



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0910959-5 B1



(22) Data do Depósito: 03/04/2009

(45) Data de Concessão: 09/02/2021

(54) Título: MÉTODO PARA DESAGREGAÇÃO OU DESCRISTALIZAÇÃO DE CELULOSE, CELULOSE DESCRISTALIZADA OU DESAGREGADA PRODUZIDA PELO DITO MÉTODO, KIT PARA REALIZAR O MESMO E MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

(51) Int.Cl.: C12P 7/06; C08B 1/08.

(30) Prioridade Unionista: 03/04/2008 US 61/042.133.

(73) Titular(es): CELLULOSE SCIENCES INTERNATIONAL, INC..

(72) Inventor(es): RAJAI H. ATALLA.

(86) Pedido PCT: PCT US2009039445 de 03/04/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/124240 de 08/10/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 01/10/2010

(57) Resumo: CELULOSE ALTAMENTE DESORDENADA. São divulgados métodos e sistemas para o tratamento de celulose para torná-la mais acessível para modificação enzimática ou química. A invenção inclui o tratamento de celulose com um álcali em um sistema de cossolvente de álcool/água. O tratamento descristaliza ou desagrega o material celulósico. Os métodos e sistemas aumentam a eficiência das modificações enzimáticas ou químicas de celulose para uso como biocombustíveis ou de derivados de celulose.

“MÉTODO PARA DESAGREGAÇÃO OU DESCRISTALIZAÇÃO DE CELULOSE, CELULOSE DESCRISTALIZADA OU DESAGREGADA PRODUZIDA PELO DITO MÉTODO, KIT PARA REALIZAR O MESMO E MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS”

Referência Cruzada a Pedidos Relacionados

Este pedido reivindica o benefício mediante o U.S.C. 35 § 119(e) do Pedido Provisório nº 61/042,133, depositado em 03 de abril de 2008, a divulgação completa do qual sendo aqui incorporada por referência em sua totalidade.

Introdução

[001]A celulose é o mais abundante de todos os polímeros que ocorrem naturalmente. Quimicamente, ela é um polissacarídeo composto por unidades de anidroglicose (anéis de β -D glicopirranose) unidas por uma ligação de oxigênio (ligações β -1,4-glicosídicas), e tem a fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$. A celulose é o componente mais característico das paredes de células de plantas na medida em que a mesma forma grande parte da armação estrutural da parede celular. A celulose tem uma estrutura de cadeia linear que forma nanofibrilas cristalinas, em que muitos filamentos paralelos β -1,4-glucana se associam lado a lado para formar microfibrilas de nanoescala (2-20 nm de diâmetro e 100-40.000 nm de comprimento) que têm grande resistência à tração e estabilidade química, e são muito resistentes à decomposição, por exemplo, química, enzimática e degradação mecânica. A celulose é insolúvel em água e solventes orgânicos simples. Ela vai inchar em soluções de hidróxido de sódio e é solúvel no reagente Schweizer.

[002]Comercialmente, a celulose é usada para fazer papel, plásticos e têxteis. Os derivados de celulose incluem celofane, rayon, espessantes usados em alimentos e tintas, e revestimentos. Mais recentemente, a indústria de biocombustíveis tem mostrado grande interesse em matéria-prima de celulose para a produção de biocombustíveis, tais como álcoois, por exemplo, etanol ou butanol, através de processos

microbiológicos, bem como de hidrocarbonetos através da conversão catalítica química.

[003]A atratividade da produção de biocombustíveis a partir de matéria-prima de celulose, tais como resíduos agrícolas, gramíneas e resíduos florestais, emana da disponibilidade de grandes quantidades destas matérias-primas baratas, e a conveniência de evitar a queima ou deposição em aterro de materiais de resíduos celulósicos. Algumas matérias-primas de celulose que podem ser usados para a produção de biocombustíveis incluem especificamente (1), resíduos agrícolas, tais como forragem de milho, palha de trigo, palha de cevada, palha de arroz, palha de aveia, casca de aveia, palha de canola e forragem de soja; (2) gramíneas, tais como a switchgrass (*Panicum virgatum*), miscanthus, espartina e capim-amarelo (3); resíduos florestais, tais como madeira de álamo tremedor e serragem, e (4) resíduos de processamento de açúcar, tais como bagaço e polpa de beterraba.

[004]O processo de conversão de fibras celulósicas para um biocombustível requer: 1) liberação de celulose e hemicelulose a partir de lignina e aumento da acessibilidade da celulose e hemicelulose na matéria-prima celulósica para as enzimas celulósicas; e 2) despolimerização ou hidrólise de hemicelulose de polímeros de carboidratos celulose para açúcares livres. Para produzir álcoois, os açúcares são fermentados, então, para um álcool, por exemplo, etanol, e o álcool é normalmente recuperado através de destilação. Alternativamente, os açúcares podem ser convertidos em hidrocarbonetos através de reformulação catalítica.

[005]No entanto, como já foi referida, a celulose contida na maioria das matérias de plantas não é facilmente convertida em açúcares, e esta etapa representa um grande obstáculo na comercialização de processos para a produção de biocombustíveis. Devido à estrutura cristalina da celulose, a conversão enzimática para açúcares, por exemplo, leva uma quantidade considerável de tempo e requer grandes quantidades de enzimas hidrolíticas, tais como celulasas. Da mesma forma que para a

produção de derivados de celulose quimicamente modificados, a celulose deve ser acessível a agentes químicos reativos; isso geralmente requer altas temperaturas, pressões, condições químicas ásperas e longos períodos de tempo.

[006]A conversão eficiente da celulose a partir de material celulósico em açúcares foi originalmente pensada para simplesmente envolver a liberação de celulose e hemicelulose de seu complexo com lignina. Entretanto, os processos mais recentes focam o aumento à acessibilidade de celulose na biomassa lignocelulósica seguido pela despolimerização ou hidrólise de polímeros de carboidratos de celulose para açúcares. O aumento da acessibilidade de celulose é mais frequentemente realizado por pré-tratamento do substrato celulósico.

[007]O objetivo da maioria dos métodos de pré-tratamento é a liberação de uma combinação suficiente de ação mecânica e química, de forma a romper a estrutura da fibra e melhorar a acessibilidade da matéria-prima de enzimas hidrolíticas, tais como celulasas, que podem hidrolisar a celulose. A ação mecânica normalmente inclui o uso de pressão, trituração, moagem, agitação, fragmentação, compressão / expansão, ou outros tipos de ação mecânica. A ação química geralmente inclui o uso de calor (muitas vezes o vapor), ácidos e solventes orgânicos.

[008]Mesmo com o mais eficiente dos processos de pré-tratamento conhecidos atualmente, a quantidade de enzimas hidrolíticas necessárias para converter a celulose em açúcar continua a ser elevada e representa um custo significativo na produção de biocombustíveis celulósico. Desse modo, a conversão eficiente da celulose a partir de material celulósico em açúcares e, por exemplo, a fermentação subsequente dos açúcares em álcool, tal como o etanol, enfrenta um grande desafio para a viabilidade comercial. O aumento do tempo de hidrólise para evitar maiores custos do aumento da dosagem de enzimas requer reatores maiores, que, por sua vez, aumenta os custos dos equipamentos. A mistura e a intermitente mistura da matéria-prima durante a hidrólise pode aumentar a eficiência enzimática, mas os custos dos

equipamentos novamente aumentam, e as forças de cisalhamento aumentadas podem causar a desnaturação da enzima. Ainda outros sistemas comprometem a atividade ideal da enzima e reduzem a eficiência das enzimas.

[009]Além disso, a dificuldade com a conversão de celulose para produtos de alto valor agregado se estende bem além da produção de biocombustíveis. Como se observa, os derivados da celulose incluem fibras e plásticos, por exemplo, celulose regenerada, tais como o rayon e o celofane, ésteres de celulose, tais como acetato, butirato, triacetato e ésteres misturados, nitrato de celulose, viscose e liocel (Tencel).

[0010]Alguns dos domínios cristalinos de celulose são tão firmemente agregados que reagentes químicos não podem penetrar totalmente nos mesmos, semelhante à falta de acesso das enzimas para hidrolisá-los completamente. O resultado é que o grau de substituição ao longo das cadeias de celulose em derivados de celulose pode ser bastante irregular, resultando em problemas de controle de qualidade.

Breve Descrição

[0011]De acordo com os princípios manifestos em modalidades da invenção, métodos e sistemas que desagregam ou descristalizam a celulose são fornecidos para que o mesmo seja mais acessível para modificação enzimática ou química, por exemplo, as reações de hidrólise ou despolimerização. Os métodos e sistemas, de fato, melhoram a conversão de matérias-primas à base de celulose para uso na produção de biocombustíveis e derivados de celulose.

[0012]Os métodos e sistemas aqui incluem tratar a matérias-primas de celulose com uma solução de um álcali em um sistema de cossolvente, incluindo água e um segundo solvente que é polar e completamente miscível em água, para formar uma celulose descristalizada e estabilizar a celulose descristalizada pela lavagem do álcali para produzir uma celulose descristalizada em meio aquoso. A lavagem pode ser realizada com um sistema de cossolvente, que é o mesmo que na etapa de tratamento com razões de variação de água e do segundo solvente. Entre os cossolventes

mais eficazes identificados até agora estão os álcoois. Em modalidades da invenção, este processo é realizado sob condições suaves de temperatura e pressão.

Breve Descrição dos Desenhos

[0013]A invenção pode ser mais bem compreendida e apreciada por referência à descrição detalhada de modalidades específicas aqui apresentadas em conjunto com os desenhos que acompanham, dos quais:

[0014]A FIG. 1 é um difratograma de raios-X de uma polpa antes e após o processo de pré-tratamento de acordo com modalidades da invenção;

[0015]A FIG. 2 é um fluxograma que ilustra um sistema de acordo com as modalidades da invenção, incluindo o pré-tratamento de matéria-prima celulósica para aumentar a sua acessibilidade a despolimerização;

[0016]A FIG. 3 mostra difratogramas de raio-x comparativos de uma celulose isolada a 70°C antes e após a mesma ser recozida a 150°C;

[0017]A FIG. 4 é um gráfico da largura, a meia altura das amostras de celulose recozidas em diferentes temperaturas;

[0018]A FIG. 5 é um fluxograma que descreve uma modalidade em que as enzimas são aplicadas sem pré-tratamento prévio seguido pela separação da celulose residual, pré-tratamento de acordo com os princípios da invenção e, a seguir, recombinação com o sobrenadante da separação após o primeiro estágio;

[0019]A FIG. 6 é um fluxograma que ilustra uma modalidade alternativa para reduzir os tempos de reação enzimática de acordo com os princípios da invenção, incluindo o tratamento da celulose residual a partir de um primeiro estágio de pré-tratamento com segundos estágios de descristalização e hidrólise enzimática para glicose antes da fermentação de etanol;

[0020]A FIG. 7 é um fluxograma que ilustra ainda outra modalidade para reduzir os tempos de reação enzimática de acordo com os princípios da invenção usando um sistema de contracorrente em que a celulose residual dos segundos

estágios de tratamento é recirculada para o primeiro estágio de pré-tratamento.

Descrição Detalhada

[0021] Métodos e sistemas que incorporem os princípios da invenção são fornecidos em que os materiais celulósicos são descristalizados ou desagregados por tratamentos que incluem o contato de um material celulósico com um álcali em um sistema de cossolvente que inclui água e um solvente miscível em água, por exemplo, um álcool ou poliol. A celulose descristalizada é mais acessível para a reação enzimática e química. Os métodos e sistemas de acordo com modalidades da invenção, desse modo, aumentam a eficiência da modificação enzimática ou química da celulose para uso como biocombustíveis ou de derivados de celulose.

