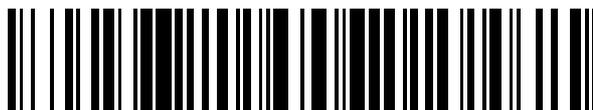


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 859**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2013 PCT/EP2013/055787**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13139839**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2013 E 13710431 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2828392**

54 Título: **Procedimiento para la producción de azúcares C5-C6 fermentables a partir de especies de plantas oleaginosas**

30 Prioridad:
20.03.2012 IT NO20120002

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.12.2016

73 Titular/es:
**NOVAMONT S.P.A. (100.0%)
Via G. Fauser 8
28100 Novara, IT**

72 Inventor/es:
**BASTIOLI, CATIA;
BORSOTTI, GIAMPIETRO y
CAPUZZI, LUIGI**

74 Agente/Representante:
MARTÍN BADAJOZ, Irene

Observaciones :

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

ES 2 592 859 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

Procedimiento para la producción de azúcares C5-C6 fermentables a partir de especies de plantas oleaginosas

5 Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere a un procedimiento para la producción de azúcares C5-C6 fermentables a partir de plantas herbáceas oleaginosas que pertenecen a la tribu Cardueae como se define en las reivindicaciones.

10 Este procedimiento puede usarse para extraer, separar y recuperar sacáridos fermentables a partir de dichas especies de plantas. A través de este procedimiento, los azúcares C5-C6 que tienen un bajo contenido en lignina, que son particularmente adecuados para los procedimientos de fermentación, se obtienen a partir de la biomasa de lignocelulosa residual del material de la planta oleaginosa después de que se hayan extraído las semillas.

15 La biomasa de lignocelulosa, que es rica en polímeros de hidratos de carbono que comprenden azúcares C5-C6 (hemicelulosa y celulosa), es una fuente renovable importante de sacáridos fermentables. Sin embargo, debido a su estructura compleja, con el fin de facilitar la hidrólisis enzimática de los hidratos de carbono a azúcares simples (monosacáridos), es necesario romper los enlaces químicos entre sus componentes estructurales (celulosa, hemicelulosa y lignina). Se usan comúnmente, por tanto, pretratamientos que tratan de destruir la estructura externa formada por lignina y hemicelulosa, además de reducir la cristalinidad y el grado de polimerización de la propia celulosa y permitir a las enzimas hidrolíticas acceder a la celulosa.

20 Estos pretratamientos pueden ser de naturaleza física, química y/o biológica. El tipo de pretratamiento usado, junto con la naturaleza del sustrato, tiene un efecto en la eficacia de la hidrólisis enzimática posterior. Generalmente, los pretratamientos son tratamientos costosos, complejos y agresivos que pueden provocar degradación de la lignina y hemicelulosa y la consecuente formación de subproductos tóxicos, que pueden inhibir fases de fermentación posteriores.

30 Con el fin de mejorar la utilización de la biomasa de lignocelulosa, es por tanto necesario desarrollar un pretratamiento que, dependiendo del tipo de biomasa usada, conservará la hemicelulosa rica en azúcares fermentables, hará posible usar los subproductos y limitará la formación en inhibidores, a un coste menor y con menor consumo de energía.

35 El pretratamiento con álcali es un pretratamiento químico que es capaz de eliminar lignina, con degradación reducida de los azúcares. Se describe un ejemplo de pretratamiento con álcali en la solicitud de patente WO 2011/014894 (Annikki GmbH), en el que un material de lignocelulosa, tal como paja de trigo, se somete a un tratamiento de 24 horas con una disolución acuosa que contiene peróxido de hidrógeno y una base. Este procedimiento requiere la presencia de un disolvente orgánico para limitar la disolución de la hemicelulosa, y tiene la desventaja de que requiere tiempos largos y concentraciones altas de bases, que se eliminan en forma de sales.

40 El pretratamiento con álcali se ha combinado también con sistemas físicos de tipo mecánico o térmico, por ejemplo, tratamientos de extrusión, pero con dificultades importantes asociadas con la baja plasticidad y propiedades de flujo pobres de la biomasa. Sin embargo, para una buena eficacia, estos tratamientos requieren altas temperaturas y concentraciones altas de bases y el uso de agentes gelificantes para modificar el comportamiento reológico de la biomasa. Mediante el procedimiento según la invención, usando la biomasa de lignocelulosa aérea derivada del cultivo de plantas herbáceas oleaginosas, es posible obtener azúcares C5-C6 con un rendimiento alto de azúcares a través de pretratamiento con álcali tal como extracción con disoluciones acuosas a un pH básico, a baja temperatura y sin la necesidad de añadir aditivos que modifican el comportamiento reológico de la biomasa.

50 El pretratamiento de la biomasa en el procedimiento según la invención en realidad hace posible eliminar eficazmente lignina, acetato, materiales extraíbles y ceniza a temperaturas más bajas que en tipos de pretratamiento conocidos, asegurando una alta recuperación de hemicelulosa y celulosa y evitando la formación de productos de degradación que tienen un efecto inhibitorio, tales como furfural, hidroximetilfurfural (HMF) y sus derivados. Además, en comparación con el pretratamiento descrito anteriormente, requiere tiempos cortos y resulta en un consumo más bajo de bases y líquidos.

Descripción de la invención

60 Esta invención se refiere a un procedimiento para la producción de azúcares C5-C6 fermentables a partir de plantas herbáceas oleaginosas que pertenecen a la tribu Cardueae, dicho procedimiento comprende las etapas de:

a) separar mecánicamente las semillas de la biomasa de lignocelulosa aérea de las plantas herbáceas oleaginosas y triturar dicha biomasa de lignocelulosa, desmenuzarla a trozos que tiene preferiblemente un tamaño menor de 5 cm, más preferiblemente menor de 2 cm, especialmente preferiblemente de 0,5 a 10 mm;

65 b) poner en contacto la biomasa de lignocelulosa triturada con una disolución acuosa básica que contiene el 5% en

volumen o menos de un disolvente orgánico para preparar una pasta acuosa que contiene la biomasa de lignocelulosa triturada en una cantidad del 10 al 50% en peso, a una temperatura de entre 10 y 95°C, preferiblemente de entre 25 y 95°C, más preferiblemente de entre 40 y 90°C y durante un tiempo de entre 1 minuto y 24 horas, preferiblemente de entre 2 minutos y 10 horas;

5

c) separar la pasta en una fracción sólida y una fracción líquida;

d) someter la fracción sólida a hidrólisis enzimática de la hemicelulosa y la celulosa contenidas en la misma.

