(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 742 814**

(51) Int. Cl.:

D21C 5/00	(2006.01)
C12P 7/00	(2006.01)
C12P 7/40	(2006.01)
C07C 65/00	(2006.01)
C07G 1/00	(2011.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2014** **PCT/EP2014/075680**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2015** **WO15078920**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2014** **E 14806579 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019** **EP 3074569**

(54) Título: **Procedimiento de despolimerización de lignina con lacasas**

(30) Prioridad:

27.11.2013 FR 1361718

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2020

(73) Titular/es:

INSTITUT POLYTECHNIQUE DE BORDEAUX (33.3%)
1, rue du Docteur Albert Schweitzer
33402 Talence Cedex, FR;
UNIVERSITÉ DE BORDEAUX (33.3%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%)

(72) Inventor/es:

GRELIER, STÉPHANE y
KOUMBA YOYA, GEORGES

(74) Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 742 814 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 de despolimerización de lignina con lacasas

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento de despolimerización de lignina.

[0002] La lignina es el segundo biopolímero renovable más abundante, después de la celulosa, y, entre ellos, constituyen más del 70 % de la biomasa total.

[0003] La valorización de la lignina representa así un gran desafío.

[0004] En la industria del papel, se obtienen grandes cantidades de lignina como subproductos o residuos, de las cuales solo una ínfima parte se recupera en forma química. En la industria del azúcar, cantidades significativas de lignina también se obtienen en forma de residuos durante la extracción del jugo de la caña de azúcar. La lignina se usa principalmente como un aglutinante o dispersante, o para la preparación de biogás con un tratamiento a alta temperatura (800 ºC-1000 ºC). Asimismo existen procedimientos de despolimerización de lignina con la participación de derivados clorados, no satisfactorios desde un punto de vista medioambiental.

[0005] En la actualidad, existen pocos procedimientos viables económicamente que usan la lignina como materia prima para producir compuestos químicos.

[0006] Existe, por tanto, una necesidad para un nuevo procedimiento de recuperación de lignina, que sea viable económicamente y aceptable desde un punto de vista medioambiental.

[0007] El artículo “Dégradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system”, Srebotnik, E., y col., Journal of Biotechnology, vol. 81, no. 2-3, 25 de agosto de 2000, páginas 179-188, describe un procedimiento para la despolimerización de lignina no fenólica que comprende una etapa de oxidación de la lignina no fenólica con lacasa en presencia de hidroxibenzotriazol en una mezcla que comprende N,N-dimetilformamida y en presencia de aire. El documento WO 2013/090430 describe un procedimiento que implica la degradación de lignina no fenólica que comprende la puesta en contacto de lignina con lignina depolimerasa (lacasa) y un compuesto auxiliar. El artículo “Lignin oxidation by laccase isozymes from Trametes versicolor and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization”, Bourbonnais, R., y col., Applied and Environmental Microbiology, vol. 61, no. 5, 1 de mayo de 1995, páginas 1876-1880, describe un procedimiento para la despolimerización de lignina no fenólica que comprende una etapa de oxidación de lignina con un sistema que comprende lacasa y ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). El artículo “Involvement of lipid peroxidation in the dégradation of a non-phenolic lignin model compound by manganese peroxidase of the litter-decomposing fungus Stropharia coronilla”, Kapich, A., y col., Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 330, no. 2, 6 de mayo de 2005, páginas 371-377, describe un procedimiento de degradación de un compuesto modelo de lignina no fenólica por peroxidasa de manganeso. El artículo “Réduction of the 2,2'- Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) Cation Radical by Physiological Organic Acids in the Absence and Presence of Manganese”, Patrick J Collins, Alan D W Dobson, Jim A Field, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 64, No. 6, junio de 1998, págs. 2026-2031, describe un procedimiento para el reciclaje de los radicales catiónicos de ABTS en su forma reducida, de modo que puedan ser reutilizados. El documento describe que la concentración de mediador redox usada en los tratamientos de compuestos no fenólicos tales como pulpa de lignina con lacasa puede ser reducida.

[0008] La presente invención tiene como objeto proponer un nuevo procedimiento de despolimerización de lignina que sea eficaz y conveniente desde un punto de vista medioambiental, permitiendo acceder a productos de despolimerización recuperables en los diferentes campos industriales, tales como las biorrefinerías, agroalimentario o incluyo el cosmético.

[0009] Otro objetivo de la presente invención es proponer un procedimiento que permita acceder de manera controlada, a productos de despolimerización de tamaños diversos como ácido 3,4-dimetoxibenzoico ácido vanílico metilado), veratraldehído (vainillina metilada), veratrol (guayacol metilado), o diformil guayacol metilado.

[0010] El procedimiento de la presente invención propone combinar, de manera secuencial, la acción de una enzima y la acción de un agente oxidante.

[0011] Más particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento de despolimerización de lignina que comprende:

- una etapa de oxidación de lignina no fenólica por la puesta en presencia, en al menos un disolvente, de lignina no fenólica, lacasa, un mediador redox seleccionado entre el grupo constituido por ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), ácido violúrico, ácido hidroxiantranílico, TEMPO y N-hidroxi-ftalimida, y una fuente de oxígeno, por lo que se obtiene una mezcla que comprende lignina no fenólica oxidada, y

- una etapa de despolimerización de lignina no fenólica oxidada así como obtenida, por adición de un agente oxidante nucleófilo, siendo dicha lignina no fenólica lignina alquilada obtenida a partir de lignina fenólica por funcionalización de funciones fenol de dicha lignina fenólica con alquilos, para dar funciones alcoxi.

