unión iónico puede tener lugar en un lote de reacción. Esto significa que el hidrolizado no se tiene que aislar antes de la conversión del azúcar liberado a ácido arabónico (reacción en un recipiente).

30 Un material que contiene hemicelulosa que se puede usar en un proceso según la presente invención es obtenible de un material lignocelulósico, por ejemplo, mediante un pretratamiento de un material que contiene lignocelulosa.

35 En un proceso según la presente invención, un "material que contiene lignocelulosa" comprende en particular, biomasa que contiene lignocelulosa, por ejemplo, plantas anuales tal como hierbas (secas), o partes de hierbas, preferiblemente hierbas, paja, hierbas para energía tal como, por ejemplo, pasto varilla, hierba del elefante o abacá, sisal, bagazo, o sustratos de lignocelulosa atípicos tales como cáscaras, por ejemplo, lemas tal como cáscaras de arroz, en particular preferiblemente paja, hierbas para energía, bagazo o cáscaras, incluso más preferiblemente paja o bagazo.

40 Una biomasa que contiene lignocelulosa para uso en un proceso según la presente invención preferiblemente está pretratada, por ejemplo, mediante un tratamiento con una solución alcohólica acuosa alcalina, preferiblemente a temperaturas desde 50 a 100°C, por ejemplo, de 100°C y menores, preferiblemente de 85°C y menores, en particular preferiblemente de 71°C. Preferiblemente, el contenido de sólidos del material lignocelulósico en la solución, de este modo, asciende al 1-40% en peso, por ejemplo, al 3-30% en peso de la solución, y el sólido preferiblemente se proporciona a una consistencia del 1-40% en peso, por ejemplo, del 3-30% en peso, en particular del 5-20% en peso. Preferiblemente como un alcohol para el pretratamiento se usa un alcohol alifático tal como un alcohol de C₁₋₆, en particular preferiblemente un alcohol de C₁₋₄ tal como etanol o isopropanol. El valor de pH de la solución alcohólica, que preferiblemente varía de 10 a 14, se puede ajustar con una base, preferiblemente una base inorgánica, por ejemplo, un hidróxido tal como sosa cáustica, potasa cáustica. La concentración de la base durante la reacción típicamente varía de 1 a 10 mol l⁻¹, preferiblemente de 2 a 6 mol l⁻¹, incluso más preferiblemente de 4,5 a 5,5 mol l⁻¹. Dicha forma de realización particular del pretratamiento de un material que contiene lignocelulosa, que preferiblemente se usa en un proceso según la presente invención, se basa en la realización de que un material que se ha tratado con una solución básica acuosa que comprende un alcohol, en particular un alcohol de C₁₋₆, y que tiene un valor de pH de 10,0 a 14,0 y está enriquecido con celulosa y hemicelulosa es un material más fácilmente utilizable para la degradación enzimática en productos de corte de hidratos de carbono que un material pretratado según una forma de realización diferente.