[0022] Antes que quaisquer modalidades da invenção sejam explicadas em detalhes, no entanto, é preciso entender que a invenção não está limitada na sua aplicação para os detalhes da construção e arranjo dos componentes estabelecidos na descrição a seguir, ilustrados nos desenhos a seguir ou exemplificados pelos Exemplos. Tal descrição, desenhos e exemplos não se destinam a limitar o escopo de aplicação da invenção, tal como estabelecido nas reivindicações anexas. A invenção é capaz de outras modalidades e de ser praticada ou ser realizada de diversas maneiras.

[0023] Além disso, nenhuma admissão é feita de que qualquer referência, incluindo qualquer documento de patente ou patente citados nesta especificação constitui o estado da técnica. Em particular, será entendido que, salvo indicação em contrário, a referência a qualquer documento aqui não constitui uma admissão de que quaisquer desses documentos fazem parte do conhecimento geral comum do estado da técnica nos Estados Unidos ou em qualquer outro país. Qualquer discussão de referências estabelece o que os seus autores afirmam, e o depositante se reserva o direito de desafiar a exatidão e pertinência de qualquer um dos documentos citados aqui.

[0024]Ao longo desta divulgação, vários aspectos dessa invenção podem ser apresentados em um formato de faixa. Deve ser entendido que a descrição no formato de faixa é simplesmente por conveniência e brevidade, e não deve ser interpretada como uma limitação inflexível sobre o escopo da invenção. Assim, como vai ser entendido por uma pessoa versada na técnica, para qualquer e todos os propósitos, em especial em termos de fornecer uma descrição escrita, todas as faixas divulgadas aqui também abrangem quaisquer e todas as subfaixas e combinações possíveis de subfaixas, bem como todos os valores numéricos integrais e fracionários dentro dessa faixa. Apenas como um exemplo, uma faixa de 20% a 40% pode ser dividida em faixas de 20% a 32,5% e 32,5% a 40%, 20% a 27,5% e 27,5% a 40%, etc.. Qualquer faixa listada é também é facilmente reconhecida como descrevendo e permitindo suficientemente a mesma faixa de sendo dividida em pelo menos iguais metades, terços, quartos, quintos, décimos, etc.. Como um exemplo não limitante, cada faixa aqui discutida pode ser facilmente dividida em um terço inferior, terço médio e superior, etc. Além disso, como também será entendido por um técnico no assunto, toda linguagem tal como "até", "pelo menos", "maior que", "menor que", "mais de" e similares incluem o número recitado e referem-se às faixas que podem ser posteriormente divididas em subfaixas, tal como discutido acima. Da mesma forma, todas as razões divulgadas aqui também incluem todas as subfaixas que caem dentro da faixa mais ampla. Além disso, as frases "variando / varia entre" um primeiro número de indicação e um segundo número de indicação e "variando / varia a partir de" um primeiro número de indicação para um segundo número de indicação são usados aqui intercambiavelmente. Os precedentes são apenas exemplos do que é especificamente pretendido.

[0025]Além disso, é preciso entender que a fraseologia e a terminologia usadas neste documento são para o propósito de descrição e não devem ser consideradas como uma limitação. O uso de "compreendendo", "incluindo", "tendo" e variações dos mesmos aqui serve para abranger os itens listados em seguida e equivalentes

dos mesmos, bem como itens adicionais. O termo "compreendendo" abrange os termos "consistindo em" e "consistindo essencialmente em". O uso de "consistindo essencialmente em" significa que a composição ou método pode incluir ingredientes adicionais e / ou etapas, mas somente se os ingredientes adicionais e / ou etapas não alterem materialmente as características básicas e novas da composição ou método reivindicado. A menos que especificado ou limitado em contrário, os termos tais como "montado", "conectado", "suportado" e "acoplado" e variações dos mesmos são amplamente usados e englobam tanto as montagens diretas quanto indiretas, conexões, suportes e acoplamentos. Além disso, "conectado" e "acoplado" não estão restritos às conexões físicas ou mecânicas ou acoplamentos.

[0026]Salvo observado de outro modo, os termos técnicos são usados de acordo com o uso convencional. No entanto, como aqui usado, as seguintes definições podem ser úteis para auxiliar o prático hábil para a compreensão da invenção:

[0027]Como usado aqui, os termos "matéria-prima celulósica", "substrato celulósico" ou "material celulósico", são destinados para se referir a qualquer tipo de biomassa que contém celulose. Por exemplo, as matérias-primas celulósicas podem incluir gramíneas, tais como o switchgrass (*Panicum virgatum*), espartina, azevém, miscanthus, ou uma combinação dos mesmos; resíduos de açúcar-processamento, tais como açúcar de bagaço de cana e açúcar de polpa de beterraba, resíduos agrícolas, tais como a forragem de soja, forragem de milho; palha de aveia, palha de arroz, casca de arroz, palha de cevada, sabugos de milho, palha de trigo, palha de canola, casca de aveia, fibra de milho e resíduos florestais, tais como fibras de polpa de madeira recicladas, serragem, madeira dura, madeira resinosa, ou qualquer combinação dos mesmos. Além disso, as matérias-primas celulósicas podem incluir resíduos celulósicos ou de materiais de resíduos florestais, tais como papel de jornal, papelão, e semelhantes. A matéria-prima celulósica também pode incluir uma ou mais espécies de fibras que se originam de diferentes matérias-primas celulósicas. A palha de trigo,

palha de cevada, forragem de milho, forragem de soja, palha de canola, switchgrass, capim-amarelo, bagaço de cana de açúcar, espartina, casca de aveia, açúcar, polpa de beterraba e miscanthus são particularmente vantajosas como matérias-primas celulósicas, devido à sua ampla disponibilidade e baixo custo.

[0028]O termo "enzima(s) hidrolítica(s)" destina-se a referir às enzimas que catalisam a hidrólise de materiais biológicos, tais como a celulose. As enzimas hidrolíticas são "enzimas de celulase" ou "celulases" (usadas intercambiavelmente) que são enzimas que catalisam a hidrólise de celulose para produtos, tais como a celobi-ose, glicose, celo-oligodextrinas, violoncelo e outros celo-oligossacarídeos. O termo "celulase" é destinado para ser um termo genérico que denota um complexo ou família de multienzima, incluindo exo-celobiohidrolases (CBH), endoglucanases (EG), e β -glicosidases (β G) que podem ser produzidas por uma série de plantas e microorganismos. Note-se que muitos extratos de celulase bruta também incluem algumas hemicelulases. O processo de acordo com modalidades da invenção pode ser realizado com qualquer tipo de complexo enzimático de celulase, independentemente da sua origem; no entanto, as celulases microbianas são geralmente acessíveis a um custo menor do que as das plantas. Entre as celulases mais amplamente estudadas, caracterizadas e produzidas comercialmente estão, por exemplo, aquelas obtidas a partir de fungos do gênero *Aspergillus*, *Humicola* e *Trichoderma*, e a partir de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Thermobifida*. Além disso, por exemplo, a celulase produzida por fungos filamentosos *Trichoderma longibrachiatum* inclui pelo menos duas enzimas celobiohidrolases denominadas CBHI e CBHII e pelo menos 4 enzimas EG.

[0029]O termo "enzimas de fermentação" refere-se às enzimas que podem catalisar a conversão dos açúcares celulósicos em álcool, incluindo o etanol, bem como álcoois de cadeias superiores, tal como o butanol. Normalmente, levedura tal como a *Saccharomyces cerevisiae* é usada para produzir as enzimas que catalisam a conversão. As enzimas também podem incluir enzimas bacterianas de *Clostridium*

acetobutylicum, bem como enzimas produzidas por microorganismos projetados para produzir os álcoois de cadeias superiores a partir dos açúcares da celulose.

[0030]O termo "grau de polimerização" (abreviado como DP) se refere ao número de monômeros de D-glicose em uma molécula de celulose. Desse modo, o termo "grau médio de polimerização" ou "DP médio" refere-se ao número médio de moléculas de D-glicose por polímero de celulose em uma população de polímeros de celulose.

[0031]Como usado aqui, os termos "tratamento", "tratar", "pré-tratamento", ou "pré-tratar" em relação à celulose são destinados para se referir a um processo ou tratamento de acordo com modalidades da invenção em que a celulose é mais acessível para reações enzimáticas ou químicas, por exemplo, reações químicas catalíticas.

[0032]O termo "modificação ou degradação" em referência a celulose é usado para se referir à alteração, biológica, por exemplo, alteração enzimática ou alteração induzida por química da estrutura nativa da celulose. Tais mudanças e alterações são conhecidas na arte e incluem as envolvidas na degradação enzimática e / ou hidrólise enzimática ou química da celulose, bem como modificações químicas envolvidas em uma variedade de produtos comerciais à base de celulose, produção de álcool por fermentação de biomassa e geração de biocombustíveis rico em hidrogênio.

[0033]O termo "estável" ou "estabilização" em relação à celulose descristalizada refere-se à celulose descristalizada que não muda materialmente ao longo de um período de tempo selecionado e sob condições selecionadas.

[0034]Em vista das desvantagens expostas anteriormente inerentes a conversão de celulose convencional, as modalidades da invenção fornecem métodos novos para a descristalização ou desagregação de celulose. Os métodos incluem a reagir a celulose com uma solução de tratamento, que inclui um álcali dissolvido em um sistema de cossolvente, em condições brandas de temperatura e pressão que podem

ser otimizadas para a viabilidade econômica. A submissão da celulose para tal tratamento, de acordo com modalidades da invenção faz a celulose mais acessível para a reação enzimática ou química, pela abertura de domínios firmemente agregados, que são também a fonte de recalcitrância durante a hidrólise. A celulose descristalizada resultante de acordo com modalidades da invenção também permite a substituição muito mais uniforme ao longo das cadeias de celulose, minimizando assim os problemas de controle de qualidade atualmente inerentes na produção de produtos derivados de celulose. É feita referência à FIG. 1, que mostra um difratograma de raios-X de polpa antes e após o tratamento de acordo com as modalidades da invenção, demonstrando a descristalização da polpa.

[0035]Existem muitos sistemas de solvente que podem inchar celulose nativa sem solubilizar-las. Com o processo de acordo com as modalidades da invenção que se abre para os domínios de celulose semicristalina, é provável que vários sistemas que incham a celulose possam ser usados para solubilizar a celulose, desse modo, tornar possível a regeneração de celulose em um processo economicamente competitivo.

[0036]Como descrito acima, a solução de tratamento de acordo com as modalidades da invenção inclui um álcali dissolvido em um sistema de cossolvente. Adequadamente, o álcali é dissolvido em um sistema de cossolvente de água mais um segundo solvente miscível em água. Em um aspecto, o segundo solvente é adequadamente um álcool que pode incluir, por exemplo, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol, ou um poliol. Em outro aspecto, o segundo solvente pode incluir outros solventes próticos, bem como solventes apróticos que são miscíveis em água. Em uma modalidade ilustrada, o sistema de cossolvente é etanol e água.

[0037]Em algumas modalidades da invenção, o álcali é adequadamente hidróxido de sódio (NaOH), embora outros álcalis possam ser usados, tais como o hidróxido de lítio (LiOH) ou hidróxido de potássio (KOH). A concentração de NaOH

necessária na solução de tratamento depende da natureza da celulose a ser tratada, na medida em que diferentes celulosas podem ter suas formas entrelaçadas interrompidas em diferentes concentrações de álcalis. Por exemplo, o limiar para mercerização da maioria das polpas é de aproximadamente NaOH a 8% em água, para o algodão, que é de cerca de 11 a 12%, dependendo do pré-tratamento anterior, e para celulose bacteriana, é de cerca de 14%.