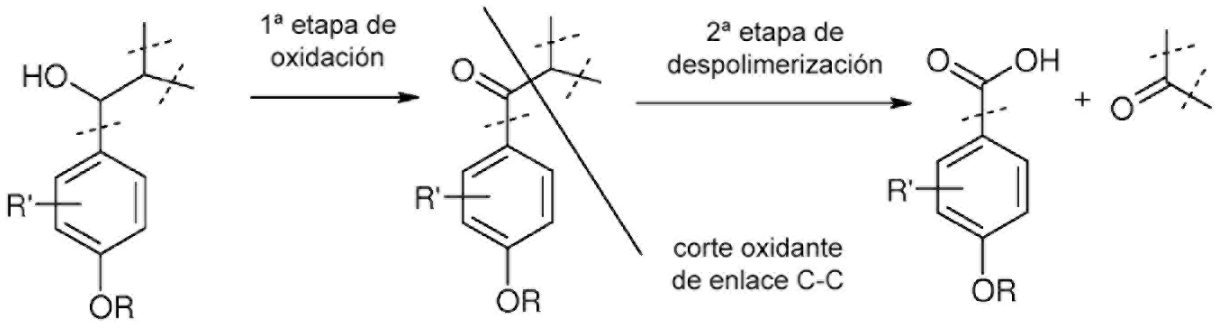
[0012] El procedimiento de la invención es no microbiológico, en el sentido de que no usa microorganismos (tales como hongos) que expresan de manera endógenamente lacasas.

[0013] Los inventores observaron, de manera sorprendente, que la acción en la lignina no fenólica de una lacasa en presencia de un mediador redox y de una fuente de oxígeno, seguido por la adición de un agente oxidante, tiene como efecto despolimerizar de manera eficiente la estructura de lignina.

[0014] Durante la primera etapa del procedimiento (etapa de oxidación), las funciones hidroxilo en posición bencílica de la lignina no fenólica son oxidadas en funciones cetona. Durante esta etapa, la estructura polimérica de lignina no está fragmentada y sustancialmente no se corta ningún en lace C-C.

[0015] Durante la segunda etapa del procedimiento (etapa de despolimerización, también conocida como fragmentación), los enlaces C-C de la estructura polimérica de la lignina están rotos. Sin desear quedar ligado a una teoría particular, los enlaces C-C rotos de esta forma son aquellos que se encuentran en la proximidad de las funciones cetona formadas durante la primera etapa del procedimiento.

[0016] El procedimiento de la invención puede ser representado por el siguiente esquema ilustrativo:



en el que el grupo -OR representa una función fenol funcionalizada de lignina no fenólica y el grupo R' representa otro posible sustituyente (diferente de una función fenol) del grupo fenilo representado. La presencia, el número y el tipo de grupo R' dependen de la lignina usada. Puede tratarse, por ejemplo, de uno o más grupos metoxi.

[0017] El esquema anterior es meramente ilustrativo y no refleja esquemáticamente la estructura de la lignina.

[0018] Como se explicará más adelante, las dos etapas del procedimiento se llevan a cabo ventajosamente una después de la otra en el mismo reactor.

[0019] Las condiciones de reacción de las etapas del procedimiento de la invención se describirán más adelante.

[0020] En general, en el contexto de la presente solicitud, se entiende por “medio de reacción” el medio en el que tienen lugar las etapas del procedimiento y que comprende un derivado de lignina, una lacasa, un mediador redox, una fuente de oxígeno, al menos un disolvente, y opcionalmente un agente oxidante (dependiendo de si ya se ha añadido o no).

[0021] Por “puesta en presencia”, se entiende además a la adición de un reactivo en el medio de reacción.

[0022] Dicho medio de reacción también puede comprender otros reactivos tales como los descritos en la presente solicitud.

[0023] La materia prima implementada en el procedimiento, a saber, la lignina no fenólica, se describirá ahora.

Lignina no fenólica

[0024] Por “lignina no fenólica”, se entiende un derivado de lignina fenólica, que es el producto de reacción de la funcionalización de funciones fenol (Ph-OH) de una lignina fenólica (llamada simplemente también “lignina”).

[0025] Una lignina no fenólica es una lignina modificada o funcionalizada, en la que al menos se modifica una función fenol. Preferentemente, al menos 50 %, incluso al menos 60 %, incluso al menos 70 %, incluso al menos 80 %, incluso al menos 90 %, incluso al menos 95 %, incluso al menos 99 % de las funciones fenol de lignina son modificadas.

[0026] Un tipo de lignina no fenólica se describe en particular en Srebotnik y col. (Journal of Biotechnology 81 (2000), 179-188).

[0027] Preferentemente, la lignina no fenólica no incluye función fenol libre (no funcionalizada).

[0028] Una lignina no fenólica se obtiene por reacción de una lignina fenólica con un agente de funcionalización apto para convertir funciones fenol de dicha lignina fenólica en funciones no reactivas durante la etapa de oxidación del procedimiento. La funcionalización de la lignina tiene como objeto proteger las funciones fenol durante la etapa de oxidación del procedimiento e impedirles que reaccionen. Las funciones fenol funcionalizadas de lignina no fenólica por lo tanto no son reactivas durante la etapa de oxidación con lacasas.

[0029] En el contexto de la presente invención, se entiende por “funcionalización de lignina”, la funcionalización selectiva de las funciones fenol, es decir, que las otras funciones hidroxilo de lignina (alcoholes alifáticos en particular) no son funcionalizadas. Preferentemente, la funcionalización es total, es decir, que todas las funciones fenol son funcionalizadas.

[0030] Los inventores han descubierto que usando una lignina fenólica según el procedimiento de la invención, se mejora la despolimerización de lignina.

[0031] La alquilación es un ejemplo de funcionalización adecuado para la implementación del procedimiento. Se usa, por ello, un agente de alquilación a modo de agente de funcionalización.

[0032] Según una realización, se puede usar lignina alquilada como lignina no fenólica.

[0033] Por “lignina alquilada”, se entiende lignina no fenólica en la que las funciones fenol son funcionalizadas por alquilos (normalmente C_1-C_{12}), para dar funciones alcoxi.

[0034] Preferentemente, la lignina alquilada no incluye función fenol libre, es decir, que están todas (o casi todas) en forma de funciones alcoxi.

[0035] Según una realización ventajosa, se puede usar lignina metilada como lignina no fenólica.

[0036] Se usa, por ello, un agente de metilación a modo de agente de funcionalización.

[0037] Por “lignina metilada”, se entiende lignina alquilada en la que las funciones fenol son funcionalizadas por metilos, para dar funciones metoxi.

[0038] Preferentemente, la lignina metilada no incluye función fenol libre, es decir, que están todas (o casi todas) en forma de funciones metoxi.

[0039] Tras la funcionalización de una lignina fenólica, con el fin de controlar la tasa de funcionalización y la selectividad de funcionalización, se puede cuantificar por ^{31}P RMN la cantidad de funciones fenólicas opcionalmente restantes (que, por lo tanto, no fueron funcionalizadas). Un procedimiento se describe en particular en Granat y col. J. Agric. Food Chem., 1995, 43(6), 1538-1544.