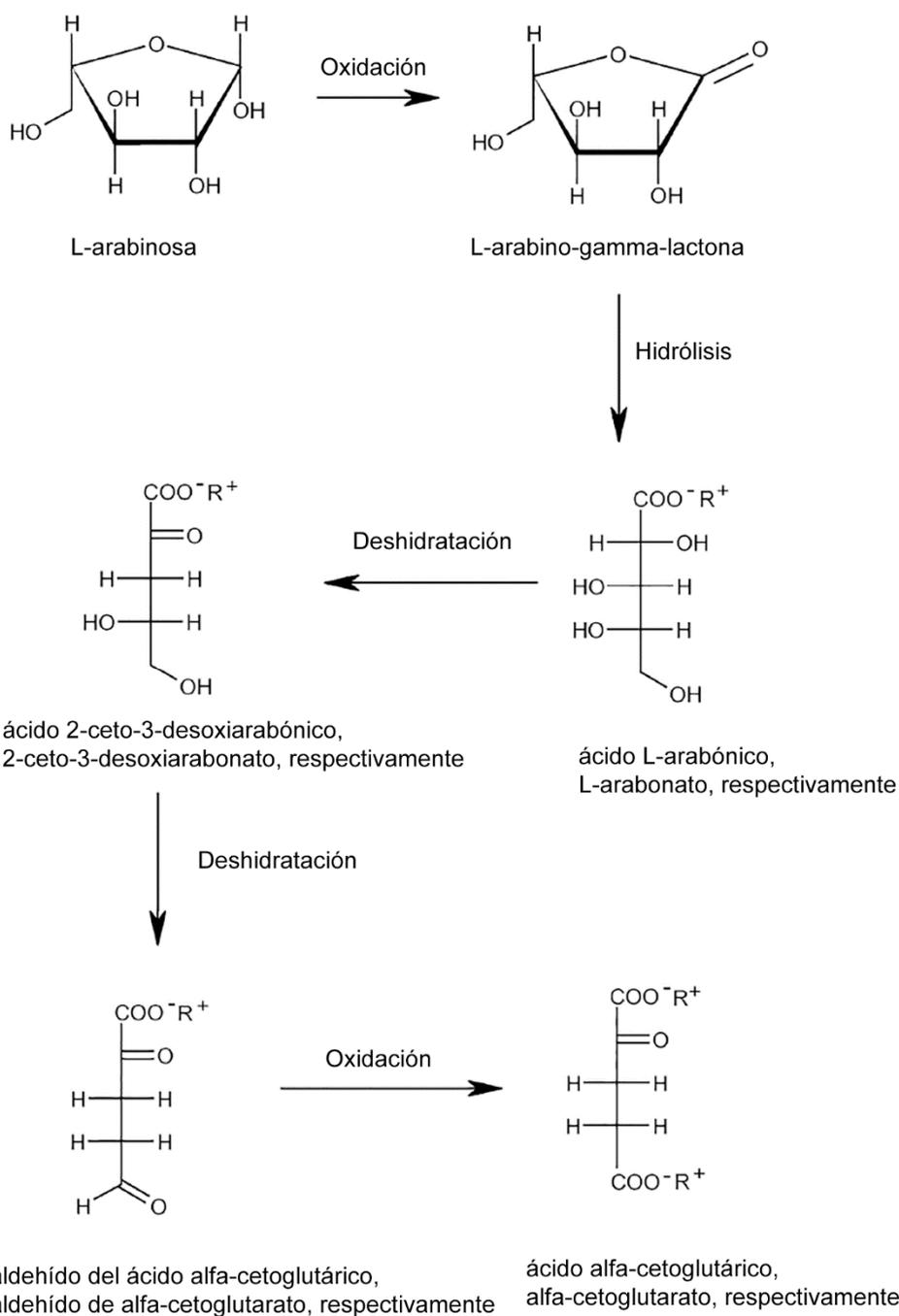
55 El material que contiene lignocelulosa o hemicelulosa, respectivamente, que se usa en un proceso según la presente invención, se somete a una hidrólisis enzimática o no enzimática, preferiblemente enzimática. Se puede realizar una hidrólisis no enzimática para obtener un hidrolizado que contiene azúcar según métodos convencionales, por ejemplo, mediante hidrólisis catalizada por ácido. Para la hidrólisis enzimática, que se puede producir según métodos conocidos, se usan enzimas adecuadas, por ejemplo, endoxilasas, β -xilosidasas, α -arabinofuranosidasas, glucoronidasas, celulasas y mezclas de tales enzimas.

65 En un proceso según la presente invención, el material que contiene hemicelulosa, que se obtiene, por ejemplo, después de un pretratamiento como se ha descrito anteriormente, se usa preferiblemente en una solución acuosa con una consistencia del 1-40% en peso de materia seca.