[0038]O estabelecimento da molaridade de NaOH da solução de tratamento é um processo iterativo. Como ponto de partida, a razão de cossolvente é fixa a um nível que foi verificado ideal no acabamento de algodão (4), que é relatado ser de etanol a 75% e água a 25%. A molaridade é, em seguida, variada e a eficácia do tratamento é avaliada até que uma molaridade ideal do NaOH no cossolvente seja identificada.

[0039]Nos exemplos abaixo, o efeito das soluções em Avicel, uma celulose microcristalina preparada a partir de madeira resinosa do norte (American Viscose Company, Marcus Hook, PA) e reduzida à polpa em 180°C, foi comparado com observações anteriores sobre outras celulosas. Verificou-se que a molaridade de soluções de NaOH entre 1 M e 2 M funcionou bem. O Avicel foi selecionado para o teste porque foi o substrato padrão usado na maioria dos estudos publicados de bioconversão da celulose. O Avicel é uma celulose altamente recalcitrante e é representativo dos efeitos das elevadas temperaturas na cristalinidade da polpa. Em outros exemplos, as polpas kraft derivadas de um papel higiênico foram usadas. O papel higiênico foi do tipo designado para uso em sistemas sépticos para que o mesmo não contivesse aditivos resistentes a umidade. O papel era composto por aproximadamente 65% de eucalipto e 35% de madeira resinosa. O uso de uma polpa organosolv (por exemplo, ver, Patente US No. 4,100,016 em nome de Diebold, et al.) também é incluído nos exemplos abaixo.

[0040]Uma vez que a molaridade ideal de NaOH é estabelecida, a razão ideal

de cossolventes é estabelecida. Embora o potencial de 75% tenha sido escolhido pelos pesquisadores anteriores, eles não exploraram o potencial de 70% ou de 80%. Ao variar a razão, é importante evitar os níveis de etanol que podem resultar na precipitação de NaOH.

[0041]A referência é feita agora a FIG. 2, que ilustra o processo de tratamento geral para modalidades de acordo com a invenção, bem como etapas adicionais no processamento de matéria-prima celulósica para um álcool, por exemplo, o etanol. O processo começa na etapa 100 com uma fonte de celulose. Em uma modalidade ilustrada, o Avicel foi usado como fonte de celulose na etapa 100.

[0042]Na etapa 102, o material celulósico é submetido a uma etapa de pré-tratamento de acordo com modalidades da invenção, ou seja, uma solução de tratamento de álcali em um sistema de cossolvente 101 de água e um segundo solvente, tal como um álcool, por exemplo, o etanol ou outro solvente miscível em água, para descristalizar a celulose. Na etapa 104, a mistura de reação é separada para produzir a celulose descristalizada 108 e remover a solução de tratamento 101. Na etapa 106, a celulose tratada é lavada com uma solução de cossolvente de lavagem ou mistura 107 para remover o álcali. A mistura ou cossolvente de lavagem é adequadamente uma mistura de água / álcool. Na etapa 112, a celulose tratada de acordo com as modalidades da invenção é hidrolisada, por exemplo, pelo tratamento com celulasas 110, para formar açúcares. Na etapa 114, os açúcares, que incluem a glicose e celooligodextrinas, são adequadamente fermentados, e um álcool celulósico 118 é recuperado a partir da mistura de fermentação por meio de destilação ou outro método de separação, por exemplo, separação por membranas.

[0043]A eficácia da solução de tratamento é adequadamente medida pelo aparecimento de rompimento do espectro de celulose de Raman, em especial, na região de baixa frequência entre 250 cm^{-1} e 600 cm^{-1} em que uma banda em 378 cm^{-1} é um índice muito sensível do grau de perturbação do entrelaçamento nativo.

[0044] Quanto à mistura de lavagem 107, se o metanol foi usado como cossolvente com a água, verificou-se que a mesma razão de metanol para a água, como no sistema de cossolvente de tratamento é adequada para lavar o NaOH da celulose. Para o sistema etanol / água, uma razão adequada também foi a mesma no tratamento de cossolvente.

[0045] Observou-se anteriormente que o trabalho com metanol foi baseado no uso da mesma razão de cossolventes, como no pré-tratamento e foi usado como o ponto de partida para o cossolvente de etanol e água. O efeito da variação do cossolvente inicial para a primeira lavagem foi determinado. Do ponto de vista do processo, isso é especialmente adequado se a razão de cossolvente na mistura de lavagem é maior em etanol do que a usada para o pré-tratamento, na medida em que esta última que reduziria os custos de pós-tratamento da solução de lavagem. No entanto, foi também observado que é necessário assegurar que o teor de etanol da lavagem inicial não seja alto o suficiente para causar a precipitação de NaOH.

[0046] Após a primeira lavagem ser concluída, é necessário continuar a lavar o substrato de celulose até que um pH neutro seja alcançado. Verificou-se que em alguns casos foi mais eficaz a transição da primeira lavagem para lavagens com cossolventes, incluindo níveis mais elevados de água, eventualmente antes da lavagem somente com água.

[0047] Também foi verificado que o grau em que a celulose é firmemente agregada e, portanto, sua recalcitrância, está relacionada com a temperatura mais alta a qual a celulose é exposta durante o isolamento (5). Vide, FIGs. 3 e 4 tomadas a partir da referência de Atalla et al. (5). A FIG. 3 mostra a redução dramática da largura na meia altura do pico de difração primário de celuloses nativas como um resultado do recozimento a 150°C. A largura a meia altura para a reflexão mais proeminente nos padrões de difração de pó de celuloses de madeira sempre foi considerada como um dos índices mais sensíveis do grau de coerência da ordem dentro da celulose nas

paredes celulares da madeira. A FIG. 4 mostra como a largura a meia altura diminui na medida em que a temperatura de tratamento aumenta. Desse modo, em essência, a recalcitrância de uma amostra de celulose está diretamente correlacionada com a temperatura de isolamento.

[0048]Uma vez tratada e lavada, o grau em que a celulose tratada se tornou mais acessível, ou seja, descristalizou, pode ser avaliado. Métodos analíticos simples, tais como a perda de peso mediante a hidrólise enzimática, podem e foram usados como medida de sucesso na descristalização da celulose. Métodos que usam a acessibilidade ao óxido de deutério (D_2O) da celulose descristalizada também podem ser usados. Embora estes métodos possam classificar os tratamentos, a facilidade com que de o deutério troca com o hidrogênio sugere que o uso de D_2O pode resultar em exagerar o grau de acessibilidade. Foi verificado que o etilenoglicol deuterado ($OHCD_2CD_2OH$) adequadamente avalia o grau de acessibilidade para a ação enzimática.

[0049]Ao utilizar métodos deuterados, as medidas mais comuns de acessibilidade têm contado com a observação do acesso aos grupos de hidroxila celulósicos com base na perfusão de amostras com D_2O (4). Embora esta seja uma medida útil, uma medida mais confiável é baseada na acessibilidade às moléculas maiores do que o íon D^+ . Tais moléculas incluem adequadamente o metanol perdeutério (CD_3OH), etilenoglicol perdeutério (CD_2OHCD_2OH) e glicerol perdeutério ($CD_2OHCD_2OHCD_2OH$), que podem ser adicionados às amostras celulósicas pré-tratadas em solução de H_2O , e permitiu alcançar o equilíbrio. A quantidade de moléculas deuteradas dentro das amostras de celulose é monitorada através da medição dos espectros de Raman das amostras na região entre 2300 e 2700 cm^{-1} onde não haverá nenhuma interferência de quaisquer outros grupos funcionais. A preparação das amostras perdeuteradas de álcoois ou polióis pode ser realizada por refluxo em D_2O sobre níquel de Raney.

[0050]O metanol perdeuterado é disponível comercialmente, e a perdeuteração de glicol e glicerol pode ser realizada como descrito acima. O metanol perdeuterado é usado em medições baseadas no uso de outras celuloses que são padrões comuns, tais como Avicel, que é derivada da dissolução de polpas e pó de Whatman CF-1, que é derivado do línter de algodão. Estes padrões são pré-inchados usando protocolos conhecidos.

[0051]Como a maioria das enzimas é maior em tamanho do que as moléculas usadas para avaliar a acessibilidade de celulose, um ensaio foi desenvolvido para as transformações das celuloses mais estreitamente relacionado com a atividade das enzimas. Em tal ensaio, as celuloses pré-tratadas e lavadas são incubadas com celulasas representativas de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesi* para avaliar o efeito das transformações sobre a suscetibilidade à ação enzimática. Como observado anteriormente, a disponibilidade aumentada de celuloses para as enzimas hidrolíticas deve aumentar a taxa de conversão em açúcares pelo menos uma ordem de magnitude ou mais.

[0052]Referência é feita novamente a FIG. 2 em que é observado que uma porção do álcool, por exemplo, o etanol, produzido, ou seja, número de referência 118, pode ser usada na etapa de descristalização 102 como o cossolvente. Sendo assim, de acordo com modalidades da invenção, todo o processo de conversão de celulose pode ter adequadamente um loop de realimentação para o fornecimento de cossolvente para o processo de pré-tratamento.

[0053]Note-se que uma barreira à implementação econômica de hidrólise enzimática da celulose é a natureza bifásica do processo quando as celuloses são submetidas a enzimas hidrolíticas em uma base contínua em um processo em batelada. Os tempos de residência muito longos requeridos para a segunda fase resultam na necessidade de tanques de armazenamento muito grandes para acomodar o tempo necessário para que a segunda fase seja concluída. Em uma outra modalidade, prevê-

se que tempos de residência muito longos das reações de hidrólise enzimática, devido à sua natureza bifásica podem ser reduzidos pelo uso do processo de tratamento de acordo com as modalidades da invenção. Para superar essa barreira, a aplicação de enzimas pode adequadamente ser realizada em múltiplos estágios, com os substratos celulósicos submetidos ao tratamento de acordo com as modalidades da invenção entre estágios.

[0054]Pelo menos três de tais processos de múltiplos estágios são contemplados. Como mostrado na FIG. 5, uma primeira aplicação de hidrólise enzimática é realizada em um primeiro estágio antes de um pré-tratamento, conforme descrito neste documento para tirar vantagem da fase relativamente rápida inicial na da hidrólise enzimática. Quando a taxa de hidrólise diminuiu no início da segunda fase, o resíduo celulósico sólido foi separado e pré-tratado como descrito aqui, e então foi re-combinado com a corrente de líquido sobrenadante separada dos sólidos no final da primeira fase. Especificamente, um material celulósico 100 é submetido a hidrólise enzimática 112 com a celulose até que a primeira fase da hidrólise enzimática comece a diminuir. Na etapa 120, a mistura de reação é separada em celulose residual 122 e o restante 128 de celulasas e glicose. A celulose residual 122 é submetida a descristalização 124, conforme ilustrado na FIG. 2, para produzir uma celulose residual descristalizada 126 que é submetida a hidrólise enzimática 130 novamente, utilizando a solução enzimática restante 128. Os produtos de açúcar são fermentados então na etapa 114 para produzir etanol celulósico 118.

[0055]Uma modalidade de um segundo processo de múltiplos estágios é mostrada na FIG.6, e baseia-se na repetição do processo de descristalização descrito aqui entre os estágios hidrolíticos. Na etapa 132, uma celulose descristalizada 108, como descrito aqui, é exposta às enzimas por um período correspondente a fase inicial da hidrólise rápida. Em seguida, na etapa 134, a celulose residual 136 é separada do meio líquido contendo enzima 142 por filtração ou centrifugação. A celulose residual

136 é então submetida a um segundo ciclo de descristalização na etapa 138, conforme ilustrado na FIG. 6, para produzir uma celulose residual descristalizada 140, que, por sua vez, é novamente exposta à solução de água tamponada contendo enzima 142 para hidrólise enzimática para glicose na etapa 144 antes da fermentação para etanol celulósico 118 na etapa 114. Prevê-se que a hidrólise novamente ocorre em uma taxa rápida de modo que a hidrólise da celulose pode ser concluída em um período muito menor do que no caso de uma hidrólise em único estágio. Sendo assim, um dos maiores fatores de custo nos processos baseados nos modelos atuais, que precisam de períodos de armazenamento ou tempos de residência muito longos na solução enzimática, é superado e significativamente reduzido.

