

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 603**

21 Número de solicitud: 201400440

51 Int. Cl.:

C12P 7/10 (2006.01)

C12R 1/185 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

30.05.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.11.2015

Fecha de la concesión:

05.05.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

12.05.2016

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (75.0%)

C/ Ancha, 16

11001 Cádiz (Cádiz) ES y

UNIVERSIDAD DE JAÉN (25.0%)

72 Inventor/es:

ZAAFOURI , Kaouther ;

HAMDI , Moktar ;

FERNÁNDEZ GÜELFO, Luis Alberto;

ÁLVAREZ GALLEGO, Carlos José;

ROMERO GARCÍA, Luis Isidoro;

SÁNCHEZ VILLASCLARAS, Sebastián;

ABOUDI , Kaoutar y

FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ , Juana

54 Título: **Procedimiento para la transformación de los cladodios de cactus Opuntia ficus-indica secos para producir bioetanol de segunda generación**

57 Resumen:

Procedimiento para la transformación de los cladodios de cactus Opuntia ficus-indica secos para producir bioetanol de segunda generación.

La invención se basa en la aplicación de una serie de técnicas de pre-tratamiento mecánico, pre-tratamiento termoquímico ácido, sacarificación y fermentación alcohólica simultánea (SSF) y destilación, con el objetivo de extraer a la vez los azúcares fermentables de la matriz lignocelulósica de los cladodios de cactus y a continuación convertirlos a bioetanol de segunda generación.

La invención permite la valorización de los cladodios de cactus Opuntia ficus-indica como un recurso de biomasa lignocelulósica no alimentaria, abundante y no explotada, para el desarrollo de biocombustibles de segunda generación como energía renovable y limpia, para afrontar el agotamiento notable de los recursos en energías fósiles.

ES 2 552 603 B2

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la transformación de los cladodios de cactus *Opuntia ficus-indica* secos para producir bioetanol de segunda generación.

SECTOR DE LA TÉCNICA

- 5 La presente invención forma parte del desarrollo de biocombustibles a partir de la biomasa lignocelulósica no alimentaria para hacer frente al agotamiento de los recursos de la energía fósil.

ESTADO DE LA TÉCNICA

- 10 El notable agotamiento de los recursos energéticos fósiles y el coste que estos suponen, así como las exigencias reglamentarias del desarrollo sostenible, son los principales argumentos a favor del desarrollo de este invento.

Las bio-refinerías son las principales productoras de energías renovables produciendo metano, hidrógeno, bioetanol y biodiesel (Lens, 2005). Por otro lado,
15 la biomasa lignocelulósica constituye un sustrato adecuado, seguro, abundante y con un gran potencial para las biorrefinerías (Kumar et al., 2009).

Las plantas verdes producen aproximadamente 170 Gtonelada de biomasa seca/año donde 10 Gtoneladas/año serán explotadas con fines energéticos en el horizonte 2050 (que representa el 15% de la demanda energética mundial total)
20 (Lens, 2005). Entre los recursos de biomasa lignocelulósica podemos citar: los residuos y co-productos agrícolas (bagazo de la caña de azúcar, tallo de algodón, la paja de trigo, la paja de arroz, la madera....etc.), los residuos agro-industriales, el compost, los residuos sólidos urbanos y los cultivos energéticos no-alimentarios que producen 300 millones de toneladas de biomasa seca por año (Lens, 2005).

- 25 A pesar del espectacular desarrollo de los cultivos del cactus en Túnez, la explotación de esta especie queda restringida a la producción y la comercialización de tunas. Los cladodios que constituyen la mayor parte de la especie en biomasa son muy poco explotados a pesar de su composición química

rica en nutrientes. *Opuntia* es una planta suculenta con tejidos que permiten el almacenamiento del agua lo que convierte a *Opuntia* en la planta más eficaz para la conversión del agua en materia seca con respecto a otras plantas grasas. Así, algunas especies de *Opuntia* producen 26 toneladas de MS/hectárea/año.

- 5 De la misma manera, se ha estimado la cantidad de biomasa producida por los cladodios y los frutos de cactus en los climas áridos, semi-áridos así como los suelos de regadío. La especie *Opuntia ficus-indica* cultivada en condiciones optimas, asegura una producción anual de biomasa que puede exceder las 30 toneladas de MS/hectárea/año según se muestra en la Tabla 1 (Hamdi, 2006).
- 10 **Tabla 1:** La producción teórica de la biomasa de cactus en función de las condiciones bioclimáticas (Hamdi, 2006).