[0040] Según una realización, la lignina no fenólica es una lignina alquilada que se obtiene por la puesta en presencia, en una solución acuosa básica, de lignina fenólica y de un agente alquilante.

[0041] En el contexto de la presente invención, un agente alquilante es un compuesto apto para funcionalizar las funciones fenol por grupos alquilo, al sustituir los átomos de hidrógeno de dichas funciones fenol con grupos alquilo (para dar funciones alcoxi).

[0042] Preferentemente, se usa un agente alquilante que permite alquilar selectivamente las funciones fenol de lignina, es decir, que las otras funciones hidroxilo de lignina (alcoholes secundarios en particular) no son alquiladas en funciones alcoxi.

[0043] Preferentemente, se usa un agente alquilante que permite alquilar por completo funciones fenol de lignina, es decir, que todas (o casi todas) las funciones fenol de lignina son alquiladas en funciones alcoxi.

[0044] Según una realización ventajosa, la lignina no fenólica es una lignina metilada, que se obtiene

preferentemente por la puesta en presencia, en una solución acuosa básica, de lignina fenólica y de un agente metilante.

[0045] En el contexto de la presente invención, un agente metilante es un compuesto apto para funcionalizar las funciones fenol con grupos alquilo, al sustituir los átomos de hidrógeno de dichas funciones fenol con grupos metilo.

[0046] Preferentemente, se usa un agente metilante que permite metilar selectivamente las funciones fenol de lignina, es decir, que las otras funciones hidroxilo de lignina (alcoholes secundarios en particular) no son metiladas en funciones metoxi.

[0047] La puesta en presencia del agente de metilación se lleva a cabo normalmente gota a gota.

[0048] La puesta en presencia es normalmente seguida por una etapa de calentamiento del medio de reacción, a una temperatura comprendida normalmente de 50 ºC a 100 ºC.

[0049] Como agente metilante, se pueden mencionar dimetilsulfato (o sulfato de dimetilo), carbonato de dimetilo (DMC), yoduro de metilo y diazometano.

[0050] Preferentemente, se usa dimetilsulfato, que permite metilar por completo y de forma selectiva las funciones fenol de una lignina fenólica.

[0051] La etapa de metilación de la lignina puede llevarse a cabo normalmente según un procedimiento descrito en Sadeghifar y col. Ind. Eng. Chem. Res. 2012, 51, 16713-16720.

[0052] La lignina se disuelve en una solución acuosa básica, normalmente de carbonato de sodio (por ejemplo a 0,7 M). La mezcla obtenida se agita, normalmente a temperatura ambiente, y un agente metilante es añadido, preferentemente gota a gota (a razón de aproximadamente 50 equivalente de agente metilante con respecto al número de equivalentes de funciones fenol). La mezcla se caliente normalmente (por ejemplo a 80 ºC) hasta que los reactivos se consuman. La mezcla en entonces acidificada, filtrada y el sólido obtenido se lava con agua destilada y se seca para proporcionar la lignina metilada.

[0053] Sin desear quedar ligado a una teoría particular, los inventores han observado que la metilación de la lignina, al bloquear selectiva y completamente las funciones fenol, permite evitar de manera muy eficaz las reacciones de polimerización de la lignina durante la acción de lacasa, y así mejorar la despolimerización.

[0054] El efecto de la metilación se ilustra en particular en los ejemplos comparativos descritos a continuación. Una lignina no fenólica (no metilada) tratada con el procedimiento de la invención no se despolimeriza.

Lignina fenólica

[0055] En el contexto de la presente invención, se entiende por “lignina fenólica” o “lignina”, una forma natural de lignina, que incluye funciones fenol libres (Ph-OH).

[0056] La estructura de la lignina se presenta en forma de una red tridimensional compleja, resultante de la polimerización de unidades básicas que tienen como esqueleto un motivo fenilpropano. La lignina se refiere más en general a “ligninas”, en función de las unidades de base que la constituye. Entre las unidades de base de la lignina, también denominadas monolignoles, se pueden mencionar principalmente alcohol paracoumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico.

[0057] En el contexto de la presente invención, se entiende por “despolimerización” una reacción en la que se rompen los enlaces covalentes de la estructura polimérica de la lignina, dando lugar a productos de despolimerización de tamaño inferior a la lignina de partida.

[0058] Por “tamaño inferior”, se entiende que los productos de despolimerización obtenidos según el procedimiento de la invención poseen una masa molecular inferior a la de la lignina no fenólica de partida.

[0059] Sin embargo, en el contexto de la presente invención, el sentido del término “despolimerización” no debe limitarse a la transformación de la lignina no fenólica en unidades de base tales como las descritas anteriormente.

[0060] Normalmente, los productos de despolimerización de la lignina obtenidos según el procedimiento de la invención se forman por una unidad de base, algunas unidades de base, incluso algunas decenas de unidades de base. Se obtienen generalmente mezclas de productos de despolimerización, que incluyen un número diferente de unidades de base.

[0061] En general, dado la estructura compleja de la lignina, el procedimiento de la invención proporciona una

mezcla de productos de despolimerización de tamaños y estructuras diversos, que pueden llevar diferentes grupos funcionales, tales como los grupos cetona, aldehído, ácido, fenol, alcohol o metoxi por ejemplo, preferentemente ácido, metoxi, alcohol y cetona.

[0062] Dichos productos de despolimerización se pueden ser definidos como “monómeros”, “oligómeros” o “fragmentos” de lignina no fenólica.

[0063] Así, por “procedimiento de despolimerización”, se entiende también un “procedimiento de fragmentación” de la estructura de la lignina.

[0064] Los productos de despolimerización obtenidos según el procedimiento de la invención presentan un tamaño comprendido entre 100 g/mol y 5.000 g/mol, preferentemente entre 150 g/mol y 4.000 g/mol, ventajosamente entre 200 g/mol y 3.000 g/mol, preferentemente entre 500 g/mol y 2.500 g/mol.