[0056] Uma modalidade de terceiro processo de múltiplos estágios é mostrada na FIG. 7, e inclui uma mistura em contracorrente da celulose e das soluções enzimáticas. Na etapa 146, uma celulose descristalizada 108, como aqui descrito, é exposta às enzimas. Na etapa 148, a celulose residual 150 é separada do meio líquido contendo enzima 149 por filtração ou centrifugação. A celulose residual 150 é submetida a um segundo ciclo de descristalização na etapa 152 para produzir uma celulose residual descristalizada 154, que por sua vez é novamente exposta à solução de água tamponada contendo enzima na etapa 156. Como mostrado na FIG. 7, a enzima fresca pode ser usada na etapa 156 no segundo estágio do tratamento, e após o segundo estágio de tratamento, a celulose residual 160 é separada na etapa 158, e então é introduzida em um segundo ciclo de descristalização 152 para produzir uma celulose residual descristalizada 154 e, em seguida, é reintroduzida na solução enzimática 156. Além disso, após a filtração ou a dissolução completa na etapa 158 da celulose, a solução enzimática 102 é reaplicada à celulose descristalizada na etapa 146. Os produtos de açúcar são fermentados então na etapa 114 para produzir etanol celulósico 118. Essa abordagem reduz a quantidade de enzima necessária para a conversão da celulose em glicose. O custo das enzimas é outra grande barreira

econômica para processos baseados em modelos atuais.

[0057]A modalidade específica neste terceiro processo de múltiplos estágios dependerá da natureza da matéria-prima celulósica. Se a celulose for relativamente pura, prevê-se que a conversão pode ser concluída antes da solução que contém enzima seja adicionada à celulose descristalizada recentemente. No entanto, se a matéria-prima contém outros componentes da matéria lignocelulósica, um estágio de filtração ou centrifugação seria necessário antes de usar a solução de enzima a partir do segundo estágio para tratar a matéria-prima no primeiro estágio.

[0058]Uma modalidade da invenção é também contemplada como um kit, o kit incluindo um álcali em um cossolvente de álcool/água, enzimas de celulase, um ou mais flocculantes e as instruções para descristalizar a celulose para produzir uma celulose descristalizada e instruções para hidrolisar a celulose descristalizada para produzir um produto de hidrólise.

[0059]É ainda previsto que um tratamento similar pode tornar a celulose mais acessível para as soluções de catalisadores homogêneos que podem ser usados para transformar a matéria-prima de celulose em outras formas. Por exemplo, a celulose descristalizada como descrito aqui pode ser mais facilmente penetrada pelos sistemas catalíticos para reformá-la em hidrocarbonetos. Tal processo poderia fazer uso possível da vasta quantidade de recursos celulósicos como matérias-primas para a reforma catalítica para gerar biocombustíveis, tais como o diesel, gases combustíveis, tais como o hidrogênio, e outros tipos de produtos químicos de alto valor. Sendo assim, em algumas modalidades, um método de produção de biocombustíveis celulósicos é fornecido. O método inclui o tratamento de um material celulósico com um álcali em um sistema de cossolvente de álcool/água para produzir uma celulose descristalizada, lavagem da celulose descristalizada para remover o álcali; hidrólise da celulose em glicose e celo-oligodextrinas; e reforma catalítica de glicose e celo-oligodextrinas em hidrocarbonetos.

[0060]Como observado acima, uma barreira para o uso muito mais amplo da celulose como matéria-prima na fabricação de fibras ou filmes é a dificuldade de solubilização da celulose em um sistema ambientalmente aceitável. Os sistemas mais usados fora dos Estados Unidos baseiam-se no processo secular de xantato de celulose, que é questionável ambientalmente, porque a regeneração da celulose a partir da solução resulta na formação de sulfeto de hidrogênio, e outros subprodutos tóxicos. O mais recente sistema de metil morfolina-N-óxido desenvolvido depende de um solvente complexo e caro que é propenso a explosão se as condições não são cuidadosamente controladas. Por outro lado, o sistema de cossolvente usado aqui é ambientalmente benigno. Prevê-se que este sistema pode alterar drasticamente a economia de fabricação de rayon e celofane, bem como de biocombustíveis como aqui descrito.

[0061]Os exemplos a seguir, que não devem ser interpretados como limitantes do escopo de aplicação da invenção, explicam melhor as modalidades da invenção. Além disso, todos os processos experimentais podem ser ainda otimizados para a eficiência e espera-se que o processo de aumento de economia seja alcançado com um maior melhoramento da eficiência da conversão de celulose em açúcares.

Exemplos

[0062]Experimentos para demonstrar a redução da recalcitrância da celulose foram realizados em dois estágios. O primeiro incluiu o processo de tratamento de celulose nativa. O segundo avaliou a consequência deste tratamento pela exposição das amostras de celulose tratadas às enzimas hidrolíticas e medição de sua perda de peso em comparação com um controle consistindo em celulose nativa não tratada da mesma fonte.

[0063]A celulose escolhida como substrato para o primeiro Exemplo foi a partir da amostra de Avicel PH 1, que tem sido usada como um padrão no laboratório do inventor desde 1970 e foi fornecida pela American Viscose Company (Marcus Hook, PA). Trata-se de uma celulose microcristalina geralmente fabricada por hidrólise ácida

de uma polpa de madeira resinosa do norte de elevado grau de dissolução de elevada pureza seguido pela desintegração mecânica das fibras de polpa e pulverização a seco da dispersão resultante de fragmentos de fibra. Este tipo de celulose foi escolhido porque o Avicel tornou-se um substrato padrão em estudos de hidrólise enzimática de celulose e é representativo da maioria das celuloses derivadas de polpas recalcitrantes. Em um segundo conjunto de Exemplos, um derivado de polpa kraft de papel higiênico foi usado. Em outro Exemplo, uma polpa organosolv foi usada.

[0064]As enzimas usadas nas avaliações foram uma celulase do fungo *Trichoderma reesi* comprada de Worthington e uma glicosidase derivada de amêndoas disponibilizada por Sigma Aldrich.

Exemplo 1: Descristalização

[0065]Uma solução preparada para o tratamento da Avicel foi uma solução 1,5 N de hidróxido de sódio (NaOH) em uma mistura de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) e água que foi de etanol a 75% em volume. Para preparar a solução de tratamento, etanol e água foram misturados e, a seguir, 6 g de NaOH foram dissolvidos em 100 ml da mistura de solvente.

[0066]O processo de tratamento foi o seguinte: 1 g de Avicel foi colocado em um béquer de 300 ml. Para isso, 50 ml da solução de tratamento foram adicionados. O Avicel foi deixado assentar-se na solução de tratamento por 15 minutos. Posteriormente, a solução foi decantada e substituída por 100 ml da mistura de solventes (75% de etanol, 25% de água). Esta solução foi deixada assentar-se por alguns minutos para permitir a difusão do NaOH fora da celulose.

[0067]O solvente foi então decantado e o processo foi repetido duas vezes quando então o pH foi de aproximadamente 8. Após a decantação do solvente pela última vez, uma solução de tampão de acetato de amônio 0,05 M em um pH de 5 foi adicionada, o pH foi de 5,4 após a lavagem com o tampão. A solução tampão foi decantada e 30 ml de tampão foram novamente adicionados, o pH foi então determinado

ser 5,0.

[0068]A dispersão de celulose em 30 ml do tampão foi transferida para um tubo de centrifugação com 50 ml polipropileno e tampão foi adicionado até o nível de 40 ml. Enzimas hidrolíticas foram adicionadas ao tubo. Estas enzimas foram 0,2 g de celulase (108 μ / mg) e 0,1 g de β -glicosidase (6 μ / mg).

[0069]Uma amostra de controle de 1 g de Avicel não tratada também foi colocada em um tubo de centrifugação com 50 ml polipropileno, e 40 ml de tampão foram adicionados ao tubo, seguido de adição da mesma quantidade de enzimas tal como a amostra de teste.

[0070]Os dois tubos de centrífuga foram hermeticamente fechados com suas tampas, e inseridos em uma incubadora com agitação tipo Vortemp 1550. Os conteúdos dos tubos foram incubados a 45°C e agitados a uma velocidade de 900 rpm. Verificou-se a necessidade de agitar a 900 rpm para manter as partículas de celulose microcristalina adequadamente dispersas.

[0071]Para um primeiro experimento a incubação foi de 41 horas e para um segundo, a incubação foi de 13 horas.

[0072]Após a incubação, as duas dispersões foram divididas em 8 porções em tubos de centrífuga de 15 ml. Os tubos foram inseridos em uma centrífuga e centrifugados durante 2 minutos a 3800 rpm. O líquido de tampão-enzima foi decantado a partir de cada tubo e substituído por etanol a 95%, redisperso e centrifugado novamente; isso foi feito duas vezes para cada uma das amostras. O etanol último decantado foi substituído com acetona seguido de dispersão na acetona.

[0073]As dispersões de acetona foram, por sua vez, vertidas em cadinhos tarados com filtros de fundo de vidro sinterizados; os filtros de cadinho foram montados em um frasco a vácuo com vácuo total aplicado durante a filtração. Os cadinhos foram então transferidos para um forno a vácuo com vácuo total aplicado, aquecidos a 105°C, e mantidos a essa temperatura sob vácuo durante a noite.

[0074]As amostras foram então pesadas em uma balança analítica, e a perda de peso foi tomada como uma medida da conversão de celulose em glicose e oligômeros solúveis.

[0075]Deve ser observado que a solução 1,5 M (ou 1,5 N) de NaOH na mistura de solventes foi escolhida porque a celulose microcristalina de Avicel foi derivada de uma polpa de dissolução. A celulose microcristalina feita de línteres de algodão tendo sido usada, seria necessário usar uma solução 2 M (ou 2 N) de NaOH no solvente. Inversamente, se a celulose tivesse sido isolada a partir de uma planta herbácea, em uma temperatura muito mais próxima à temperatura ambiente, uma solução 1M (ou 1N) a poderia ter sido adequada. Esta variabilidade na normalidade requerida para o pré-tratamento de celulose reflete a grande diversidade no nível de agregação de celulose a partir de fontes diferentes e com histórias diferentes em domínios semicristalinos.

Resultados

[0076]Como mencionado acima, os pesos iniciais das amostras de teste e de controle foram de 1 g cada. Os pesos após a exposição à mistura de enzimas a 45°C são apresentados abaixo na Tabela 1.

[0077]Tabela 1

Tempo de incubação	Controle	Pré-tratamento	Δ
13 h	0,535 g	0,408 g	0,127 g
41 h	0,251 g	0,189 g	0,062 g

onde Δ representa a diferença na perda de peso entre as amostras de controle e de pré-tratamento. Assim, em ambos os casos, a perda de peso da amostra tratada como descrito aqui foi significativamente maior do que a da amostra de controle.

[0078]Os resultados demonstraram que a perda de peso para ambas as amostras durante a primeira exposição por 13 h foi significativamente maior do que a

perda durante a outra exposição por um período adicional de 28 horas. Isso é típico da natureza bifásica da ação da enzima sobre celulose, onde a taxa de conversão de glicose ou oligômeros solúveis ocorre rapidamente de início, mas depois os níveis vão para uma taxa muito mais lenta. Os resultados destes experimentos demonstram que o tratamento de descristalização aqui descrito aumenta a desordem em substratos de celulose, e os torna mais suscetíveis a hidrólise enzimática por celulasas.