Clima	Regiones		
	Árida	Semi- árida	Regadío
		<i>Materia vegetal</i>	
Talla (m x m)	4 x 4	2 x 2	2 x 1
Plantas/hectárea	625	2500	5000
		Biomasa (toneladas/hectárea)	
Cladodios	2,63	10,5	21
Frutos	0,79	3,15	6,3

- Por otro lado, la especie *Opuntia* presenta la tasa de producción de biomasa más elevada de las plantas invasoras en Túnez. Además, la producción de biomasa del cactus aumenta todavía más, a pesar del aumento atroz y perjudicial de las concentraciones de CO₂ atmosférico. De este modo, el desarrollo del cactus puede llegar a frenar el efecto invernadero (Florian et al., 2005). Por tanto, los cladodios de cactus pueden servir como soporte natural para la captura y secuestro de dióxido de carbono.
- 15
- 20 Hasta la fecha, las patentes relativas a la producción de bioetanol de segunda generación a partir de la biomasa lignocelulósica principalmente emplean los siguientes sustratos:

- El bagazo de la caña de azúcar (US 2010/ 0330638 A1. Dec.30, 2010) ;
- Los residuos agrícolas: madera dura y blanda, residuos forestales, lodos de la industria papelera, residuos sólidos industriales y municipales, diferentes plantas herbáceas (la paja, el maíz, el sorgo, el trigo, la cebada, el arroz, la soja) (WO 2011/ 137150 A1. Nov.03, 2011) (WO 2011/ 137147 A1. Nov.03, 2011) ;
- El pino, el roble y algunas plantas perennes (WO 2011/ 136616 A2. Nov.03, 2011).

10 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN.

El objetivo principal de la presente invención es la transformación de los cladodios de cactus secos «*Opuntia ficus-indica*» mediante la aplicación de los pre-tratamientos termoquímicos y sacarificación enzimática para extraer los azúcares fermentables y así producir bioetanol de segunda generación mediante la fermentación alcohólica. Esta invención permite por una parte valorizar exclusivamente los recursos de biomasa lignocelulósica disponible y no explotada y por otra parte, contribuye en el desarrollo de biocarburante de segunda generación como fuente de energía renovable limpia.

El sector de las energías renovables podrá beneficiarse de las ventajas notables de esta invención en el plan del desarrollo de los biocarburantes y favorecer así la independencia energética de las energías fósiles. De este modo, el agotamiento notable de los recursos en energías fósiles y las exigencias dictadas para el desarrollo sostenible son los principales argumentos a favor de esta invención.

Los cultivos de *Opuntia spp.*, extendidos por todos los países mediterráneos, y específicamente en Túnez, representan un recurso renovable importante de la biomasa lignocelulósica no alimentaria, que está disponible e inexplorado (En algunos casos se utiliza como alimento de animales).

Cabe destacar que los cladodios de cactus son sustratos ricos en materia orgánica seca compuesta principalmente por carbohidratos (Nefzaoui, et al., 2002), lo que justifica su utilización para producir bioetanol.

La invención tal y como se detalla posteriormente, está basada en la aplicación de una serie de técnicas de pre-tratamiento mecánico (etapa 1), pre-tratamiento 5 termoquímico ácido (etapa 2), sacarificación y fermentación alcohólica simultánea (SSF) (etapa 3) y destilación (etapa 4), con el objetivo de extraer a la vez los azúcares fermentables de la matriz lignocelulósica de los cladodios de cactus y convertirlos a bioetanol de segunda generación. A continuación se describe brevemente cada etapa: 10

Etapa 1.- Pre-tratamiento mecánico de trituración, para reducir el tamaño de las fibras a un diámetro medio de las partículas de 1 mm. Esta etapa tiene como objetivo disminuir el grado de polimerización de la celulosa y de la lignina y aumentar la superficie de contacto, y por tanto, la accesibilidad de la celulosa y la 15 hemicelulosa a los diferentes reactivos.

Etapa 2.- Pre-tratamiento termoquímico ácido en atmósfera inerte en presencia de N₂, a una temperatura de 175 °C, una presión de 5 bares, una concentración del ácido sulfúrico H₂SO₄ de 0,06 % (m/v), durante un tiempo de contacto de 75 minutos. Esta etapa tiene como objetivo la hidrólisis de la fracción hemicelulósica 20 de la biomasa de los cladodios de cactus secos y así poner la fracción celulósica más accesible a la digestión enzimática ulterior.

Etapa 3.- Sacarificación y fermentación simultánea (SSF) mediante el empleo de una mezcla enzimática, con las actividades endocelulasa y exocelulasa (β -glucosidasa) así como las actividades xilanasas, e inoculando las levaduras 25 *Saccharomyces cerevisiae* y *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 para convertir los disacáridos (sacarosa) y los monosacáridos fermentables en C6 (glucosa, fructosa..) y en C5 (principalmente xilosa) procedentes de la digestión enzimática simultánea de la fracción celulósica del pretratamiento termoquímico ácido.