[0065] La mezcla de productos de despolimerización de la lignina se caracteriza normalmente por su masa molecular promedio M_w, que representa el promedio de las masas molares ponderada por la masa de cada producto, y que tiene como fórmula:

$$M_w = \frac{\sum_i n_i M_i^2}{\sum_i n_i M_i}$$

en la que $_i$ designa el número de productos i y M_i designa la masa molecular del producto i.

[0066] Para una mezcla de productos de despolimerización obtenida según el procedimiento de la invención, la masa molecular promedio M_w, puede ser medida por cromatografía de exclusión estérica (SEC para “Size Exclusion Chromatography”).

[0067] La mezcla de productos de despolimerización presenta normalmente una masa molecular promedio M_w comprendida entre 100 g/mol y 5.000 g/mol, preferentemente entre 150 g/mol y 4.000 g/mol, ventajosamente entre 200 g/mol y 3.000 g/mol, preferentemente entre 500 g/mol y 2.500 g/mol.

[0068] La mezcla de productos de despolimerización obtenida según el procedimiento de la invención también se puede caracterizar por la relación molar entre la masa molecular promedio en masa M_w de dicha mezcla y la masa molecular promedio en masa de la lignina de partida M_{li9}.

[0069] Normalmente, usando el procedimiento de la invención, se obtiene una relación molar M_w/M_{li9} comprendida entre 1/3 y 1/10.

[0070] La lignina no fenólica que sirve de materia prima en el procedimiento de la invención puede ser obtenida por cualquier procedimiento de funcionalización (alquilación, metilación, etc.) conocido per se, a partir de cualquier fuente de lignina fenólica disponible, que sea comercial o bien extraída de residuos industriales ricos en lignina.

[0071] Como fuente de lignina fenólica, se puede usar las ligninas descritas a continuación, y preferentemente la lignina Kraft (por ejemplo resultante del licor negro), opcionalmente purificada, o bien la lignina de bagazo de caña de azúcar, o cualquier otra lignina industrial.

[0072] Las ligninas utilizables en el contexto de la presente invención se describen en concreto en Lignins and Lignans: Advances in Chemistry, Cyril Heitne, John Schmidt, CRC Press, Taylor&Francis Group, 2010.

[0073] Ventajosamente, la lignina ha sido sometida a un pretratamiento con el fin de hacerla soluble en medio acuoso.

[0074] Como lignina fenólica, se puede usar lignina Kraft, por ejemplo extraída de licor negro.

[0075] Las ligninas Kraft (también denominadas tioligninas) son compuestos hidrosolubles resultantes de la producción industrial de la pasta para papel por uso de iones sulfato.

[0076] La lignina Kraft utilizable en el procedimiento de la invención se obtiene normalmente por extracción de licor negro, que es el licor de cocción resultante de la fabricación de papel Kraft. Se trata de una solución acuosa compuesta por residuos de lignina y hemicelulosa disuelta de la pasta para papel, así como otros compuestos químicos inorgánicos (sales disueltas).

[0077] La purificación del licor negro se lleva a cabo normalmente de la siguiente manera. Se acidifica el licor negro para precipitar la lignina. El sólido obtenido se centrifuga, aísla y extrae con etanol. Las fracciones líquidas se recuperan y se concentran por evaporación de etanol. El residuo se lava con una solución ácida para eliminar las sales residuales. De esta forma se obtiene lignina Kraft.

[0078] La lignina Kraft extraída del licor negro se puede purificar adicionalmente de la siguiente manera para eliminar las impurezas (normalmente compuestos monofenoles y residuos de degradación). Se pone en presencia la lignina Kraft con tetrahidrofurano, se filtra la mezcla obtenida para eliminar el sólido, se concentra el filtrado por evaporación del disolvente, acto seguido se lava el sólido obtenido con dietiléter para eliminar las impurezas orgánicas, tales como compuestos monofenoles (vainillina, ácido vanílico, etc.) y residuos de degradación. El sólido recuperado se seca para dar la lignina Kraft purificada.

[0079] Como lignina fenólica, también se puede usar la lignina resultante del bagazo de la caña de azúcar.

[0080] El bagazo de la caña de azúcar es el residuo fibroso de la caña de azúcar obtenido después de la extracción del jugo. Constituye un desecho importante de la industria del azúcar, que no se valora suficientemente. La lignina de bagazo de caña de azúcar está disponible comercialmente (Solvay).

[0081] También se puede usar una fuente de lignina industrial o mezclas de compuestos que comprenden ligninas, normalmente mezclas de biomasa que comprenden lignina y otros constituyentes, tales como celulosa y/o hemicelulosa, o incluso una mezcla de ligninas Kraft.

[0082] La lignina usada en el procedimiento de la invención presenta normalmente una masa molecular promedio en masa (M_{li9}) comprendida entre 1.000 y 10.000 g/mol, preferentemente entre 1.000 y 5.000 g/mol.

[0083] La masa molecular promedio en masa de lignina de partida (M_{li9}) representa la media de las masas molares ponderada por la masa de cada tamaño de lignina, y tiene como fórmula:

$$M_{lig} = \frac{\sum_j n_j M_j^2}{\sum_j n_j M_j}$$

en la que n_j designa el número de moléculas de lignina de tamaño j y Mj designa la masa molecular de una lignina de tamaño j.

[0084] Este valor se indica normalmente por el proveedor de lignina o bien puede ser determinado por una medida de cromatografía de exclusión estérica, como se ha descrito anteriormente.

[0085] Las etapas del procedimiento de la invención se describirán a continuación.

Etapa de oxidación con lacasas

[0086] La primera etapa del procedimiento de la invención consiste en poner en presencia, en al menos un disolvente, lignina no fenólica tal como se describe anteriormente, una lacasa, un mediador redox y una fuente de oxígeno.

[0087] Esta etapa conduce a la oxidación de la lignina no fenólica por la acción del sistema lacasa/mediador en presencia de una fuente de oxígeno, con lo que se obtiene una mezcla que comprende lignina no fenólica oxidada.

[0088] Por “lignina no fenólica oxidada”, se entiende una lignina no fenólica, como se ha definido anteriormente, en la que las funciones hidroxilo en posición bencílica se han convertido selectivamente en funciones cetona.

[0089] Durante esta etapa, la lignina no fenólica no está esencialmente despolimerizada, es decir, que esta etapa no afecta (o afecta muy poco) a la estructura polimérica de la lignina, en particular no rompe (o rompe pocos) enlaces C-C.