10 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un diagrama de flujo del procedimiento de la presente invención.

15 La figura 2 es un diagrama de flujo de una realización específica del procedimiento de la presente invención, que comprende una etapa de lavado entre las etapas a) y b).

La figura 3 es un diagrama de flujo de otra realización de la presente invención, que comprende una primera etapa de lavado entre las etapas a) y b) y una segunda etapa de lavado entre las etapas c) y d).

20 **Descripción detallada de la invención**

La figura 1 es un diagrama de flujo que muestra el procedimiento para la producción de azúcares C5-C6 fermentables a partir de plantas herbáceas oleaginosas según la presente invención.

25 Las plantas oleaginosas pertenecen a la tribu Cardueae, preferiblemente a las especies *Cynara cardunculus* o *Silybum marianum*. Incluso más preferiblemente se usa *Cynara cardunculus*.

El contenido en semillas oleaginosas es normalmente de al menos el 3% con respecto al peso seco de la biomasa de lignocelulosa aérea.

30

Con el fin de obtener cantidades más altas de azúcares C5-C6 fermentables, las plantas herbáceas oleaginosas se seleccionan preferiblemente de aquellas que tienen un contenido de no más del 20% en peso de lignina con respecto al peso seco de la biomasa de lignocelulosa aérea. En tal caso, en la etapa c) de dicho procedimiento, la pasta obtenida en la etapa b) se separa en una fracción sólida que contiene esencialmente hemicelulosa y celulosa y que tiene un contenido en lignina de no más del 10% con respecto al peso seco de la fracción sólida y en una fracción líquida que contiene lignina y materiales extraíbles que tienen un contenido en hemicelulosa de no más del 25% en peso, preferiblemente no más del 10% en peso, con respecto al contenido en hemicelulosa de la biomasa de lignocelulosa.

35

40 Los azúcares C5-C6 obtenidos en la etapa d) tienen un contenido reducido en lignina e inhibidores y, por tanto, son adecuados particularmente para procedimientos de fermentación y requieren operaciones sencillas para separar y purificar los productos tras la fermentación.

45 El término "biomasa de lignocelulosa aérea" (A.L.B.) se refiere a la fracción epigea de la planta que puede obtenerse tras la cosecha, que comprende el tallo o tronco con sus correspondientes ramas, hojas y la parte de la espiga que queda tras la eliminación de las semillas.

El término "pasta" se refiere al material que comprende la disolución acuosa básica y la biomasa de lignocelulosa aérea, que se alimenta al dispositivo en la etapa c) con el fin de separarla en una fase sólida y una fase líquida.

50

Las especies de plantas usadas como materia prima para esta invención se cultivan para la producción de semillas oleaginosas y biomasa de lignocelulosa. Las especies de plantas se caracterizan preferiblemente por un contenido bajo en lignina. La invención se refiere a cultivos de especies de plantas que pertenecen a la tribu Cardueae, preferiblemente a la especie *Cynara cardunculus* o *Silybum marianum*. Incluso más preferiblemente se usa *Cynara cardunculus*. Estas especies de plantas pueden cultivarse incluso en zonas áridas con un clima poco favorable. Entre estas, los cultivos de especies de plantas en los que la lignina representa no más del 20% en peso de la biomasa, más preferiblemente no más del 18% e incluso aún más preferiblemente no más del 15% y en los que las semillas representan preferiblemente al menos el 3% del peso seco de la biomasa aérea, más preferiblemente al menos el 5% y aún más preferiblemente se prefiere al menos el 10%.

60

Más preferiblemente, se usan como materia prima especies de plantas en los que las semillas representan al menos el 10% y en los que una fracción de la planta no menor del 40% con respecto a todos los otros componentes de la A.L.B., excluyendo las semillas, tiene un contenido en lignina de no más del 15% en peso.

65 EL contenido en lignina de la A.L.B. se determina sumando la cantidad de lignina insoluble en ácido según el método Tappi T222 y la cantidad de lignina soluble en ácido se determina a su vez mediante espectrofotometría a través de

la medición de la absorción de radiación ultravioleta a una longitud de onda de 205 nm.

El procedimiento según la invención se describirá a continuación en más detalle.

5 Ventajosamente, las semillas se separan de la biomasa de lignocelulosa aérea (etapa a) en el procedimiento) en el momento de la cosecha.

10 Según un aspecto preferido de esta invención, las semillas se someten a tratamiento para extraer el aceite, que puede usarse (directamente o tras tratamiento de hidrogenación selectivo para maximizar el contenido de ácidos grasos monoinsaturados) para la producción de biocombustibles y para la producción de productos intermedios químicos, tales como ácidos carboxílicos y sus derivados. El residuo sólido del prensado (torta) puede usarse para la producción de piensos para animales. La parte de celulosa de la torta también puede tratarse para obtener azúcares.

15 En el caso en el que la semilla se someta a tratamiento para la extracción de aceite, este se realiza ventajosamente de manera mecánica o usando disolventes químicos (por ejemplo, hexano, benceno, tolueno), posiblemente en presencia de enzimas, y puede ser seguido por refinamiento posterior mediante tratamientos físicos, químicos o enzimáticos.