Los compuestos que tienen al menos un sitio de unión iónico incluyen compuestos que tienen al menos un sitio de unión iónico que es adecuado para la salificación, tal como, por ejemplo, grupos ácidos de fórmula $-(COO^-)_nR^{n+}$, en donde R indica hidrógeno o un catión tal como, por ejemplo, un catión alcalino o alcalinotérreo, por ejemplo, Na^+ , K^+ , Ca^{++} , y n indica la carga que muestra el catión y que depende de la valencia del mismo. Los azúcares liberados en un proceso según la presente invención son arabinosa, por ejemplo, L-arabinosa y xilosa, por ejemplo, D-xilosa.

La conversión del azúcar arabinosa en la forma de un compuesto que tiene al menos un sitio de unión iónico, es decir, ácido arabónico, tiene lugar enzimáticamente. Se puede producir, por ejemplo, según el siguiente esquema de reacción 1, en donde se muestra la conversión de arabinosa a ácido alfa-cetoglutarico a través de oxidación enzimática e hidrólisis a ácido arabónico, es decir, la conversión de un azúcar en un compuesto que muestra un grupo ácido. Al añadir cationes apropiados, por ejemplo, en forma de hidróxidos tal como NaOH, KOH, $Ca(OH)_2$, el grupo ácido se puede convertir a una sal, si se desea. R^+ en el esquema de reacción 1 significa hidrógeno o, como en el caso ilustrado, un catión monovalente tal como Na^+ o K^+ .

Esquema de reacción 1



En un proceso según la presente invención, es una ventaja que la arabinosa como un azúcar liberado por la hidrólisis que, debido al tratamiento enzimático, se proporciona en la forma de un compuesto que tiene al menos un sitio de unión iónico, se pueda convertir a los productos finales deseados directamente en el hidrolizado mediante la aplicación de enzimas específicas adicionales. En el esquema de reacción mostrado anteriormente, esto se ilustra mediante el ejemplo de una conversión de ácido arabónico a ácido alfa-cetoglutárico o, respectivamente, en el caso de que se proporcione como una sal, a alfa-cetoglutaratato, que constituye un producto valioso en química orgánica. En el caso ilustrado, se pueden usar para este fin enzimas que catalizan reacciones de deshidratación específicas sobre el ácido arabónico o productos secundarios del mismo, respectivamente.

En el proceso según la presente invención el azúcar liberado arabinosa se transformará por medio de una oxidoreductasa en una lactona, es decir, arabino- γ -lactona y esta se hidroliza al correspondiente ácido carboxílico, es decir, ácido arabónico, en particular mediante hidrólisis enzimática, no enzimática y/o espontánea.

Con el fin de obtener compuestos deseados específicos, el ácido arabónico obtenido, se puede deshidratar posteriormente, por ejemplo, por medio de un deshidratasa, por ejemplo, con la ayuda de la L-arabonato deshidratasa, en una posición deseada, en arabinosa, por ejemplo, en la posición C3, de modo que se forma el ácido cetocarboxílico correspondiente, es decir, ácido (L)-2-ceto-3-desoxiarabónico. Si se desea, el ácido cetocarboxílico obtenido se puede deshidratar más, por ejemplo, usando una deshidratasa, por ejemplo, en ácido arabónico en la posición C4, de modo que se forma un semialdehído del ácido cetocarboxílico, por ejemplo, en el caso del ácido (L)-2-ceto-3-desoxiarabónico, usando la L-2-ceto-3-desoxiarabonato-deshidratasa el semialdehído del ácido α -cetoglutárico. El semialdehído del ácido cetocarboxílico obtenido se puede oxidar, si se desea, por ejemplo, con ayuda de una oxidoreductasa, para obtener un ácido dicarboxílico; en el caso de un semialdehído del ácido α -cetoglutárico, por ejemplo, con ayuda de una α -cetoglutaratato-semialdehído-deshidrogenasa para obtener el ácido α -cetoglutárico.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un proceso según la presente invención que se caracteriza en que un ácido arabónico, que se ha obtenido según la presente invención, se deshidrata a ácido 2-ceto-3-desoxiarabónico, por ejemplo, por medio de una deshidratasa, y en un aspecto adicional, el ácido 2-ceto-3-desoxiarabónico, que se ha obtenido según la presente invención, se deshidrata adicionalmente a un semialdehído de ácido cetocarboxílico, por ejemplo, semialdehído del ácido α -cetoglutárico, por ejemplo, por medio de una deshidratasa, y, en un aspecto adicional, el semialdehído del ácido α -cetoglutárico se oxida a un ácido dicarboxílico ácido α -cetoglutárico, por ejemplo, por medio de una oxidoreductasa.