Lacasa

[0090] Las lacasas (EC 1.10.3.2) son una familia de enzimas que se encuentra en muchas plantas, hongos y microorganismos.

[0091] *In vivo,* las lacasas tienen una actividad oxidante y actúan como un catalizador en un procedimiento de oxidación enzimática.

[0092] Las lacasas utilizables en el procedimiento de la invención se pueden derivar de plantas, hongos o microorganismos. Las lacasas procedentes de hongos incluyen en concreto las lacasas de los géneros *Aspergillus, Neurospora* (por ejemplo *Crassa Neurospora), Podospora, Botrytis, Collybia, Fomes, Lentinus, Pleurotus, Trametes* (por ejemplo *Trametes villosa* y *Trametes versicolor), Rhizoctonia* (por ejemplo *Rhizoctonia solani), Coprinus* (por ejemplo *Coprinus cinereus, Coprinus comatus, Coprinus friesii* y *Coprinus plicatilis), Psathyrella* (por ejemplo *Psathyrella condelleana), Panaeolus* (por ejemplo *Panaeolus papilionaceus), Myceliophthora* (por ejemplo *Myceliophthora thermophila), Schytalidium* (por ejemplo *Schytalidium thermophilum), Polyporus* (por ejemplo *Polyporuspinsitus), Phlebia* (por ejemplo *Radiata phlebia), Pycnoporus* (por ejemplo *Pycnoporus cinnabarinus)* o *Coriolus* (por ejemplo *Coriolus hirsutus).* Las lacasas procedentes de bacterias son por ejemplo procedentes de *Bacillus.*

[0093] Preferentemente, se usa una lacasa procedente de *Trametes versicolor,* comercializada por Sigma Aldrich.

[0094] La relación de la cantidad de lacasa en presencia (en mg) en la cantidad inicial de lignina no fenólica presente en el medio de reacción (en gramos) está comprendida generalmente entre 0,1/1 y 5/1.

[0095] En el contexto de su uso *in vitro,* para la oxidación de un sustrato constituido por moléculas voluminosas (normalmente de masa molecular superior a 5.000 g/mol), las lacasas son generalmente asociadas a un “mediador redox”, que es un compuesto químico de pequeño tamaño (normalmente de masa molecular inferior a 1.000 g/mol) que actúa como un producto intermedio redox entre las moléculas de lacasas y las moléculas del sustrato a oxidar. Los mediadores redox se describen en concreto en Bourbonnais R. Appl. Enviro Microbiol. 1995, 61, 1876-1880.

[0096] Los mediadores redox también se designan como agentes de transferencia de electrones ya que facilitan la transferencia electrónica entre las lacasas y el sustrato a oxidar.

[0097] El principio de la mediación redox es una tecnología conocida en sí.

[0098] En el contexto del tratamiento de la lignina con lacasas, en ausencia de un mediador redox, las interacciones químicas entre las lacasas, que son proteínas de gran tamaño, y las moléculas de lignina, que son polímeros de gran tamaño, serán desfavorecidas. Se añade así un mediador redox para acelerar el procedimiento de oxidación enzimática catalizado con lacasas.

[0099] La relación de la cantidad de mediador redox puesta en presencia (en mmol) en la cantidad de lacasa puesta en presencia (en mg) se comprende generalmente entre 1/1 y 1/50.

[0100] Preferentemente, el mediador redox implementado según el procedimiento de la invención es el ácido 2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).

[0101] Este mediador es particularmente adaptado para la oxidación de lignina con lacasas.

[0102] A diferencia de otros mediadores redox, tales como hidroxibenzotriazol (HOBt) que se degrada rápidamente en presencia de la lacasa al perder su actividad de mediador (HOBt se convierte en HBT por la pérdida del átomo de oxígeno), el ABTS presenta una mejor actividad como mediador redox.

[0103] Los mediadores redox también pueden ser adecuados para la implementación de la invención: ácido violúrico, ácido hidroxiantranílico, TEMPO, N-hidroxiftalimida (Chakar y col. Can. J. Chem. 82: 344-352 (2004)).

Fuente de oxígeno

[0104] Por “fuente de oxígeno”, se entiende un reactivo apto para regenerar (reoxidar) los sitios activos de la lacasa que participan en el contexto del procedimiento de oxidación enzimática mencionado anteriormente, que proporciona *in fine* lignina no fenólica oxidada a partir de lignina no fenólica. Por “oxígeno”, se entiende aquí el dioxígeno (O_2).

[0105] Preferentemente, la fuente de oxígeno es un gas que comprende oxígeno, tal como aire u oxígeno puro.

[0106] Como fuente de oxígeno, se puede mencionar oxígeno puro (O_2), que se pone en presencia, por burbujeo a presión atmosférica o bajo una presión de algunos bars, en el medio de reacción que comprende, al principio de la etapa de oxidación, lignina no fenólica, una lacasa, un mediador redox y al menos un disolvente. Así, se consigue saturar ventajosamente el medio de reacción en oxígeno disuelto.

[0107] Como fuente de oxígeno, también se puede mencionar aire o cualquier mezcla de gas enriquecida en oxígeno.

[0108] Por “puesta en presencia de una fuente de oxígeno”, se entiende la introducción de dicha fuente de oxígeno en el medio de reacción del procedimiento de la invención. Dicha puesta en presencia puede llevarse a cabo de forma ocasional o prolongada, preferentemente prolongada, siendo el objetivo perseguido saturar el medio de reacción con oxígeno disuelto.

[0109] Alternativamente, se puede usar, en lugar de la fuente de oxígeno, cualquier oxidante apto para regenerar (reoxidar) los sitios activos de la lacasa que participan en el procedimiento de oxidación enzimática descrito anteriormente.

[0110] La primera etapa del procedimiento se lleva a cabo ventajosamente en condiciones de pH y de temperatura apropiadas para la reactividad de la lacasa usada, es decir, en condiciones de pH y de temperatura que no desnaturalizan las propiedades de la lacasa.

[0111] Preferentemente, la primera etapa del procedimiento de la invención se lleva a cabo en medio ácido, normalmente en un tampón a pH = 4.

[0112] Preferentemente, la primera etapa del procedimiento de la invención se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 20 ºC y 60 ºC, preferentemente alrededor de 40 ºC.