20 Si se usan cultivos oleaginosos que tienen un contenido en ácido oleico alto como materia prima, el aceite obtenido puede someterse a tratamientos químicos y/o de fermentación para recuperar derivados que comprenden ácidos carboxílicos monofuncionales o difuncionales a partir del mismo. Preferiblemente, el aceite se somete a procedimientos de escisión oxidativa continuos o discontinuos como se describe en las solicitudes de patente WO 2008/138892 y WO 2011/080296. Una alternativa comprende someter el aceite o su derivado (ácido o éster metílico) a procedimientos de omega oxidación mediante una vía de fermentación, seguida posiblemente por reacciones de hidrogenación.

25 En ambos casos los derivados bifuncionales obtenidos pueden usarse como monómeros para la síntesis de polímeros.

30 Después de que las semillas se hayan separado de la planta, la biomasa de lignocelulosa aérea residual se somete a tratamientos preparatorios con el fin de aumentar el área de superficie disponible de la biomasa, para desmenuzarla a trozos pequeños y para eliminar componentes no deseados.

35 Ventajosamente, la biomasa aérea tiene un contenido en agua menor del 20% en peso, preferiblemente menor del 15% en peso, y es friable, con el fin de facilitar el desmenuzamiento de la biomasa aérea en trozos finos.

40 Preferiblemente en el momento de la cosecha, tras la separación de las semillas, la biomasa se descompone y se desmenuza a trozos, que tienen preferiblemente un tamaño de menor de 5 cm, más preferiblemente menor de 2 cm, especialmente preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 10 mm. La descomposición (triturado) de la biomasa se lleva a cabo a través de tratamientos mecánicos tales como molienda, corte, agrietamiento, picado o sus combinaciones, y pueden realizarse o bien en seco o bien en presencia de agua.

45 Tras el triturado de la biomasa en la etapa a), también es posible llevar a cabo un tratamiento de lavado opcional con agua para eliminar de la biomasa sales, ácido acético y otros componentes solubles en agua posibles. Este tratamiento permite reducir la cantidad de base necesaria en la etapa b) del procedimiento.

50 La etapa de lavado se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura comprendida entre 25 y 100°C. Dependiendo del porcentaje en peso de la biomasa sólida con respecto al agua puede efectuarse la separación del sólido de la fase acuosa:

- con una prensa mecánica para un contenido en sólido entre el 15-50% en peso;

55 - por filtración en reactor para un contenido en sólido menor del 15% en peso.

La disolución de lavado acuosa eliminada puede reutilizarse varias veces y el agua puede recuperarse al final del lavado para los tratamientos posteriores.

60 La figura 2 muestra el diagrama de flujo 2 del procedimiento según la invención que comprende el lavado opcional con agua tras la etapa a).

65 Tras la etapa a), en las etapas b) y c) del procedimiento, la biomasa se somete entonces a tratamiento químico/físico suave con el fin de eliminar lignina, materiales extraíbles, ceniza y una cantidad limitada de hemicelulosa y evitar la formación de productos de degradación tales como, por ejemplo, furfural, HMF y sus derivados (tal como ácido fórmico y ácido levulínico) y acetatos, que inhiben la posterior formación de azúcar en la etapa d).

- 5 En la etapa b), la biomasa se pondrá entonces en contacto con una disolución acuosa básica a una temperatura de entre 10 y 95°C, preferiblemente 25-95°C, más preferiblemente 40-90°C, y sometida posteriormente a separación, preferiblemente por compresión, en la etapa c) del procedimiento. La presencia de un disolvente orgánico no se requiere en el procedimiento de la invención. Por razones medioambientales, la disolución acuosa básica contiene el 5% en volumen (es decir, volumen del disolvente orgánico por volumen total de la disolución acuosa básica) o menos de un disolvente orgánico. Incluso más preferiblemente, la disolución está libre de disolventes orgánicos.
- 10 En la etapa c) del procedimiento la pasta se separa en una fase sólida que contiene principalmente hemicelulosa y celulosa y una fase líquida que contiene lignina y materiales extraíbles. Dicha separación se realiza mediante un dispositivo tal como una prensa. En caso de que se use una prensa en la etapa c), la etapa de separación de la pasta en una fase sólida y una fase líquida también se refiere como "compresión" o, alternativamente, como "prensado".
- 15 El pH básico de la disolución acuosa puede obtenerse añadiendo bases tales como NaOH, LiOH, KOH, Mg(OH)₂, Ca(OH)₂, carbonatos alcalinos (por ejemplo, Na₂CO₃, Li₂CO₃, K₂CO₃) y sus mezclas. Se prefiere el uso de NaOH, Na₂CO₃, y K₂CO₃.
- 20 En caso de usar NaOH con el fin de limitar el coste global del procedimiento, este se añade en una cantidad preferiblemente menor del 10%, más preferiblemente menor del 8% e incluso más preferiblemente menor del 6% con respecto al peso de la biomasa.
- 25 Cuando se usan bases diferentes de NaOH, se usan cantidades correspondientes a los mismos equivalentes de NaOH, con respecto al peso de la biomasa.
- 30 La biomasa se impregna preferiblemente con dicha disolución acuosa básica en la etapa b) del procedimiento según la invención, formando una pasta de una consistencia tal que puede alimentarse a la etapa c), con una concentración de sólidos comprendida desde el 10 hasta el 50% en peso. La etapa b) puede tener lugar en condiciones estáticas (es decir, sin agitación) o preferiblemente con agitación suave, para obtener una pasta que tiene una composición homogénea.
- 35 La pasta obtenida en la etapa b) se envía entonces al dispositivo (o "prensa") en el que se produce el procedimiento de separación (etapa c)). Preferiblemente, dicha separación se realiza por compresión.
- 40 En una realización preferida del procedimiento según la invención, una parte de la disolución acuosa básica se añade a la pasta durante el prensado en la etapa c). Operando de esta manera, es posible reducir aún más la cantidad de bases. Esto tiene ventajas evidentes desde el punto de vista económico y desde el punto de vista de eliminación de las bases en forma de sales.
- 45 La pasta obtenida en la etapa b) puede tener un contenido en sólido que oscila entre el 10 y el 50% en peso, también dependiendo de la manera de realizar la etapa c).
- 50 Cuando la separación de las fracciones sólidas y líquidas se realiza usando un dispositivo como un filtro prensa, la pasta se prepara ventajosamente en un único lote y tiene un contenido en sólido que oscila entre el 10 y el 25% en peso, preferiblemente entre el 15 y el 20% en peso. Cuando la separación de las fracciones sólidas y líquidas se realiza alimentando la pasta a una prensa continua, tal como un sistema para machacar semillas oleaginosas, la pasta tiene ventajosamente un contenido en sólido que oscila entre el 20 y el 50% en peso, preferiblemente entre 25 y el 40% en peso.
- 55 En caso de usar una prensa continua, las etapas b) y c) pueden realizarse opcionalmente en el mismo dispositivo, alimentando a dicha prensa continua la biomasa de lignocelulosa y la disolución básica separadamente.
- 60 La temperatura durante la etapa c) es preferiblemente menor de 100°C, más preferiblemente entre 10 y 95°C, incluso más preferiblemente entre 25°C y 95°C y aún más preferiblemente entre 40 y 90°C.
- 65 El dispositivo que puede separar la fracción sólida y una fracción líquida en la etapa c) es preferiblemente una prensa mecánica o hidráulica. Ejemplos preferidos de prensas son sistemas para machacar las semillas oleaginosas, filtros prensa o cualquier sistema usado para el prensado de materiales fibrosos. Las prensas pueden comprender sistemas de eje único o de doble eje y pueden funcionar de manera continua o discontinua. Se prefieren particularmente máquinas para machacar semillas que producen un efecto adicional de desfibrado de la biomasa.
- Ventajosamente, la prensa usada para el prensado de las semillas obtenidas en la etapa a) puede usarse en la etapa c) del procedimiento. La prensa puede usarse individualmente o como parte de un conjunto.
- El prensado se realiza ventajosamente a temperaturas entre 25 y 100°C. Estas temperaturas pueden obtenerse o bien a través del efecto de fricción en la prensa o bien a través del calentamiento y termostatación de la prensa.