Exemplo 2: Um Processo de Dois Estágios

[0079]A solução preparada para o tratamento de Avicel foi uma solução 1,5 N de hidróxido de sódio (NaOH) em uma mistura de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) e água que era de etanol a 75% em volume. Para preparar a solução de tratamento, mistura-se etanol e água, e depois se dissolve 6 g de NaOH por 100 ml de mistura de solventes.

[0080]O processo de tratamento foi o seguinte: 2 amostras de 1 g cada uma de Avicel foram colocadas em tubos de centrífuga de 50 ml, uma amostra experimental e uma amostra de controle. Para cada um, 45 ml de tampão acetato de amônio 0,05 N com pH de 5,01 foram adicionados. Ambos os tubos receberam 0,15 g de celulase, que foi ensaiada em 136 μ / mg DW, sem nenhuma β -glicosidase suplementar.

[0081]Ambas as amostras foram colocadas em uma incubadora de agitação do tipo Vortemp 1550. As amostras foram incubadas a 50°C e agitadas a uma velocidade de 900 rpm. A incubação inicial foi de 5,5 horas.

[0082]Após o período inicial de incubação, a amostra experimental foi removida da incubadora e resfriada em um banho de gelo para interromper a ação enzimática. A amostra experimental foi então colocada em uma centrífuga e centrifugada a 4500 rpm para extrair o sobrenadante. O sobrenadante foi decantado e reservado para mais tarde retornar ao tubo de amostra.

[0083]Foram adicionados 50 ml da solução de tratamento de NaOH ao tubo de amostra, e o tubo foi agitado por 5 minutos, após o que foi colocado de volta na

centrífuga para extrair a solução de tratamento.

[0084]Posteriormente, a solução foi decantada e substituída com 50 ml da mistura de solventes (75% de etanol, 25% de água). A solução foi agitada por 5 minutos para permitir a difusão do NaOH da celulose. A solução foi então centrifugada a 4500 rpm.

[0085]O solvente foi então decantado e o processo foi repetido duas vezes. Após a última decantação do solvente, uma solução tampão de acetato de amônio 0,05 M em pH de 5,01 foi adicionada, o pH foi de 8,4 após a dispersão da amostra no tampão. A solução tampão foi centrifugada e decantada e 40 ml de tampão foram novamente adicionados, o pH determinado foi de 5,15. Esse ciclo foi repetido mais uma vez, após o qual o pH da amostra em tampão foi de 5,04. O tampão foi então retirado.

[0086]A solução enzimática de sobrenadante extraída previamente foi devolvida ao tubo de amostra e a incubação foi retomada a 50°C e 900 rpm. A segunda fase de incubação durou 2,5 horas.

[0087]Após a incubação, os tubos com amostra de controle e experimental foram inseridos em uma centrífuga e centrifugados durante 2 minutos a 4500 rpm. O líquido enzima-tampão foi decantado de cada tubo, e os sólidos remanescentes foram vertidos em papel de fibra de vidro tarado para secar em um forno de microondas com uma balança analítica embutida, com a perda de peso tomada como uma medida da conversão da celulose em glicose e oligômeros solúveis.

Resultados:

[0088]Como observado acima, os pesos iniciais da amostra de teste e de controle foram de 1 g cada. O peso após a exposição à mistura enzimática a 50°C é apresentado a seguir na Tabela 2.

[0089]Tabela 2

Tempo de incubação	Controle	Pré-tratamento	Δ
--------------------	----------	----------------	---

8 h	0,529	0,269 g	0,26 g
-----	-------	---------	--------

onde Δ representa a diferença na perda de peso entre as amostras de controle e de pré-tratamento. Assim, a perda de peso da amostra tratada como descrito aqui foi significativamente maior do que a amostra de controle.

Exemplo 3: Um Tratamento de Dois Estágios Usando um Papel de Polpa de Kraft

[0090]A solução preparada para o tratamento de papel higiênico (marca Cottonelle™) foi uma solução 1,5 N de hidróxido de sódio (NaOH) em uma mistura de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) e água com etanol a 75% em volume. A preparação da solução de tratamento foi a mesma descrita nos exemplos anteriores.

[0091]O procedimento de tratamento foi o seguinte: 2 amostras (uma de controle e uma experimental) de papel higiênico foram pesadas e, em seguida, cortadas em pequenos pedaços e colocadas em tubos de centrífuga de 50 ml. Os tubos foram preenchidos com água e colocados em uma incubadora de agitação do tipo Vortemp 1550 à temperatura ambiente a 900 rpm e deixadas dispersar durante a noite.

[0092]Cada tubo foi preenchido até a marca de 50 ml com tampão de acetato de amônia 0,05 N com pH de 5,01. Ambos os tubos receberam 0,125 g de celulase, que foi avaliada em 136 μ / mg DW, sem nenhuma β -glicosidase suplementar. Ambas as amostras foram colocadas na incubadora Vortemp. As amostras foram incubadas a 50°C e agitada a uma velocidade de 900 rpm. A incubação inicial foi de 4,25 horas.

[0093]Após o período de incubação inicial, ambas as amostras foram retiradas da incubadora e resfriadas em um banho de gelo para interromper a ação enzimática. A amostra experimental foi então colocada em uma centrífuga e centrifugada a 4500 rpm para extrair o sobrenadante. O sobrenadante foi decantado e reservado para mais tarde retornar ao tubo de amostra.

[0094]O tubo de amostra, em seguida, teve 50 ml de solução de tratamento de NaOH adicionados, e foi agitado por dois minutos, após o que o mesmo foi

colocado de volta na centrífuga para extrair a solução de tratamento.

[0095]Posteriormente, a solução foi decantada e substituída com 50 ml da mistura de solventes (75% de etanol, 25% de água). A solução foi agitada por 2 minutos para permitir a difusão do NaOH da celulose.

[0096]O solvente foi então decantado e o processo foi repetido duas vezes. Após a decantação do solvente pela última vez, uma solução tampão de acetato de amônio 0,05 M em um pH de 5,01 foi adicionada, o pH foi 6,4 após a dispersão da amostra no tampão. A solução tampão foi centrifugada e decantada e 40 ml de tampão foram novamente adicionados, o pH determinado foi 5,23. A solução enzimática sobrenadante extraída previamente foi devolvida ao tubo de amostra e a incubação foi retomada a 50°C e 900 rpm. A segunda fase de incubação durou aproximadamente 9,5 horas.

[0097]Após a incubação, ambos os tubos de amostras controle e experimental foram inseridos em uma centrífuga e centrifugados por 2 minutos a 4500 rpm. O líquido enzima-tampão foi decantado de cada tubo e os sólidos remanescentes foram vertidos em papel de fibra de vidro tarado para secar em um forno de microondas com uma balança analítica embutida, com a perda de peso tomada como uma medida da conversão da celulose em glicose e oligômeros solúveis.

Resultados:

[0098]Os pesos iniciais das amostras de teste e de controle, juntamente com os pesos após a exposição à mistura enzimática a 50°C são apresentados abaixo na Tabela 3.

[0099]Tabela 3

	Peso inicial	Peso final%	de conversão
Controle	1,021 g	0,314 g	69,25%
Pré-tratamento	1,026 g	0,226 g	77,97%

[00100]A diferença no percentual de peso da amostra restante demonstra que

a conversão da amostra tratada como descrito aqui foi maior do que a amostra de controle.

Exemplo 4: Um tratamento estágio Único Usando um Papel de Polpa Kraft

[00101]Uma solução preparada para o tratamento de papel higiênico (marca Cottonelle™) foi uma solução 1,5 N de hidróxido de sódio (NaOH) em uma mistura de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) e água com etanol a 75% em volume. A preparação da solução de tratamento foi a mesma descrita nos exemplos anteriores.

[00102]O procedimento de tratamento foi o seguinte: 2 amostras (uma de controle e uma experimental) de papel higiênico foram pesadas e, em seguida, cortadas em pequenos pedaços e colocadas em tubos de centrífuga de 50 ml. Os tubos foram preenchidos com água e colocados em uma incubadora de agitação do tipo Vortemp 1550 à temperatura ambiente a 900 rpm e deixadas dispersar durante a noite.

[00103]A amostra experimental foi colocada em uma centrífuga por 2 minutos a 4500 rpm e a água extraída foi decantada. O tubo foi preenchido novamente com etanol de prova 200, e agitado por 5 minutos a 900 rpm, depois o que o tubo foi centrifugado novamente, o etanol foi decantado, e em seguida o tubo foi preenchido com uma mistura de 75% de etanol e 25% de água, a mistura foi agitada por 5 minutos, centrifugada e decantada novamente.

[00104]O tubo de amostra, em seguida, tinha 50 ml da solução de tratamento com NaOH adicionados, e foi agitada por 5 minutos, após o que foi colocada de volta na centrífuga para extrair a solução de tratamento. Posteriormente, a solução foi decantada e substituída com 50 ml da mistura de solvente (75% de etanol, 25% de água). A solução foi agitada por 5 minutos para permitir a difusão do NaOH da celulose.

[00105]O solvente foi então decantado e o processo foi repetido duas vezes. Após a decantação do solvente pela última vez, uma solução tampão de acetato de amônio 0,05 M em um pH de 5,01 foi adicionada, o pH foi 12,63 após a dispersão da amostra no tampão. A solução tampão foi centrifugada e decantada e 40 ml de tampão

foram novamente adicionados, o pH determinado foi 9,37. Esse ciclo foi repetido 4 vezes mais, com o pH determinado em 6,02, 5,29, 5,14, e, em seguida, 5,05 no último ciclo.

[00106]Cada tubo foi preenchido até a marca de 50 ml com a mesma solução tampão de acetato de amônia. Ambos os tubos receberam 0,125 g de celulase, que foi ensaiada em 136 μ / mg DW, sem nenhuma β -glicosidase suplementar. Ambas as amostras foram colocadas na incubadora de agitação do tipo Vortemp 1550. As amostras foram incubadas a 50°C e agitadas a uma velocidade de 900 rpm por uma incubação total de 16 horas e 25 minutos.

[00107]Após a incubação, os tubos de amostras de controle e experimental foram inseridos em uma centrífuga e centrifugados durante 2 minutos a 4500 rpm. O líquido de enzima-tampão foi decantado de cada tubo, e os sólidos remanescentes foram vertidos em papel de fibra de vidro tarado para secar em um forno de microondas com uma balança analítica embutida, com a perda de peso tomada como uma medida da conversão da celulose em glicose e oligômeros solúveis.

Resultados:

[00108]Os pesos iniciais das amostras de teste e de controle, juntamente com os pesos após a exposição à mistura enzimática para 16 horas e 25 minutos a 50°C são apresentados abaixo na Tabela 4.

[00109]Tabela 4

	Peso inicial	Peso final	% de conversão
Controle	1,020 g	0,367 g	64,02%
Pré-tratamento	1,017 g	0,225 g	77,88%

[00110]A diferença no percentual de peso da amostra restante demonstra que a conversão da amostra tratada como descrito aqui foi maior que a da amostra de controle.

Exemplo 5: Um Tratamento de Dois Estágios Usando uma Polpa Organosolv

[00111]Uma polpa organosolv (por exemplo, Patente US No. 4,100,016) foi tratada inicialmente com clorito de sódio para deslignificar a mesma, após o que a mesma foi deixada ao ar seco. O tratamento clorito de sódio é uma técnica de clareamento suave, bem estabelecida. Duas amostras (uma de controle e uma experimental) foram pesadas a partir da polpa seca, deslignificada resultante.