[0113] Estas condiciones son particularmente adecuadas para la implementación de la lacasa procedente de *Trametes versicolor.*

[0114] Se podrán adoptar las condiciones óptimas de pH y de temperatura óptimas asociadas al tipo de lacasa usado, siendo estas condiciones generalmente conocidas por una lacasa dada.

[0115] La primera etapa del procedimiento según la invención se lleva a cabo en presencia de al menos un disolvente.

[0116] Según una realización, el disolvente es una mezcla que comprende agua y un disolvente orgánico polar.

[0117] Preferentemente, el disolvente es una mezcla que comprende una solución tampón de pH ácido (normalmente con pH = 4) y un disolvente orgánico polar.

[0118] El uso de dicha mezcla como disolvente tiene la ventaja de solubilizar la lignina no fenólica así como el conjunto de reactivos puestos en presencia. De este modo, se obtiene una mezcla de reacción homogénea, en la que las interacciones químicas se ven facilitadas.

[0119] Según esta realización, el disolvente comprende preferentemente entre 30 % y 70 % en volumen de agua, ventajosamente entre 40 % y 60 %, con respecto al volumen total de disolvente.

[0120] El complemento de disolvente está normalmente constituido por un disolvente orgánico polar, preferentemente lo suficientemente volátil para ser separado de los productos de despolimerización por evaporación, opcionalmente a presión reducida.

[0121] El disolvente es normalmente una mezcla de agua para solubilizar la lacasa y un éter apto para solubilizar la lignina no fenólica, como dioxano. Una mezcla de dioxano/agua (1/1) se puede utilizar normalmente.

[0122] La primera etapa se lleva a cabo según una dilución de tal manera que para 1 g de lignina no fenólica, se usa un volumen de disolvente comprendido de 10 ml a 100 ml, preferentemente de 30 ml a 70 ml, normalmente de 50 ml.

[0123] El experto en la materia será capaz de adaptar la dilución del medio de reacción en función de la solubilidad de la lignina no fenólica de partida, de la temperatura de la reacción y/o de la viscosidad del medio de reacción.

Etapa de despolimerización

[0124] Los inventores han descubierto que poniendo en presencia la lignina no fenólica oxidada resultante de la primera etapa del procedimiento de la invención con un agente oxidante, se lograría depolimerizar de manera eficaz la estructura de lignina para obtener productos de despolimerización de lignina.

[0125] Por “agente oxidante”, se entiende una sustancia apta para oxidar las especies presentes en el medio

de reacción. Preferentemente, el agente oxidante es nucleófilo.

[0126] Como agente oxidante nucleófilo, se pueden mencionar los peróxidos, como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peróxido de benzoilo, o bien compuestos tales como O_3, $KMnO_4$ y $NaIO_4$, o incluso cualquier oxidante nucleófilo usado habitualmente en química orgánica.

[0127] El agente oxidante es preferentemente peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

[0128] El peróxido de hidrógeno estás disponible normalmente en forma de una solución acuosa al 35 % másico, lo que equivale a una concentración molar de aproximadamente 10 M.

[0129] Preferentemente, en general, cuando el agente oxidante es peróxido de hidrógeno, la relación de la cantidad de agente oxidante puesta en presencia (en mol) en la cantidad de lignina no fenólica oxidada presente en el medio de reacción (en gramos) se comprende entre 0,01/1 y 0,02/1.

[0130] La segunda etapa del procedimiento tiene lugar preferentemente en un medio básico, en concreto cuando el agente oxidante es peróxido de hidrógeno. Así, cuando la primera etapa del procedimiento tuvo lugar en un medio de pH neutro o ácido, entonces es necesario pasar a un medio básico, y ello, preferentemente antes de poner en presencia el agente oxidante. Para pasar a un medio básico se puede usar cualquier procedimiento conocido per se, como la adición de una solución acuosa básica, normalmente carbonato de sodio, en el medio de reacción.

Implementación del procedimiento

[0131] Una implementación típica del procedimiento de la invención se describirá a continuación.

[0132] Las etapas del procedimiento se implementan normalmente una tras otra en el mismo reactor.

[0133] Alternativamente, se pueden llevar a cabo dos etapas de manera separada, en dos reactores distintos.

[0134] Según una realización particular, en un reactor provisto de un sistema de calentamiento, de un medio de agitación, y opcionalmente, de un sistema refrigerante, se introduce la lignina no fenólica y una parte del disolvente y se agitan hasta una disolución completa. Se añade acto seguido una solución de mediador redox en una parte del disolvente, después se añade una solución de lacasa en el resto del disolvente.

[0135] Se pone a continuación en presencia la fuente de oxígeno, preferentemente de forma continua, normalmente por burbujeo en el medio de reacción cuando la fuente de oxígeno es gaseosa.

[0136] La temperatura de la mezcla se mantiene normalmente entre 20 ºC y 60 ºC, preferentemente alrededor de 40 ºC, hasta alcanzar la oxidación total de la lignina no fenólica. En esta fase, finaliza la primera etapa del procedimiento.

[0137] A continuación se puede recuperar la lignina no fenólica oxidada.

[0138] Alternativamente, se puede continuar ventajosamente el procedimiento al llevar a cabo la segunda etapa en el mismo reactor. Según este modo, se puede colocar en un pH básico al basificar, en caso necesario, el medio de reacción.

[0139] Después se puede añadir el agente oxidante de manera preferentemente continua, normalmente gota a gota, cuando el agente oxidante es una solución.

[0140] La temperatura de la mezcla se mantiene normalmente superior a 70 ºC, normalmente alrededor de 90 ºC.

[0141] El progreso de la reacción es seguido por SEC (cromatografía por exclusión estérica).

[0142] Se prosigue la agitación y el calentamiento del medio de reacción hasta obtener el grado deseado de despolimerización.

[0143] Una vez finalizada la despolimerización, los productos de despolimerización de la lignina pueden ser recuperados, usando las técnicas de purificación convencionales en el campo, a saber, la filtración, la extracción, la destilación y/o la separación por cromatografía. En concreto, el disolvente puede ser retirado por evaporación, opcionalmente a presión reducida.

[0144] El procedimiento de la invención se ilustrará ahora por medio de ejemplos y de ejemplos comparativos.