Como resultado del prensado se obtienen una fracción sólida que contiene principalmente celulosa y hemicelulosa y una fracción líquida que contiene lignina, acetatos, hemicelulosa y otros materiales extraíbles.

5 Con el fin de obtener un efecto de concentración de la lignina en la fracción líquida y ataque enzimático más eficaz en la celulosa y hemicelulosa, en una realización preferida de la invención, la fracción sólida y la fracción líquida se alimentan a la prensa de la que se han obtenido o a otra prensa. Puede usarse la fracción líquida entera o parte de la misma. Puede alimentarse agua junto con la fracción sólida y la fracción líquida. Esta operación se repite ventajosamente una o más veces.

10 Esto significa que, según una realización preferida, la fracción sólida obtenida en la etapa c) se combina con al menos una de agua y una parte o la totalidad de la fracción líquida obtenida previamente, y la pasta así obtenida se separa otra vez en una fracción sólida y una fracción líquida. Es preferible combinar la fracción sólida al menos con una parte o la totalidad de la fracción líquida y opcionalmente añadir agua adicional, si se desea.

15 El procedimiento de combinación y separación puede realizarse una o más veces. El número total de estas etapas opcionales de combinación/separación está preferiblemente en el intervalo de 1 a 10, más preferiblemente de 2 a 6. Puede usarse para la separación el mismo tipo de dispositivo (por ejemplo, una prensa) como se usa en la etapa c). Es posible usar un único dispositivo, por ejemplo, realimentando la pasta al mismo dispositivo como se usa para la etapa c) y/o la etapa precedente de combinación/separación, o una pluralidad de dispositivos tales como prensas conectadas en serie. Por ejemplo, es posible usar un sistema de prensas en cascada en el que la fracción sólida y la fracción líquida que contienen lignina, materiales extraíbles, ceniza y acetatos obtenidos en la etapa c) y/o la etapa precedente de combinación/separación, se alimentan a la etapa de combinación/separación posterior hasta que se consigue mejor disponibilidad para ataque enzimático en la fracción sólida.

25 Variando las condiciones de concentración de sólidos, temperatura y composición de las disoluciones acuosas añadidas a las distintas etapas de combinación/separación (por ejemplo, prensado), también es posible extraer de manera selectiva componentes individuales de la biomasa (es decir, lignina, acetatos, ceniza, etc.) en la fracción líquida.

30 Las fracciones líquidas obtenidas en la etapa c) y/o la(s) etapa(s) de combinación/separación posterior(es) pueden reunirse parcialmente o totalmente.

35 La fracción líquida obtenida tras la separación (por ejemplo, prensado) en la etapa c) y/o la(s) etapa(s) de combinación/separación posterior(es), que es rica en lignina, puede tratarse adicionalmente de manera química o física y puede reutilizarse como disolución acuosa en el pretratamiento según la invención, tras la adición de una cantidad de base adecuada.

40 De esta fracción líquida es posible obtener, por ejemplo, tras acidificación y precipitación, ligninas de alta calidad que pueden usarse para la producción de fenoles, poliuretanos, productos de reacción con anhídridos y polianhídridos. Las ligninas también pueden usarse como cargas y nanocargas reactivas, por ejemplo, en materiales plásticos, o como aditivos de refuerzo para cauchos o para poliésteres biodegradables. Un ejemplo de aplicación de los poliésteres obtenidos es la producción de macetas para viveros.

45 Mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, añadiendo una cantidad adecuada de ácido y alcoholes a la fracción líquida, también es posible facilitar la precipitación y consecuente recuperación de hidratos de carbono, que comprenden principalmente azúcares C5, que pueden estar presentes en los mismos.