[00112]Uma solução preparada para o tratamento da polpa organosolv deslignificada foi uma solução 1,5 N de hidróxido de sódio (NaOH) em uma mistura de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) e água com etanol a 75% em volume. A preparação da solução de tratamento foi a mesma descrita nos exemplos anteriores.

[00113]O procedimento de tratamento foi o seguinte: 2 amostras (uma de controle e uma experimental) de polpa foram pesadas e, em seguida, colocadas em tubos de centrifuga de 50 ml. Os tubos foram preenchidos com água e colocados em uma incubadora de agitação do tipo Vortemp 1550 à temperatura ambiente a 900 rpm e as amostras foram deixadas dispersar por dois dias. Após a dispersão, ambos os tubos foram colocados em uma centrífuga e centrifugados a 4500 rpm por cerca de 3 minutos, após o que a água foi decantado.

[00114]Cada tubo foi preenchido até a marca de 50 ml com tampão de acetato de amônia 0,05 N com pH de 5,01. Ambos os tubos receberam 0,2 g de celulase, que foi ensaiada em 136 μ / mg DW, sem nenhuma β -glicosidase suplementar. Ambas as amostras foram colocadas na incubadora Vortemp. As amostras foram incubadas a 50°C e agitadas a uma velocidade de 900 rpm. A incubação inicial foi de 5,5 horas.

[00115]Após o período de incubação inicial, ambas as amostras foram retiradas da incubadora. A amostra experimental foi então colocada em uma centrífuga e centrifugada a 4700 rpm para extrair o sobrenadante. O sobrenadante foi decantado e reservado para mais tarde retornar ao tubo de amostra.

[00116]O tubo de amostra, em seguida, teve 50 ml de solução de tratamento de NaOH adicionados, e foi agitado por 2 minutos, após o que o mesmo foi colocado

de volta na centrífuga para extrair a solução de tratamento.

[00117]Posteriormente, a solução foi decantada e substituída com 50 ml da mistura de solventes (75% de etanol, 25% de água). A solução foi agitada por 2 minutos para permitir a difusão do NaOH da celulose.

[00118]O solvente foi então decantado e o processo foi repetido duas vezes. Após a decantação do solvente pela última vez, uma solução tampão de acetato de amônio 0,05 M em um pH de 5,01 foi adicionada, o pH foi 7,32 após a dispersão da amostra no tampão. A solução tampão foi centrifugada e decantada e 40 ml de tampão foram novamente adicionados, o pH determinado foi 5,18. A solução enzimática sobrenadante extraída previamente foi devolvida para o tubo de amostra e a incubação foi retomada a 50°C e 900 rpm. A segunda fase de incubação durou aproximadamente 3,5 horas.

[00119]Após a incubação, ambos os tubos de amostras de controle e experimental foram inseridos em uma centrífuga e centrifugados durante 2 minutos a 4500 rpm. O líquido de enzima-tampão foi decantado de cada tubo, e os sólidos remanescentes foram vertidos em papel de fibra de vidro tarado para secar em um forno de microondas com uma balança analítica embutida, com a perda de peso tomada como uma medida da conversão da celulose em glicose e oligômeros solúveis.

Resultados:

[00120]Os pesos iniciais das amostras de teste e de controle, juntamente com os pesos após a exposição à mistura enzimática a 50°C são apresentados abaixo na Tabela 5.

[00121]Tabela 5

	Peso inicial	Peso final	% de conversão
Controle	1,003 g	0,539 g	46,26 %
Pré-tratamento	1,005 g	0,409 g	59,3 %

[00122]A diferença no percentual de peso da amostra restante demonstra que

a conversão da amostra tratada como descrito aqui foi maior do que a amostra de controle.

[00123]A descrição acima é considerada como ilustrativa dos apenas dos princípios da invenção. Além disso, uma vez que inúmeras modificações e mudanças podem prontamente ocorrer para aqueles versados na arte, não é desejado limitar a invenção para a construção e operação exata mostrada e descrita e, por conseguinte, todas as modificações adequadas e equivalentes são consideradas como abrangidas pelo escopo da invenção. Várias características e vantagens da invenção são definidas nas reivindicações seguintes.

[00124]Todas as publicações, patentes e pedidos de patentes referenciados nesta especificação são indicativas do nível de habilidade comum na arte a qual pertence esta invenção. Todas as publicações, patentes e pedidos de patente são aqui expressamente incorporadas por referência na mesma medida, como se cada uma das publicações individuais ou pedido de patente fosse especificamente e individualmente indicada pela referência. Em caso de conflito entre a presente divulgação e as patentes, publicações e referências incorporadas, a presente divulgação deve comandar.

Referências

1. "Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol: A Joint Research Agenda" A Research Roadmap Resulting from the Biomass to Biofuels Workshop, December 7- 9, 2005, Rockville, Maryland: June 2006; DOE/SC-0095.
2. Curtis S. Walseth, "Enzymatic Hydrolysis of Cellulose," Dissertation, Institute of Paper Chemistry, Appleton, WI 1948.
3. Bruce E. Dimick, "The Importance of the Structure of Alkali Metal Hydroxide Solutions in Descristalização Cellulose I," Dissertation, Institute of Paper Chemistry, Appleton, WI 1976.
4. R. Jeffries and J. O. Warwicker, Textile Res, J., 39, 548 (1969).

5. R. H. Atalla and R. Whitmore, "The influence of elevated temperatures of structure in the isolation of native cellulose," J. Polymer Sci. Polymer Lett. 16:601 (1978).
6. R. H. Atalla and S. C. Nagel, "Cellulose: Its regeneration in the native lattice" Science, 185:522 (1974).
7. R. H. Atalla and D. L. VanderHart, "Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms" Science, 223:283 (1984).
8. R. H. Atalla and U. P. Agarwal, "Raman microprobe evidence for lignin orientation in cell walls of native woody tissue" Science, 227:636 (1985).

REIVINDICAÇÕES

1. Método para desagregação ou descristalização de celulose, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

tratar um material celulósico com um álcali em um sistema de cossolvente para formar uma celulose descristalizada ou desagregada, o sistema de cossolvente compreendendo água e um segundo solvente miscível em água; e

lavar a celulose descristalizada ou desagregada com o cossolvente para remover o álcali e estabilizar a celulose descristalizada ou desagregada em meio aquoso.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que:

(i) o solvente miscível em água é um álcool primário, secundário ou terciário ou um poliol; ou

(ii) o solvente miscível em água é um solvente polar orgânico.

3. Celulose descristalizada ou desagregada **CARACTERIZADA** pelo fato de que é produzida pelo método conforme definido na reivindicação 1.

4. Kit para realizar o método, conforme definido na reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o kit compreende um álcali em um cossolvente de álcool/água, enzimas celulase, um ou mais floclulantes, e instruções para descristalizar ou desagregar a celulose para produzir uma celulose descristalizada ou desagregada e para hidrolisar a celulose descristalizada ou desagregada para produzir um produto de hidrólise.

5. Método para produção de biocombustíveis, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) hidrolisar um material celulósico para formar glicose e uma celulose residual para o início de uma segunda etapa de hidrólise cinética;

b) tratar a celulose residual por um período correspondente à primeira fase de

uma hidrólise enzimática bifásica com um álcali em um sistema de cossolvente de álcool/água para produzir uma celulose descristalizada ou desagregada;

c) lavar a celulose descristalizada ou desagregada com o cossolvente para remover o álcali; e

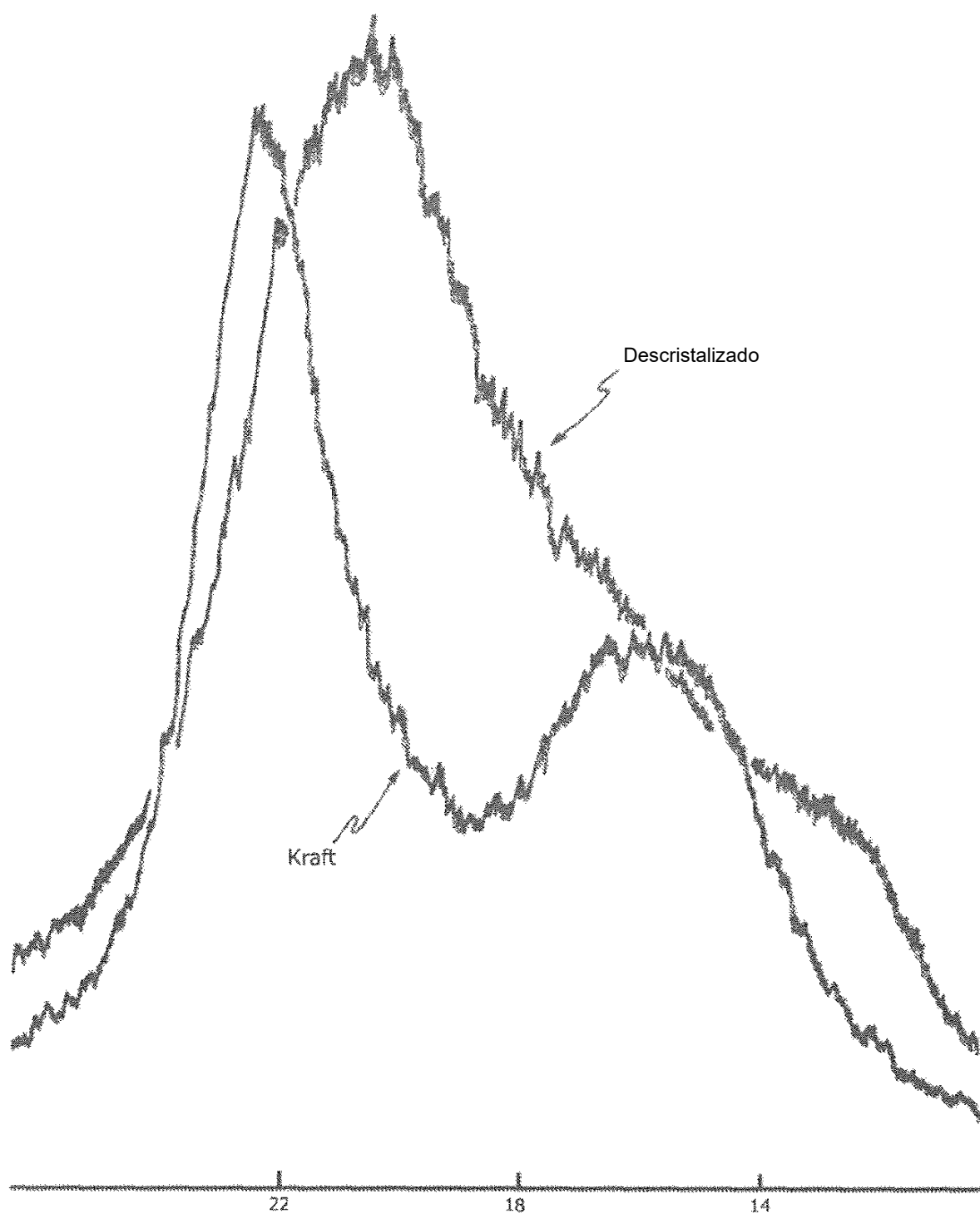
d) hidrolisar a celulose descristalizada ou desagregada para glicose e celo-oligodextrinas.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a hidrólise da etapa (d) é efetuada com as enzimas da etapa (a).

7. Método, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que:

(i) compreende ainda fermentar a glicose e as celo-oligodextrinas em alcoóis;
ou

(ii) compreende ainda reformar cataliticamente a glicose e as celo-oligodextrinas em hidrocarbonetos.



20

Difratogramas de raios-x de polpa kraft branqueadas antes e depois de tratamento de decristalização.