En un proceso según la presente invención, un "semialdehído de ácido cetocarboxílico" en particular semialdehído del ácido α -cetoglutárico se entiende que es un compuesto alifático en el que un átomo de C terminal se proporciona como un grupo carboxilo, un átomo de C terminal diferente se proporciona como un grupo formilo y uno de los restantes átomos de C se proporciona como un grupo ceto.

El/los cofactor(es) redox NADH y/o NADPH, que se ha(n) reducido por una o varias oxidoreductasas, se pueden convertir al estado oxidado NAD⁺ y/o NADP⁺ por medio de al menos una actividad oxidoreductasa adicional, en el mismo lote de reacción. A este respecto, NAD⁺ indica la forma oxidada y NADH la forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina, mientras que NADP⁺ indica la forma oxidada y NADPH la forma reducida del fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina.

Para convertir los cofactores reducidos a la forma oxidada son adecuadas, por ejemplo, como una actividad oxidoreductasa, una alcohol deshidrogenasa, una xilosa reductasa, una lactato deshidrogenasa, una oxidasa, enzimas redox, que se acoplan a un electrodo, tal como una alcohol deshidrogenasa, una lactato deshidrogenasa, una oxidasa, enzimas redox, que se acoplan a un electrodo.

Correspondiente es el proceso según la presente invención caracterizado en que los cofactores redox NADH y/o NADPH, que se reducen por una o varias oxidoreductasas, se convierte(n) al estado oxidado NAD⁺ y/o NADP⁺ en el mismo lote de reacción por medio de una alcohol deshidrogenasa, una lactato deshidrogenasa, una xilosa reductasa, una oxidasa, una o varias enzimas redox, que están acopladas a un electrodo.

Al usar una o varias actividades oxidoreductasas para convertir el/los cofactor(es) redox NADH y/o NADPH de vuelta al estado oxidado NAD⁺ y/o NADP⁺ en el mismo lote de reacción, se evita el uso de grandes cantidades de cofactor(es) redox costosos de modo que, como resultado, el proceso se vuelve económico.

Una ventaja adicional de un proceso según la presente invención es que el hidrolizado de la hidrólisis de la biomasa que contiene hemicelulosa se puede usar directamente para la conversión de azúcares monoméricos sin que sea necesaria la purificación o concentración de los mismos. La conversión de los azúcares monoméricos puede tener lugar directamente en una mezcla de azúcares, por ejemplo, diferentes azúcares, opcionalmente polímeros de azúcar no hidrolizados y, además, sólidos que, opcionalmente, aún están presentes. Una ventaja adicional del proceso es que los azúcares monoméricos se pueden aislar y concentrar del hidrolizado muy fácilmente mediante una conversión a compuestos que tienen al menos un sitio de unión iónico. De esta manera, se pueden separar fácilmente de los otros componentes que, por ejemplo, podrían ser xilano no convertido o xilooligosacáridos. Al elegir la enzima apropiada,

también específicamente solo azúcares C5 o solo azúcares C6 se pueden convertir y separar, mientras que todos los otros azúcares permanecen en la solución. En un proceso según la presente invención, preferiblemente se convierten azúcares C5.

5 En un proceso según la presente invención, la concentración de compuestos producidos que tienen un sitio de unión iónico se puede disminuir en la mezcla por un método de separación. Los ejemplos de tales métodos de separación incluyen cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico, y/o electrodiálisis.