50 La fracción sólida obtenida tras el prensado en la etapa c) o cualesquiera etapas de prensado posteriores, tiene un contenido en agua que es normalmente menor del 50% en peso, por ejemplo, menor del 40% en peso. Esta fracción sólida es rica en hidratos de carbono (es decir, celulosa y hemicelulosa) y, en caso de tratamiento de plantas herbáceas oleaginosas que tienen no más del 20% en peso de lignina con respecto al peso seco de la biomasa de lignocelulosa aérea, tiene un contenido en lignina de no más del 10% con respecto al peso seco de la biomasa, determinado como se describe anteriormente. Una ventaja adicional del procedimiento de la presente invención es que otros contaminantes tales como, por ejemplo, furfural y HMF no están presentes en la fracción sólida, o sólo están presentes en una cantidad despreciable. Esto permite obtener azúcares C5-C6 en la etapa d) con un contenido reducido en lignina e inhibidores, que son adecuados particularmente para procedimientos de fermentación y requieren operaciones sencillas para separar y purificar productos tras la fermentación.

60 La fracción sólida obtenida tras la finalización de la etapa c) y/o las etapas opcionales de combinación/separación, descritas anteriormente puede someterse opcionalmente a uno o más lavados con agua, o con una disolución acuosa ligeramente ácida, para eliminar la base residual (etapa c-1)). El lavado puede hacerse ventajosamente mediante extracción en contracorriente.

65 Tras el lavado, la fracción sólida obtenida se somete a hidrólisis enzimática en la etapa d).

La figura 3 muestra el diagrama de flujo 3 del procedimiento según la invención que comprende el lavado opcional

con agua en la etapa a) y el lavado opcional de la fracción sólida de la etapa c-1).

En el procedimiento según la invención, las etapas de a) a c-1) representan el así denominado "pretratamiento".

5 La fracción sólida rica en hidratos de carbono obtenida tras el pretratamiento de la biomasa se somete a tratamiento con enzimas que forman azúcar para producir azúcares C5-C6 simples en la etapa d) del procedimiento.

El tratamiento con enzimas se realiza usando enzimas hidrolíticas o sus mezclas capaces de dividir los hidratos de carbono en monosacáridos (por ejemplo, celulasas y/o hemicelulasas).

10 La etapa d) de hidrólisis enzimática puede realizarse ventajosamente según la invención alimentando una disolución que contiene dichas enzimas y la fracción sólida a una prensa a través de un procedimiento de prensado continuo/formación de azúcar. Como alternativa, esto puede realizarse mezclando la fracción sólida con dichas enzimas en un reactor discontinuo. Pueden añadirse aditivos densificantes que corregirán la viscosidad de la pasta y reducirán la cristalinidad de la celulosa a distintas etapas en el prensado y/o el prensado/formación de azúcar.

Los azúcares C5-C6 simples obtenidos mediante el procedimiento según la invención pueden por tanto someterse a conversión por medios químicos o bioquímicos (por ejemplo, fermentación) para obtener compuestos orgánicos.

20 Ejemplos de tratamiento bioquímico es la fermentación realizada por bacterias (por ejemplo *E. coli*) o por levaduras oleaginosas tales como, por ejemplo, aquellas que pertenecen al género *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* y se prefieren particularmente *Lipomyces*, *Yarrowia* y *Candida*.

25 Los compuestos orgánicos que pueden obtenerse mediante tales tratamientos son, por ejemplo, dialcoholes (preferiblemente butanodiol), monoalcoholes, hidroxiacidos y diácidos, aminoácidos y diaminas.

Por ejemplo, pueden usarse mezclas de azúcares C5 y C6 por *E. coli* modificada genéticamente mediante el procedimiento descrito en la patente estadounidense 8.067.214 B2 para obtener butanodiol.

30 Los azúcares obtenidos pueden someterse también a procedimientos de conversión química.

Ejemplos de conversión química son la isomerización de glucosa a fructosa y la posterior deshidratación en un ambiente ácido con el fin de obtener HMF, que puede a su vez oxidarse, produciendo ácido furano dicarboxílico y sus derivados.

35 Los productos intermedios químicos que pueden obtenerse por la conversión de azúcares producidos mediante el procedimiento según la invención, tales como, por ejemplo, butanodiol, ácido succínico, ácido adípico, ácido mucónico, ácido furano dicarboxílico, ácido tereftálico, ácido levulínico, ácido láctico y polihidroxicanoatos, son útiles como monómeros para la síntesis de polímeros, en particular poliésteres.

40 En otra realización del procedimiento según la invención, una fracción de la biomasa de lignocelulosa aérea residual se usa para producir energía y/o biocombustibles mediante procedimientos de combustión/pirólisis y/o biogás y/o hidrógeno.

45 **Ejemplos**

Se describirá a continuación una realización no limitante del procedimiento según la invención.

50 Ejemplo 1

Se usó una muestra de *Cynara cardunculus* variedad *atilis*.

Etapa a)

55 En el momento de la cosecha las semillas se separaron de la biomasa de lignocelulosa aérea restante que comprende tallos, hojas y capítulos (sin las semillas). El contenido en lignina fue de aproximadamente el 18% con respecto al peso seco de la biomasa. La biomasa se trituró entonces a un tamaño de 1-3 mm en un molino de tipo M 100 de Retsch.

60 Etapa b)

Se colocaron 100 g de biomasa (que tienen un contenido en humedad del 10%) y 350 de agua destilada en un reactor cilíndrico equipado con deflectores y un agitador mecánico con palas alternas, termómetro, pH-métro y embudo de goteo.

65 La pasta obtenida se elevó entonces a una temperatura de 90°C usando un baño de calentamiento y se añadió una

disolución de NaOH al 12% por goteo, manteniendo el pH a valores por debajo de 11. Se añadieron 50 ml de disolución correspondiente a un total de 6 g de NaOH durante 3 horas, obteniendo una pasta con el 18% de biomasa. Se continuó la agitación durante 2 horas adicionales.

5 Etapa c)

La pasta obtenida durante la etapa b) se prensó usando un filtro prensa para laboratorio.

10 La fase sólida resultante se lavó entonces sucesivamente con agua hasta pH neutro. Tras el secado se obtuvieron 62 g de fracción sólida.