FIG. 1

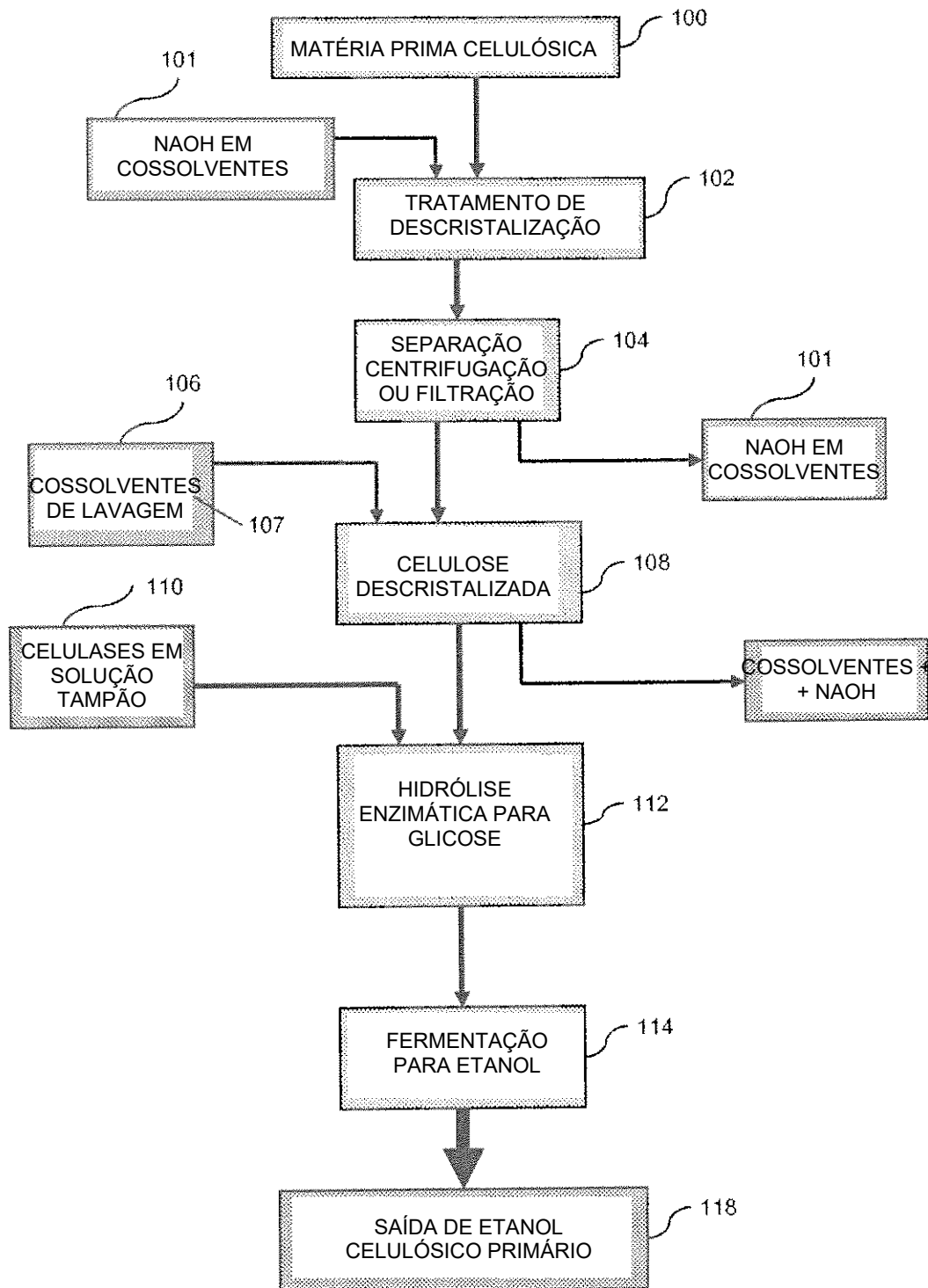
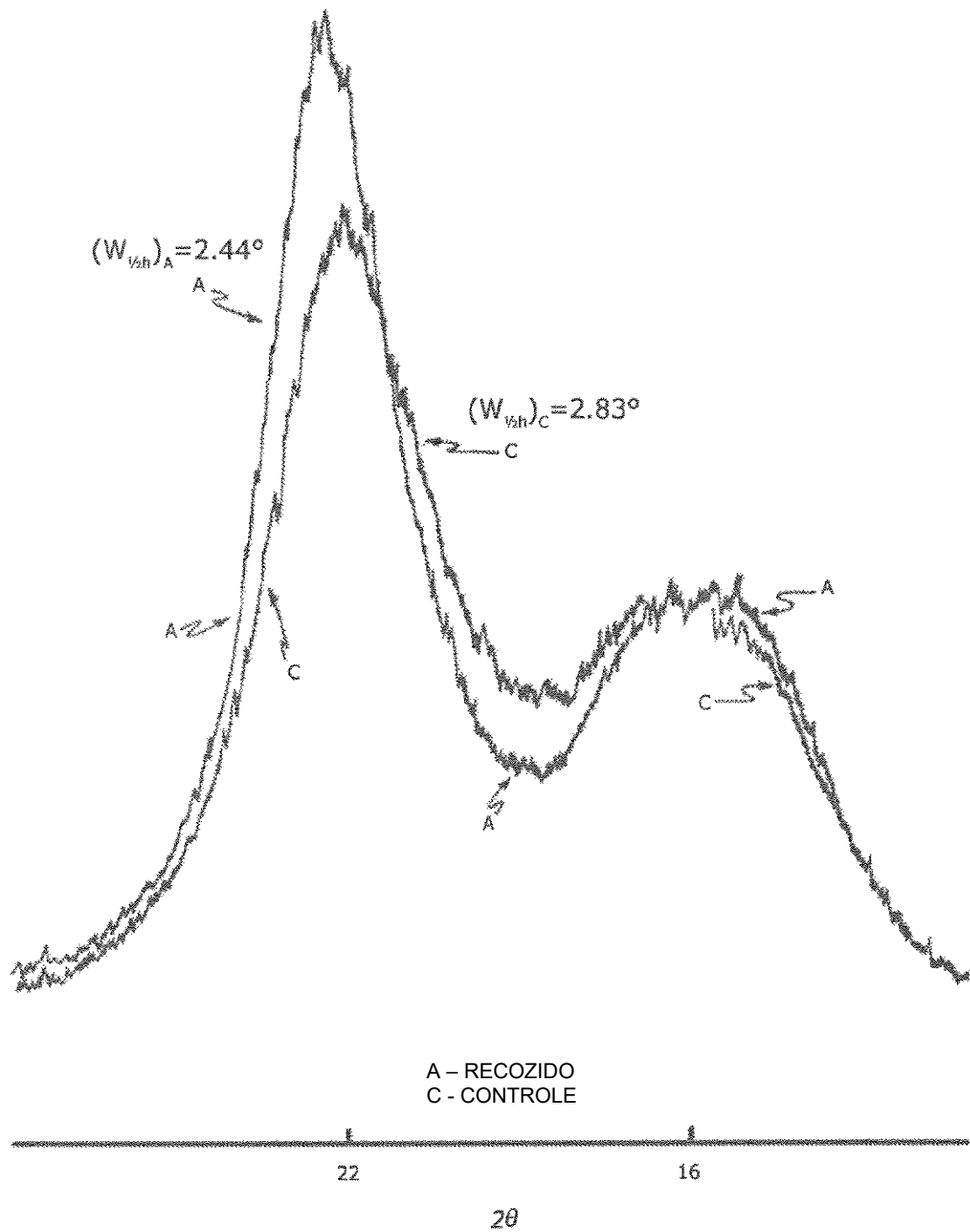
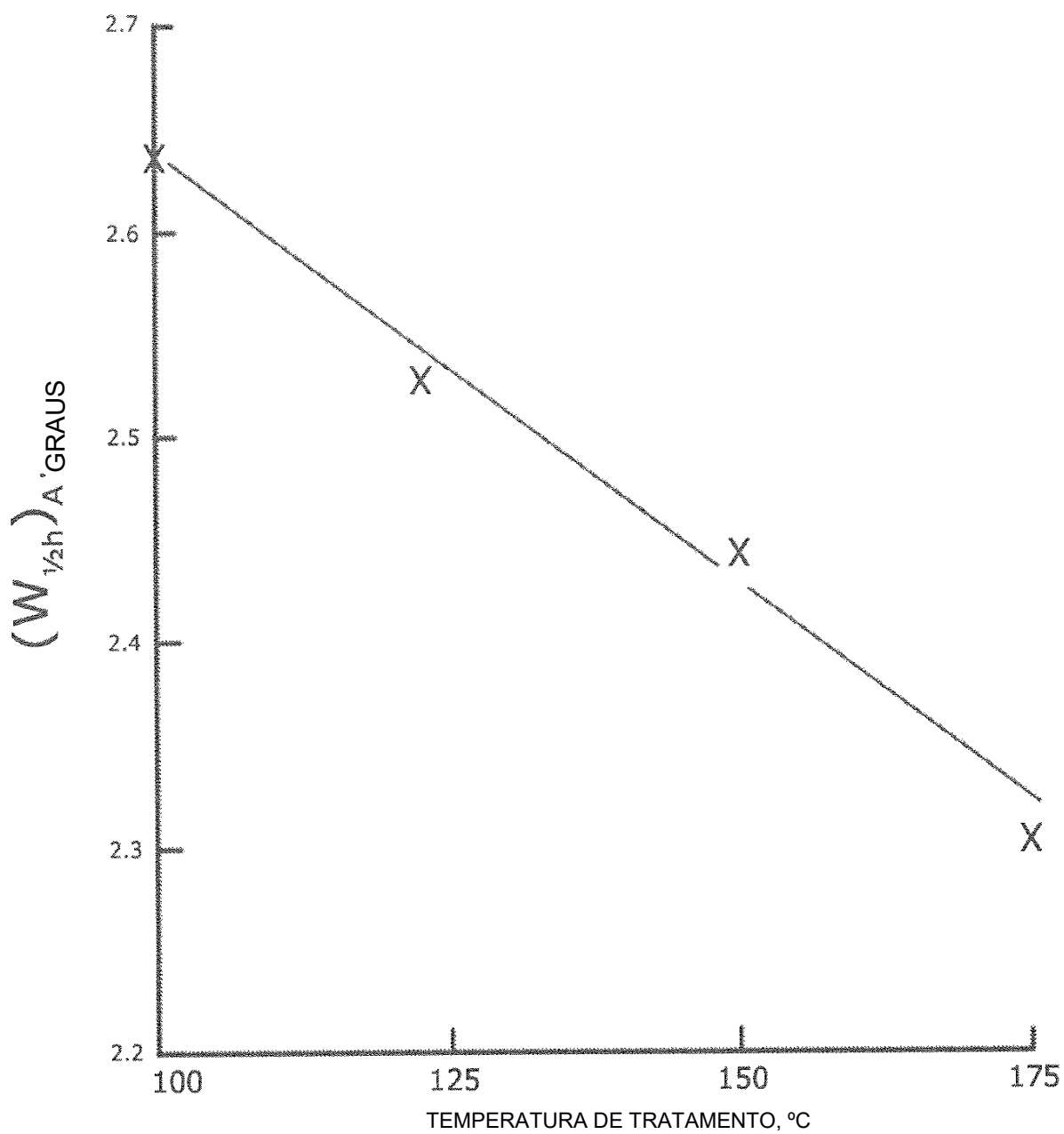


FIG. 2



Difrátogramas de raios-x de celulose isolada a partir do pinheiro do sul (C) controle reduzido a polpa a 60°C, (A) recozido aquecido até 150°C em água.