10 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un proceso según la presente invención en el que los compuestos que se han producido, que tienen un sitio de unión iónico, se separan de la mezcla de reacción en particular, por medio de cromatografía de intercambio iónico y/o electrodiálisis.

15 Mediante ello, la concentración de los compuestos producidos que tienen un sitio de unión iónico se disminuye en la mezcla.

Tal separación se puede producir en cualquier punto en un proceso según la presente invención tan pronto como se proporcionen los compuestos que tienen un sitio de unión iónico.

20 Los azúcares que no se convierten en un proceso según la presente invención se pueden someter, por ejemplo, a métodos enzimáticos y/o no enzimáticos adicionales.

25 En un aspecto adicional la presente invención proporciona el proceso según la invención caracterizado en que se produce ácido arabónico, ácido 2-ceto-3-desoxiarabónico, semialdehído del ácido α -cetoglutárico y/o ácido α -cetoglutárico a partir del material que contiene lignocelulosa.

En los siguientes ejemplos la temperatura de indica en grados Celsius ($^{\circ}$ C).

Ejemplo 1

30 Hidrólisis enzimática de un material que contiene hemicelulosa

Se suspende xilano en un tampón acetato con pH 4,3 a una concentración del 8% (p/v) y se mezcla con ACCELLERASE® TRIO™ de la empresa Genencor a una concentración de 1 g de solución de enzima por 1 g de xilano. El lote se agita a 50°C durante 24 h. El valor de pH se comprueba y reajusta en caso de una desviación de por encima de 4,5 o por debajo de 4,1. El lote de filtra a través de un embudo Büchner y el filtrado (hidrolizado) se analiza para su composición de monómeros y su concentración por medio de HPLC-LEX-DAD. Una concentración de aproximadamente el 6% de xilosa, el 0,43% de arabinosa y el 0,27% de glucosa está contenida en el filtrado. De esta manera, aproximadamente el 85% de la xilosa obtenida en el xilano se obtiene en una forma monomérica.

40 Ejemplo 2

Análisis del hidrolizado por HPLC

45 Se centrifugan 500 μ l del filtrado de la hidrólisis de xilano según el ejemplo 1, y el sobrenadante se pasa después a través de un filtro de PDVF (difluoruro de polivinilideno) de 0,2 μ M y se analiza por medio de HPLC-LEX-RID (Agilent Technologies Inc.). Los azúcares se separan mediante ello a través de una columna de plomo (Shodex® Sugar SP0810) de Shodex Denko K.K. con un flujo de 0,5 ml/min de agua (VWR: calidad HPLC) a 80°C. La detección se realiza por medio de Agilent RID. Se usan un filtro en línea de Agilent Techonogies Inc., y como precolumnas, una columna de fase inversa (Axpak-WA-G), una columna de intercambio aniónico (Shodex® Asahipak® ODP-50 6E) y una precolumna de azúcar (Shodex® SP-G), cada una suministrada por Showa Denko K.K.

Ejemplo 3

55 Oxidación de L-arabinosa a arabonato por una arabinosa deshidrogenasa con reciclaje de cofactor a través de una alcohol deshidrogenasa y posterior hidrólisis de la lactona por sosa cáustica

60 Un lote de 0,5 ml contiene 50 mg/ml de arabinosa, 5 U/ml de la arabinosa deshidrogenasa recombinante de *Burkholderia vietnamiensis* y una mezcla de NADP⁺ 0,5 mM y NADPH 0,5 mM. Para la regeneración del cofactor, se añaden acetona al 2,5% (p/v) y 5 U/ml de la alcohol deshidrogenasa recombinante de *Lactobacillus kefir*. Las enzimas se usan en forma de un lisado celular. La reacción tiene lugar a 40°C y pH 10 durante 24 h con agitación continua (900 rpm). Después de 24 h, el recipiente de reacción se incuba a 60°C durante 10 min con el fin de inactivar las enzimas. Posteriormente, se añaden 5 μ l de NaOH 2 M.