Se analizó la fracción líquida tras el pretratamiento y se demostró una extracción de lignina de aproximadamente el 70% e hidrólisis mínima de la hemicelulosa, correspondiente a una pérdida del 5% con respecto al contenido inicial de hemicelulosa.

15 Etapa d)

La fracción sólida obtenida se sometió entonces a hidrólisis enzimática.

20 Se añadieron 100 mg de fracción sólida a 9,8 ml de tampón acetato (pH 4,8) en un matraz y se inocularon con 200 µl de Accellerase 1500 (un complejo enzimático que contiene enzimas que tienen actividad celulolítica y hemicelulolítica). El matraz se mantuvo a 50°C durante 48 horas.

25 Se centrifugó entonces la mezcla de reacción (que comprende fracción sólida, tampón y disolución enzimática). La concentración de glucosa en disolución se determinó entonces usando un analizador bioquímico 2900 de YSI.

Se obtuvieron 44,7 mg de glucosa a partir de la hidrólisis enzimática de 100 mg de fracción sólida tratada según la invención. La misma calidad de biomasa no tratada sometida a hidrólisis enzimática de la misma manera produjo en cambio 3,99 mg de glucosa.

30 Ejemplo 2

Etapa a)

35 Se obtuvo una muestra de biomasa de lignocelulosa aérea de *Cynara cardunculus* análoga a la usada en el ejemplo 1 por separación de las semillas en el momento de la cosecha, como en el ejemplo 1.

La biomasa se trituró entonces a un tamaño de 1 mm en un molino de tipo M100 de Retsch.

40 Etapa b)

Se impregnaron 100 g de biomasa (que tiene un contenido en humedad del 10%) con 200 ml de disolución acuosa que contiene 5 g de NaOH y se homogeneizaron en una mezcladora durante 15 minutos a temperatura ambiente. La biomasa absorbió fácilmente la disolución acuosa adquiriendo las propiedades de un polvo hidratado que fluye, que también podría describirse como una pasta, y se alimentó a la tolva de la prensa (contenido en biomasa del 30%).

Etapa c)

50 La pasta se alimentó a una máquina para prensar semillas de prensa de husillo Kern Kraft KK 8/2 con un cabezal calentado a 90°C, a una velocidad de aproximadamente 900 g/h. La máquina se dotó de un tornillo que operaba a una velocidad de 15 rpm. El material de salida comprendía una fracción sólida y una fracción líquida que se recogieron separadamente.

55 La fracción sólida recogida se mezcló de nuevo con la fracción líquida con el fin de obtener un efecto de concentración de lignina en la fracción líquida y un ataque enzimático más eficaz en la celulosa y hemicelulosa. La pasta así obtenida se alimentó a la misma prensa.

Esta operación se repitió tres veces obteniendo 62 g de fase sólida lavada y secada al final del quinto prensado.

60 Etapa d)

Se obtuvo tras cada uno de los prensados una muestra de la fracción sólida que se lavó con agua destilada y se secó.

65 Se sometieron entonces 100 mg de cada muestra de fracción sólida a hidrólisis enzimática para obtener azúcares C5 y C6 como en el ejemplo 1, etapa d).

Al final de la reacción enzimática, la mezcla de reacción, filtrada y diluida a 1:10 con una disolución de H₂SO₄ 0,005 N, se analizó entonces mediante HPLC para determinar la concentración de azúcares C5 y C6.

5 Se usó un instrumento equipado con un detector de índice de refracción y una columna Rezex-ROA-ácido orgánico H+ (8%) de 300 x 7,8 mm en las siguientes condiciones de operación:

Flujo: 0,6 ml/min

10 Temperatura: 65°C.

Eluyente: disolución acuosa de H₂SO₄ 0,005 N

15 La tabla a continuación muestra la cantidad de azúcares obtenidos tras la hidrólisis enzimática de la fracción sólida al final de cada prensado.

Muestra de fracción sólida (100 mg)	Glucosa (C6) (mg)	Xilosa (C5) (mg)
Primer prensado	32,1	13,2
Segundo prensado	34,1	14,0
Tercer prensado	39,3	14,9
Cuarto prensado	45,4	17,2
Quinto prensado	46,9	18,2

20 El ejemplo demuestra que el pretratamiento según la invención es eficaz en cuanto a la extracción de lignina, aumentando la eficacia de la hidrólisis enzimática, y conserva la hemicelulosa en la fracción sólida, proporcionando altos rendimientos de azúcares C5 y C6.

Ejemplo 3

Etapa a)

25 Se obtuvo una muestra de biomasa de lignocelulosa aérea de *Cynara cardunculus* análoga a la usada en los ejemplos previos mediante separación de las semillas en el momento de la cosecha, como en el ejemplo 1.

30 La biomasa se trituró a un tamaño de 1 mm en un molino de tipo M100 de Retsch. Se agitaron entonces 100 g de biomasa (que tiene un contenido en humedad del 10%) y 200 ml de agua en una mezcladora durante 10 minutos a temperatura ambiente.

35 La pasta así obtenida se alimentó a una máquina para prensar semillas de prensa de husillo Kern Kraft KK 8/2 con un cabezal calentado a 100°C, a una velocidad de aproximadamente 900 g/h. La máquina se dotó de un husillo que operaba a una velocidad de 15 rpm. El material de salida comprendía 132 g de una fracción sólida húmeda y 135 g de una fracción líquida marrón que se recogieron separadamente. El análisis de la fracción líquida mostró la presencia de ácidos glucurónico, succínico, láctico, acético y levulínico, para una acidez total correspondiente a 0,8 g de NaOH.

Etapa b)

45 La fracción sólida húmeda, correspondiente a un peso seco de 73 g, se trató como en el ejemplo 2 con una disolución de NaOH (4,5 g) en agua (200 ml) y se homogeneizó en una mezcladora durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Las etapas c) y d) se llevaron a cabo como se describe en el ejemplo 2, obteniendo al final del quinto prensado 46,7 mg de glucosa y 18,5 mg de xilosa.