EJEMPLOS

Reactivos

[0145] Licor negro (proporcionado por SMURFIT Kappa)
Dimetilsulfato (comercializado por Sigma Aldrich)
Lignina de bagazo de caña de azúcar (proporcionada por SOLVAY) ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (comercializado por Sigma Aldrich)
Lacasa de *Trametes versicolor* (comercializada por Sigma Aldrich)
Tampón de acetato (pH = 4; 50 mM)
Peróxido de hidrógeno (35 %) (comercializado por Sigma Aldrich)

Ejemplo 1 - Extracción de lignina Kraft a partir de licor negro

[0146] La lignina Kraft ha sido extraída del licor de cocción (comercializada por SMURFIT KAPPA) con un tratamiento ácido, para hacerla precipitar. Un post-tratamiento con etanol permite eliminar las sales de sodio residuales.

[0147] Se disuelve 800 g de licor negro en 2 l de agua destilada y la mezcla se acidifica lentamente (de pH = 13 a pH = 1,5) por medio de una solución de HCl 6N. La mezcla se centrifuga a 4.000 rpm durante 10 minutos, el residuo de transferencia se recupera y se trata de nuevo con una solución de HCl a pH = 1,5 y de nuevo se vuelve a centrifugar (repetir 3 veces con HCl con pH = 1,3). Se añade después etanol al sólido obtenido. Tras la filtración, la fase de etanol se evapora y el residuo se lava con una solución de HCl a pH = 1,5 para eliminar las sales residuales. Tras la centrifugación, el residuo de transferencia se recupera y se liofiliza. De esta forma se obtienen 180 g de lignina Kraft.

[0148] De los 180 g de lignina Kraft así obtenidos, se extraen 10 g que se disuelven en 200 ml de tetrahidrofurano (THF). Tras la agitación durante 30 minutos bajo ultrasonidos, la mezcla se filtra para eliminar el depósito sólido blanco, insoluble en THF. Tras la evaporación del THF, se obtienen 9,2 g de un sólido marrón. Este sólido marrón se disuelve en 100 ml de dietiléter (Et_2O). Una fracción permanece insoluble Et_2O (8,1 g) y la fracción soluble (0,9 g) se analiza por GC-MS tras sililación con el fin de volver volátiles a los compuestos.

[0149] Este análisis pone de manifiesto la presencia de monofenoles como la vainillina o el ácido vanílico y los residuos de la degradación de azúcares. La fracción insoluble se compone de lignina Kraft purificada, que puede ser usada posteriormente para la metilación y el procedimiento de despolimerización de la presente invención.

Ejemplo 2A - Metilación de lignina Kraft

[0150] Se disuelve 1 g de lignina Kraft en 20 ml de una solución de NaOH a 0,7 M (0,56 g) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 10 minutos, después se añaden lentamente 0,8 ml de dimetilsulfato ($(MeO)_2SO_2$). La agitación continuó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calienta después a 80 ºC durante 4 horas, al añadir una solución de NaOH a 0,7 M para homogeneizar el medio de reacción (aproximadamente se añaden 10 ml de NaOH a 0,7 M adicionales). Después de 4 horas de reacción, la mezcla se enfría a una temperatura ambiente y se acidifica con una solución de HCl 2 M hasta pH = 2. El bruto de reacción se filtra y el sólido obtenido se lava con agua destilada y se seca por liofilización. De esta forma se obtienen 0,874 g de lignina Kraft.

Ejemplo 2B - Metilación de lignina de bagazo de caña de azúcar

[0151] La lignina de bagazo de caña de azúcar fue proporcionada por SOLVAY y usada sin pretratamiento previo.

[0152] La lignina de bagazo es tratada en las condiciones descritas en el Ejemplo 2A. De esta forma se obtienen 0,92 g de lignina metilada.

Ejemplo 3A - Despolimerización de lignina metilada (procedente de lignina Kraft)

[0153] Se disuelve 1 g de lignina metilada obtenida en el Ejemplo 2A en 25 ml de dioxano y la mezcla se agita a temperatura ambiente hasta disolución completa.

[0154] Luego, se prepara una solución de 51 mg de ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzothiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (0,1 mmol) en 1 ml de tampón acetato (pH = 4; 50 mM), que se añade a la solución de lignina metilada.

[0155] Se prepara a continuación una solución de 5 mg de lacasa en 200 ml de tampón de acetato, se extraen 24 ml de esta solución que se añade lentamente al medio que contiene la lignina metilada a 40 ºC. Tras la adición de lacasa, se introduce oxígeno gaseoso en la mezcla por burbujeo durante 1 hora a 40 ºC, usando un balón lleno de

oxígeno.

[0156] Después de 22 horas de reacción a 40 ºC, se añade 1 ml de una solución de NaOH 3 M, luego se añade lentamente 1 ml de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno (35 %, 10 mmol), siendo la mezcla agitada a 90 ºC.

[0157] El progreso de la reacción es seguido por SEC (cromatografía por exclusión estérica). El análisis por SEC se realiza usando tres columnas de tipo TSK-gel (3000 PW, 4000 PW, 3000 PW) acoplados en serie, con hidróxido de sodio 1 M hasta un pH = 12 y NaN_3 (3 %) en agua osmotizada como eluyente. El caudal es de 1 ml/min y la detección se realiza por UV a una longitud de onda de 280 nm.

[0158] La primera etapa de la reacción (acción del sistema lacasa/ABTS) conduce a una baja despolimerización. La segunda etapa (acción del peróxido de hidrógeno) conduce a una fuerte despolimerización, con la formación de moléculas de baja masa molecular que se ha aislado e identificado.

[0159] Después de 40 horas de reacción, la mezcla se lleva a pH = 6-7 con una solución de HCl 1 N y el bruto de reacción se extrae con diclorometano (3x50 ml). Tras el secado de la fase orgánica sobre sulfato de sodio (Na_2SO_4) y la evaporación de los disolventes volátiles, se purifica el bruto por cromatografía ultrarrápida (con eluyente:diclorometano/metanol 99/1 a 90/10).

[0160] También se aislaron 30 mg de ácido 3,4-dimetoxibenzoico a partir de 1 g de lignina metilada obtenida en el Ejemplo 2A.