FIG. 3



Largura a meia altura de amostras recozidas a diferentes temperaturas

FIG. 4

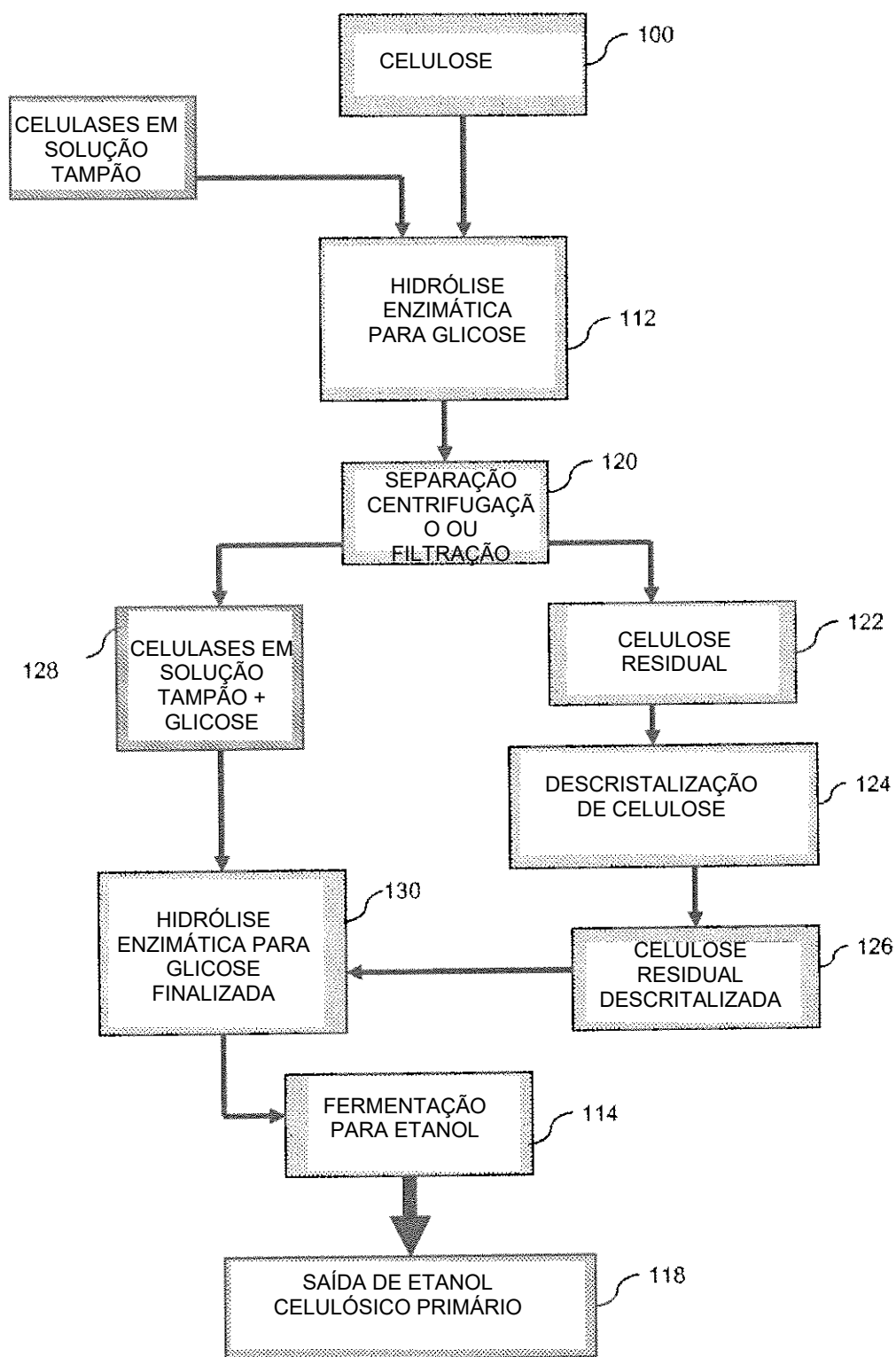


FIG. 5

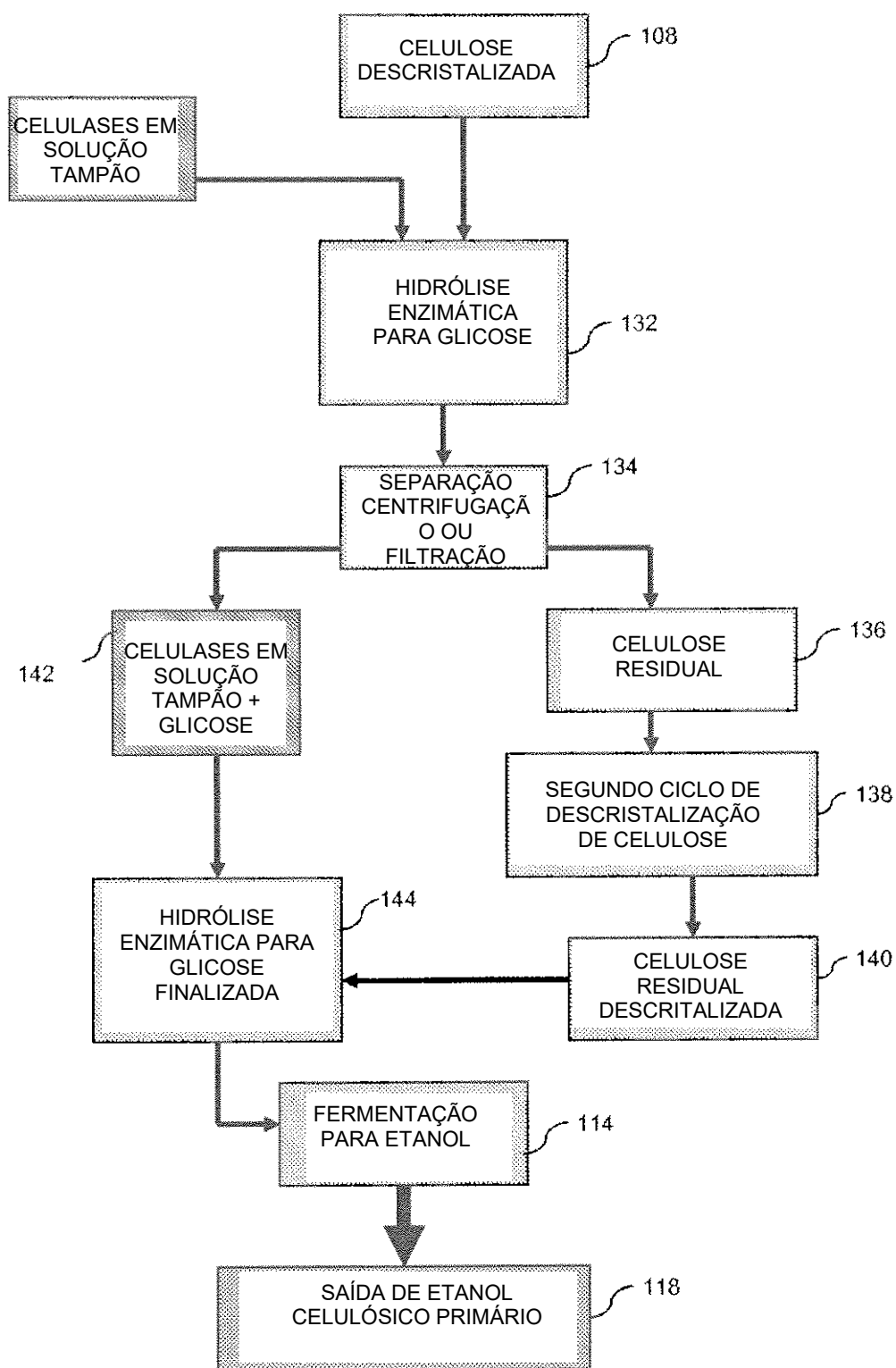


FIG. 6

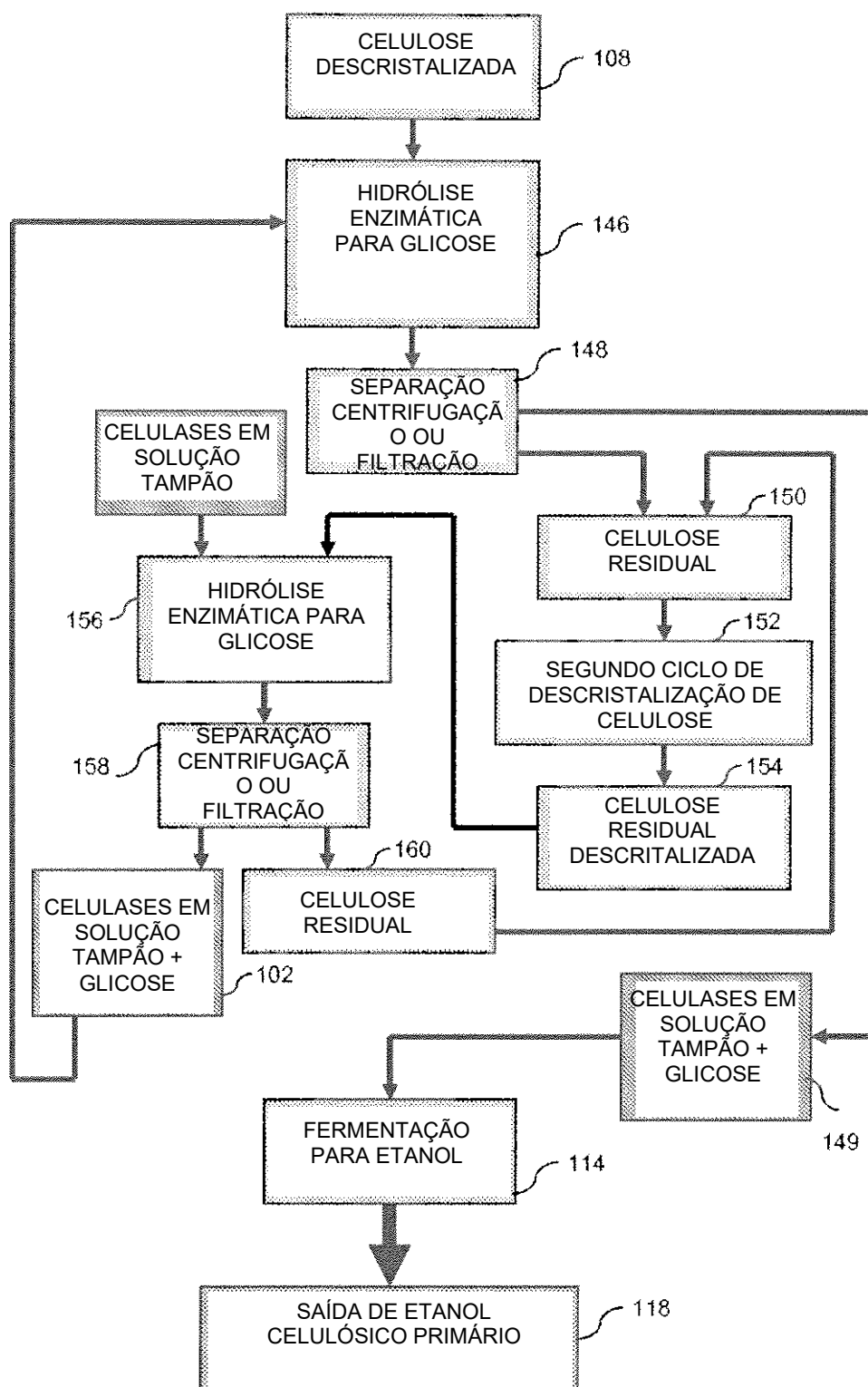


FIG. 7