Ejemplo 4

Etapa a)

50 Se obtuvo una muestra de biomasa de lignocelulosa aérea de *Cynara cardunculus* análoga a la usada en los ejemplos previos mediante separación de las semillas en el momento de la cosecha, como en el ejemplo 1. La biomasa se trituró a un tamaño de aproximadamente 5 mm en un molino de tipo Cumberland.

Etapa b)

ES 2 592 859 T3

Se agitaron 4,01 kg (contenido en humedad del 10%) de biomasa de lignocelulosa y una disolución de 250 g de NaOH en 7,99 kg de agua en una mezcladora de 50 litros durante 2 minutos a temperatura ambiente (12,3°C).

Etapa c)

5 La pasta obtenida se alimentó a una prensa continua para triturado con aceite del tipo MIG PC 25, que tiene una capacidad de 12 kg/h y equipada con un husillo de 110 mm de diámetro y una L/D = 4,4, girando a 10 rpm.

10 Se separaron las fracciones sólidas y líquidas proporcionando 6 kg de biomasa húmeda extruida (51,7% de sólido) y 5,6 kg de una suspensión (líquido + pasta) a añadir a la alimentación posterior.

Etapa d)

15 Tras el lavado con agua con el fin de eliminar la base residual se sometió el sólido a hidrólisis enzimática produciendo 1,06 kg de azúcares.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de azúcares C5-C6 fermentables a partir de plantas herbáceas oleaginosas que pertenecen a la tribu Cardueae, que comprende las etapas de:
 - a) separar mecánicamente las semillas de la biomasa de lignocelulosa aérea de las plantas herbáceas oleaginosas y triturar dicha biomasa de lignocelulosa;
 - b) poner en contacto la biomasa de lignocelulosa triturada con una disolución acuosa básica que contiene el 5% en volumen o menos de un disolvente orgánico para preparar una pasta acuosa que contiene la biomasa de lignocelulosa triturada en una cantidad del 10 al 50% en peso, a una temperatura de entre 10 y 95°C y durante un tiempo de entre 1 minuto y 24 horas;
 - c) separar la pasta en una fracción sólida y una fracción líquida;
 - d) someter la fracción sólida a hidrólisis enzimática de la hemicelulosa y la celulosa contenidas en la misma.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las semillas obtenidas en la etapa a) se someten a tratamiento para extraer el aceite.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que después de la etapa a) y antes de la etapa b), dicha biomasa de lignocelulosa aérea triturada se lava con agua.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que después de la etapa c) y antes de la etapa d), la fracción sólida se lava una o más veces con agua o con una disolución acuosa ligeramente ácida.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las plantas herbáceas oleaginosas pertenecen a las especies *Cynara cardunculus* o *Silybum marianum*.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que, después de la etapa c), la fracción sólida se combina con al menos uno seleccionado de agua y una parte o la totalidad de la fracción líquida obtenida previamente;

y la pasta así obtenida se separa otra vez en una fracción sólida y una fracción líquida;

dicha combinación y separación se realizan una o más veces;

y la fracción sólida obtenida finalmente se procesa adicionalmente según la etapa d).
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la fracción sólida se combina con parte o la totalidad de la fracción líquida obtenida previamente, opcionalmente en combinación con agua.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la separación de la pasta en una fracción sólida y una fracción líquida se realiza con una prensa mecánica o hidráulica o con una cascada de prensas hidráulicas o mecánicas.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha disolución acuosa básica de la etapa b) se obtiene añadiendo al agua una base que se selecciona de NaOH, LiOH, KOH, Mg(OH)₂, Ca(OH)₂, carbonatos alcalinos y sus mezclas.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la base es NaOH y se añade en una cantidad de menos del 10% con respecto al peso de la biomasa de lignocelulosa.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la disolución acuosa básica está libre de disolvente orgánico.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la etapa c) se realiza a una temperatura por debajo de 100°C.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que la etapa c) se realiza a una temperatura de entre 25°C y 95°C.

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la biomasa de lignocelulosa en la etapa a) se tritura a un tamaño de partícula promedio de 2 cm o menos, como se determina mediante el método de tamizado.
- 5 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la etapa d) se realiza con una mezcla de enzimas celulasa y hemicelulasa.