65 De esta manera, más del 60% de la L-arabinosa se convierte a L-arabonato de sodio. El análisis se efectúa con GC-MS.

Ejemplo 4**Oxidación de L-arabinosa a arabonato por una arabinosa deshidrogenasa con reciclaje de cofactor a través de una alcohol deshidrogenasa y posterior hidrólisis de la lactona por una lactonasa**

5 Un lote de 0,5 ml contiene 50 mg/ml de arabinosa, 5 U/ml de la arabinosa deshidrogenasa recombinante de *Burkholderia vietnamiensis* y una mezcla de NADP⁺ 0,5 mM y NADPH 0,5 mM. Para la regeneración del cofactor, se añaden acetona al 2,5% (p/v) y 5 U/ml de la alcohol deshidrogenasa recombinante de *Lactobacillus kefir*. Las enzimas se usan en forma de un lisado celular. La reacción tiene lugar a 40°C y pH 10 durante 24 h con agitación continua (900 rpm). Después de 24 h, el recipiente de reacción se incubaba a 60°C durante 10 min con el fin de inactivar las enzimas. Después de enfriar, se añaden 50 µl de un lisado celular de *E. coli* con L-arabinolactonasa de *Azospirillum brasiliense* sobreexpresada, y la reacción se agita a 40°C (900 rpm) durante otras 24 h. Posteriormente, el recipiente de reacción se incubaba a 60°C durante 10 min con el fin de inactivar la enzima.

15 De esta manera, más del 65% de la L-arabinosa se convierte a L-arabonato de sodio. El análisis se efectúa con GC-MS.

Ejemplo 5**20 Análisis de las reacciones de oxidación por medio de GC-MS**

Para el análisis de las reacciones de oxidación en GC-MS, los sustratos y productos se deben derivar. Los lotes se centrifugan, se pasan a través de un filtro de PVDF de 0,2 µm y se diluyen 1:30. Se transfieren 20 µl de la dilución a un vial de 0,5 ml y se seca en la Speedvac. Para la derivación, se añaden después 150 µl de piridina y 50 µl de una mezcla 99:1 de N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida y trimetilclorosilano. Como estándar interno, sorbitol está contenido en la piridina a una concentración de 0,1 mg/ml. La derivación tiene lugar a 60°C durante 16 h. Posteriormente, las muestras se analizan a través de GC-MS. Al hacer esto, las muestras se separan mediante la columna de separación HP-5ms (5%-fenil)-metilpolisiloxano en un cromatógrafo de fase gaseosa y se analizan con un espectrómetro de masas de Shimadzu GCMS QP210 Plus.

30

Ejemplo 6**Conversión de arabinosa a arabonato/arabinolactona en una mezcla de xilosa y arabinosa**

35 Se disolvieron 180 mg de D-xilosa y 20 mg de L-arabinosa junto con 2 U de L-arabinosa deshidrogenasa de *Burkholderia vietnamiensis* así como 2 U de D-xilosa reductasa de *Candida parapsilosis* a un volumen total de 500 µl de tampón Tris acuoso 50 mM (pH = 7,0 a 25°C). La reacción tuvo lugar en un recipiente de reacción cerrado a 40°C con agitación (900 rpm, Eppendorf Thermomix®). Después de 30 min, las enzimas se inactivaron mediante 15 minutos de incubación a 65°C, las proteínas desnaturalizadas se separaron por centrifugación (21000 g, 5 min), y los azúcares se cuantificaron por medio de GC-MS. La L-arabinosa empleada se convirtió por completo, el 92% de ella a L-arabonato o L-arabino-γ-lactona y el 8% restante a L-arabitol. Aproximadamente el 98,5% de la D-xilosa empleada permaneció, mientras que el 10,4% se convirtió a xilitol. <0,1% de la D-xilosa empleada se oxidó a D-xilonato/D-xilono-γ-lactona.