Ejemplo comparativo 1

[0161] A modo de comparación, la lignina Kraft purificada obtenida en el Ejemplo 1 se sometió a la acción del sistema lacasa/ABTS, al aplicar directamente las condiciones de reacción descritas en el Ejemplo 3A (es decir, sin llevar a cabo una metilación de la lignina).

[0162] El progreso de la reacción es seguido por SEC (condiciones descritas anteriormente):

t (horas)	M_p	M_n	M_w
0	661	902	1326
2	842	1254	1662
73	905	1036	1821
M_p: pico de peso molecular, en g/mol M_n: masa molecular promedio en número, en g/mol M_w: masa molecular promedio en masa, en g/mol			

[0163] Se observa que la masa molecular promedio de las especies en presencia aumenta con la duración de reacción.

[0164] De este modo, cuando la acción del sistema lacasa/ABTS se realiza en la lignina kraft no metilada, no se observa despolimerización alguna, sino más bien un aumento en la masa molecular de la lignina.

Ejemplo 3B - Despolimerización de lignina metilada (procedente de lignina de bagazo)

[0165] La lignina metilada obtenida en el Ejemplo 2B se trató al aplicar las condiciones de reacción descritas en el Ejemplo 3A (la acción de la lacasa se prolonga durante 65 horas, después de lo cual se añade peróxido de hidrógeno).

[0166] El progreso de la reacción es seguido por SEC (condiciones descritas anteriormente):

t (horas)	Mp	Mn	M_w
0	5054	1414	10245
2	4806	759	8681
65	3555	269	6857
70	2443	1601	4907
80	1525	130	2112

[0167] La primera etapa de la reacción (lacasa/ABTS) conduce a una baja despolimerización. La segunda etapa (adición del peróxido de hidrógeno en t = 65 h) conduce a la despolimerización con la producción de fenoles de baja masa molecular que no se han aislado e identificado.

Ejemplo comparativo 2

[0168] A modo de comparación, la lignina de bagazo se sometió a la acción del sistema lacasa/ABTS, al aplicar directamente las condiciones de reacción descritas en el Ejemplo 3A (es decir, sin llevar a cabo una metilación de la lignina).

[0169] El progreso de la reacción es seguido por SEC (condiciones descritas anteriormente):

t (horas)	M_p	M_n	M_w
0	2254	145	4957
1	4048	417	8245
24	9242	4282	17329

[0170] Se observa que la masa molecular promedio de las especies en presencia aumenta con la duración de reacción.

[0171] De este modo, cuando la acción del sistema lacasa/ABTS se realiza en la lignina de bagazo no metilada, no se observa despolimerización alguna, sino más bien un aumento en la masa molecular de la lignina.

Ejemplo comparativo 3

[0172] A modo de comparación, la lignina metilada obtenida en el Ejemplo 2B se sometió a la acción de peróxido de hidrógeno en un medio básico, sin someterla previamente a la acción del sistema lacasa/ABTS.

[0173] Se disuelve 1 g de lignina metilada obtenida en el Ejemplo 2B en 25 ml de dioxano y la mezcla se agita a temperatura ambiente hasta disolución completa.

[0174] Luego, se añaden a la mezcla 25 ml de agua osmotizada.

[0175] Se añade 1 ml de una solución de NaOH 3 M, luego se añade lentamente 1 ml de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno (35 %, 10 mmol), siendo la mezcla agitada a 90 ºC.

[0176] El progreso de la reacción es seguido por SEC (condiciones descritas anteriormente):

t (horas)	M_p	M_n	M_w
0	5054	1414	10245
5	2541	404	4651
15	2394	153	4725

[0177] Se observa una despolimerización de la lignina metilada menos significativa que cuando es tratada de antemano por la acción del sistema lacasa/ABTS.

[0178] Sin desear quedar ligado a una teoría particular, esta despolimerización parcial se explica por el hecho de que, en la lignina (y por ende en la lignina metilada), un determinado porcentaje de funciones hidroxilo destinadas a ser oxidadas por la puesta en presencia del sistema lacasa/mediador ya se encuentran en el estado oxidado, es decir, en forma de cetonas. La ruptura oxidante de los enlaces C-C en la proximidad de estas funciones cetonas provoca una despolimerización parcial.

[0179] Este ejemplo muestra, sin embargo, que la primera etapa del procedimiento es necesaria para optimizar la acción despolimerizante del peróxido de hidrógeno.

[0180] El análisis comparativo de las ligninas de bagazo obtenidas al final de los Ejemplos 2B, 3B, y al final del Ejemplo comparativo 3 pone de manifiesto que la fragmentación de la lignina es más eficaz cuando la lignina metilada se somete sucesivamente a la acción del sistema lacasa/ABTS y luego a la acción del peróxido de hidrógeno:

Lignina del Ejemplo 2B, no despolimerizada	M_{li9} = 10245
Lignina del Ejemplo 3B, tratada con lacasa + H_2O_2	M_w=2112
Lignina del Ejemplo comparativo 3, tratada con H_2O_2	M_w = 4725

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de despolimerización de lignina, que comprende:

- una etapa de oxidación de lignina no fenólica poniendo en presencia, en al menos un disolvente, lignina no fenólica, lacasa, un mediador redox seleccionado entre el grupo constituido por ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), ácido violúrico, ácido hidroxiantranílico, TEMPO y N-hidroxi-ftalimida, y una fuente de oxígeno, por lo que se obtiene una mezcla que comprende lignina no fenólica oxidada, y
- una etapa de despolimerización de lignina no fenólica oxidada así obtenida, por adición de un agente oxidante nucleófilo,

siendo dicha lignina no fenólica lignina alquilada obtenida a partir de lignina fenólica por funcionalización de funciones fenol de dicha lignina fenólica por alquilos, para dar funciones alcoxi.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la lignina no fenólica es lignina metilada.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que la lignina metilada se obtiene por la puesta en presencia, en una solución acuosa básica, de lignina fenólica y un agente metilante.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el agente metilante es dimetilsulfato.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la fuente de oxígeno es oxígeno puro o aire.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el mediador redox es ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente oxidante es peróxido de hidrógeno.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la etapa de oxidación se realiza en un medio básico.

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la lignina no fenólica es resultante de la funcionalización de funciones fenol de lignina Kraft o de lignina de bagazo de caña de azúcar.