Figura 1

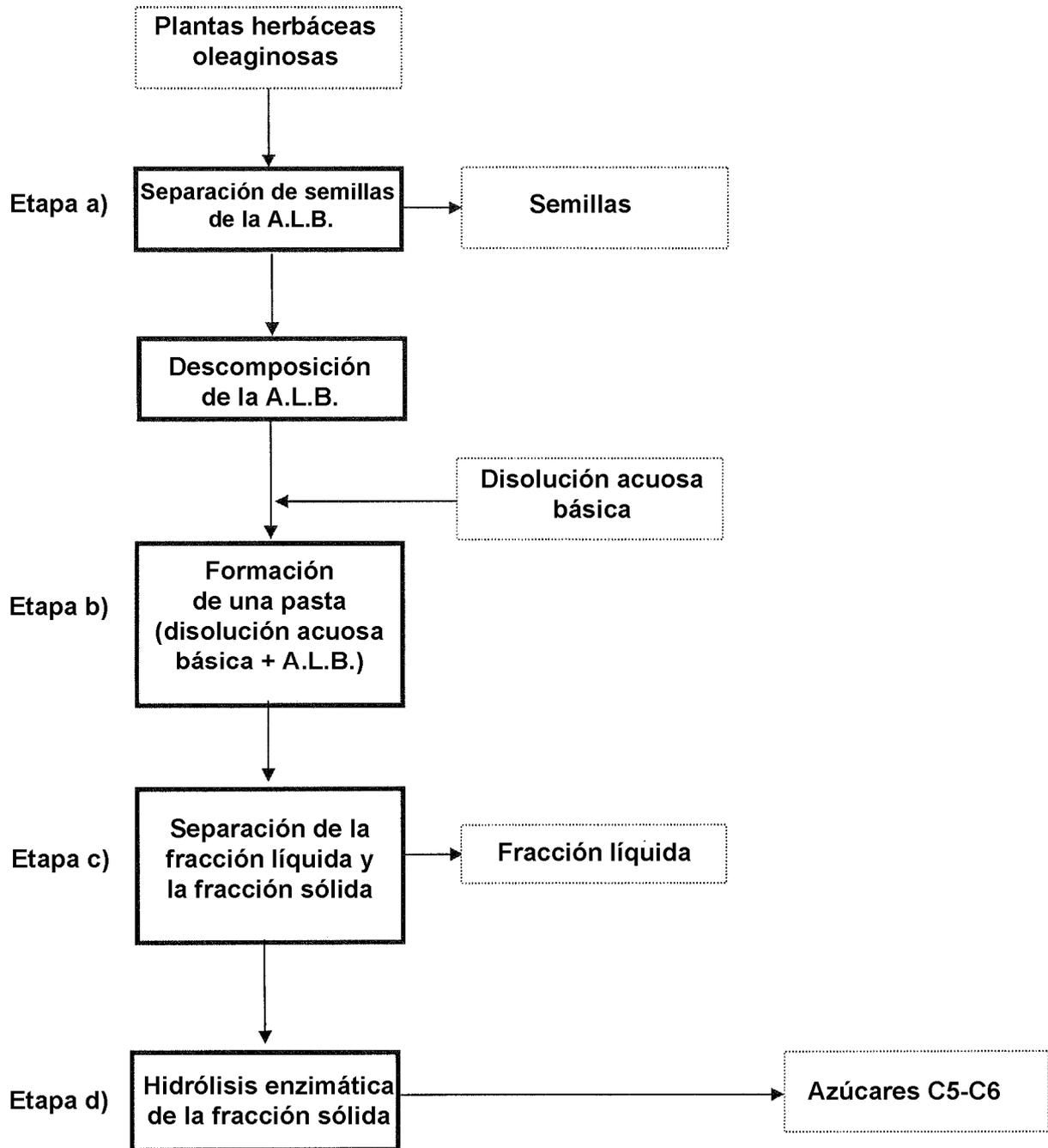


Figura 2

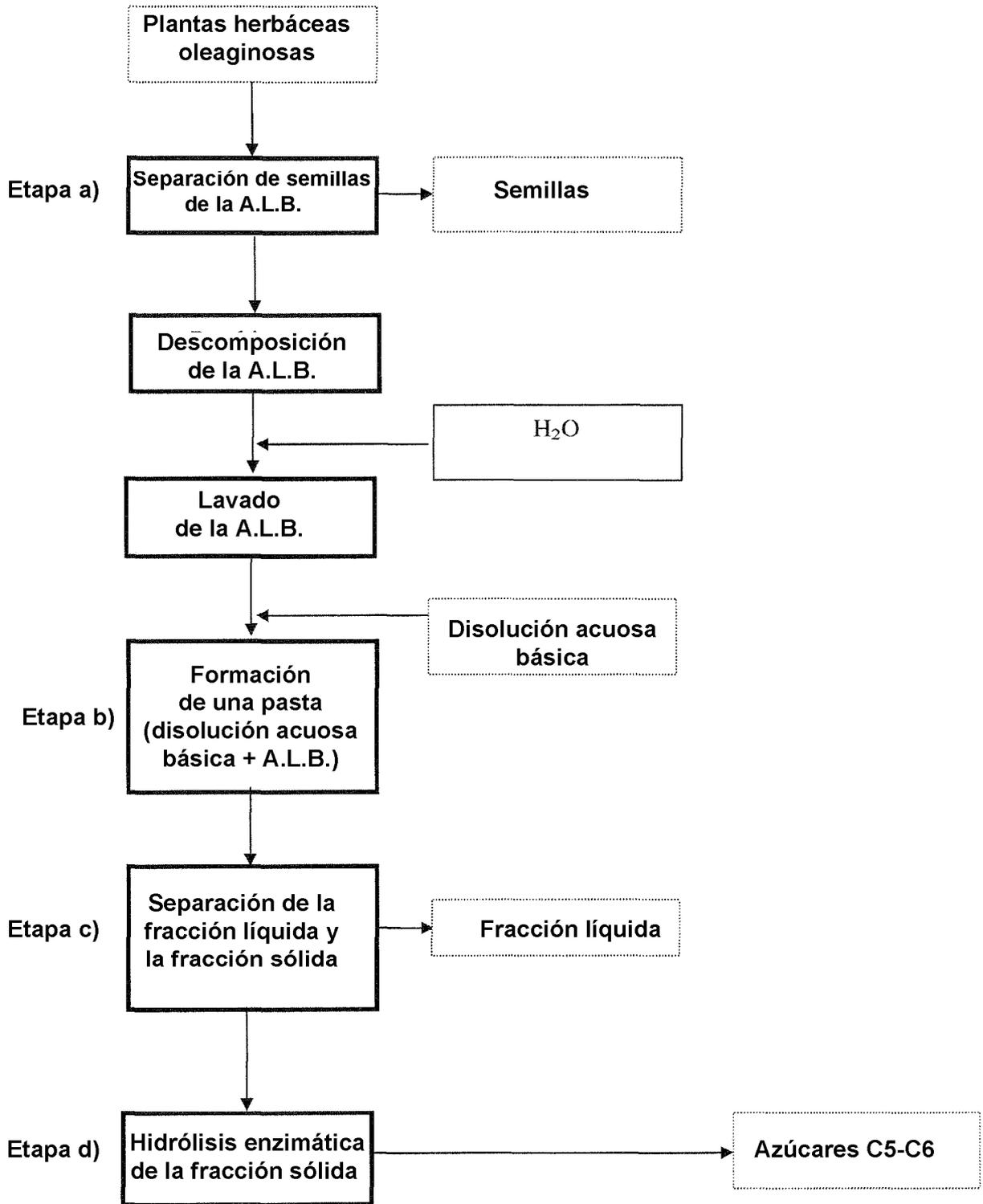


Figura 3