40

45 La conversión relativamente selectiva de arabinosa a arabonato/arabinolactona alcanzada en este caso resulta de la mayor actividad específica de la arabinosa deshidrogenasa para arabinosa en comparación con xilosa, de las proporciones relativas de arabinosa y xilosa en la mezcla de reacción, así como de actividad enzimática/tiempo de reacción limitados.

50 El ejemplo muestra, entre otras cosas, que se pueden separar azúcares específicos de una muestra de azúcares por medio de un proceso según la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para obtener ácido arabónico de un material que contiene hemicelulosa, en donde
 - 5 a) el material que contiene hemicelulosa se hidroliza de forma enzimática o no enzimática y el hidrolizado obtenido incluye arabinosa y xilosa como azúcares liberados, y
 - b) el hidrolizado obtenido se somete a conversión, **caracterizado por** una combinación de las siguientes condiciones:
 - 10 - la arabinosa se convierte a la γ -arabinolactona por medio de una oxidorreductasa y la γ -arabinolactona se hidroliza a ácido arabónico, en donde los cofactores redox se reducen a NADH y/o NADPH por la oxidorreductasa, y
 - los cofactores redox reducidos NADH y/o NADPH se convierten al estado oxidado NAD⁺ y/o NADP⁺ en el mismo lote de reacción por medio de una alcohol deshidrogenasa, una lactato deshidrogenasa, una xilosa reductasa, una oxidasa y/o una o varias enzimas redox, acopladas a un electrodo.
- 15 2. Proceso según la reivindicación 1, **caracterizado en que** el ácido arabónico se deshidrata a ácido 2-ceto-3-desoxiarabónico.
- 20 3. Proceso según la reivindicación 2, **caracterizado en que** el ácido arabónico se deshidrata por medio de una deshidratasa.
4. Proceso según la reivindicación 2 o 3, **caracterizado en que** el ácido 2-ceto-3-desoxiarabónico se deshidrata adicionalmente a semialdehído del ácido α -cetoglutárico.
- 25 5. Proceso según la reivindicación 4, **caracterizado en que** el ácido 2-ceto-3-desoxiarabónico se deshidrata adicionalmente por medio de una deshidratasa.
6. Proceso según la reivindicación 4 o 5, **caracterizado en que** el semialdehído del ácido α -cetoglutárico se oxida a ácido α -cetoglutárico.
- 30 7. Proceso según la reivindicación 6, **caracterizado en que** el semialdehído del ácido α -cetoglutárico se oxida por medio de una oxidorreductasa.
8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado en que** los compuestos resultantes que muestran un sitio de unión iónico se separan.
- 35 9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado en que** antes de la conversión según la reivindicación 1, el material que contiene hemicelulosa se produce a partir de un material lignocelulósico.
- 40 10. Proceso según la reivindicación 9, **caracterizado en que** el material que contiene hemicelulosa se produce por tratamiento de un material lignocelulósico con una solución alcohólica acuosa, alcalina.
11. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, **caracterizado en que** el material que contiene lignocelulosa es una biomasa que contiene lignocelulosa.
- 45 12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado en que** los azúcares liberados constituyen una mezcla de L-arabinosa y D-xilosa.
13. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, **caracterizado en que** los compuestos resultantes se separan de la mezcla de reacción por medio de cromatografía de intercambio iónico y/o electrodiálisis.
- 50 14. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, **caracterizado en que** el material que contiene lignocelulosa es de plantas anuales, paja, hierbas para energía, sisal, bagazo o sustratos de lignocelulosa atípicos tal como cáscaras.
- 55 15. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, **caracterizado en que** se produce(n) ácido arabónico, ácido 2-ceto-3-desoxiarabónico, semialdehído del ácido α -cetoglutárico y/o ácido α -cetoglutárico a partir del material que contiene lignocelulosa.