Etapa 4.- Destilación (separación líquida/vapor) para aumentar el contenido en alcohol del mosto obtenido.

DESCRIPCIÓN DEL CONTENIDO DE LAS FIGURAS

5 **Figura 1.-** Representa un diagrama detallado de las etapas del procedimiento de la transformación de las fibras de cactus para la producción del bioetanol de segunda generación.

Figura 2.-Representa la curva relativa a la isoterma de adsorción de las fibras de cactus secos, permitiendo el estudio del comportramiento de estas fibras con respecto al agua, calculando la cantidad máxima de la adsorción del agua por las
10 fibras de cactus.

Figura 3.- Representa la cinética de la sacarificación de la suspensión de fibras de cactus al 10% en materia seca en presencia de 100 mg/g de la enzima Cellic®Cetc2 diluida 10 veces.

15 **Figura 4.** Micrografías fotónicas (3X) de las fibras de los cladodios de cactus secos brutos (a) y trituradas (b).

Figura 5. Micrografías Electrónica de Barridos, MEB, de las fibras de los cladodios de cactus secos (370 X) (c) y sus poros (1500 X) (d).

20 **MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION**

La estrategia experimental adoptada en esta invención tiene como objetivo operar en condiciones óptimas y favorables, con la aplicación de pre-tratamientos que favorezcan la hidrólisis de las fracciones lignocelulósica difíciles de biodegradar y menos asimilables por un proceso de tratamiento biológico.

25 El procedimiento para la transformación de los cladodios de cactus secos *Opuntia ficus-indica* mediante el pre-tratamiento mecánico y termoquímico ácido, así como la saccarificación y la fermentación simultanea (SSF), seguida de una etapa

de destilación, con el objetivo de obtener el bioetanol de segunda generación esta ilustrado en la Figura 1.

A continuación se detalla el procedimiento aplicado a las muestras de cladodios secos de cactus procedentes de la bioclimática árida de Túnez.

5

Ensayo 1. Pre-tratamiento mecánico y caracterización fisicoquímica y estructural de las fibras de cactus.

El pre-tratamiento mecánico empleado consistió en la trituración, mediante un molino de martillo tipo (Leshan Dongchuan Machinery Co. Ltd Sichuan, China).

10 El estudio estructural de las fibras lignocelulósicas crudas de la biomasa vegetal, previamente trituradas, se realizó mediante la observación microscópica fotónica y electrónica de barrido MEB. Las Figuras 4 y 5 muestran la estructura fibrosa de los cladodios de cactus secos. Las micrografías electrónicas han puesto en evidencia la uniformidad de la superficie porosa de las fibras de cactus con un
15 diámetro de poro de 10 μm aproximadamente.

La caracterización fisicoquímica de los cladodios secos de cactus ha permitido determinar la materia seca contenida en los residuos, la densidad de la fibra, el volumen de inflado de las fibras dentro del agua así que la capacidad de retención del agua y del aceite. Estas características se encuentran recogidas en la Tabla 2.

20 **Tabla 2.** Características físico-químicas de los cladodios de cactus.

Características físico-químicas	Valores
Materia seca (%)	96,122 \pm 1,482
Contenido en cenizas (%)	8,568 \pm 0,326
Contenido en agua (%)	3,878 \pm 1,482
Densidad de partículas de las fibras con respecto al iso-butanol	2,688 \pm 0,056
Volumen de hinchazón de las fibras en el agua (mL/g)	2,649 \pm 0,158
Capacidad de retención del agua (g de agua/ g MS)	2,157 \pm 0,769
Capacidad de retención del aceite (aceite de girasol) (ml de aceite/MS)	4,978 \pm 0,117
Contenido en proteínas (%)	2,155 \pm 0,158

El estudio del comportamiento de las muestras de cactus secos con respecto al agua se efectuó estableciendo isotermas de adsorción del vapor de agua a 20°C (Figura 2).

- 5 El diagrama de absorción del agua permite el seguimiento de la hidratación de las fibras de cactus en función de la actividad del agua en el medio. El contenido máximo de agua que permite fijar las fibras de cactus es del orden del 15,36% (g/100g MS).

10 La composición en α -celulosa, hemicelulosa, lignina, carbono orgánico total (COT), carbono inorgánico (C ing), carbono total (C tot) y nitrógeno total (N tot) de los cladodios secos de cactus se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición en α -celulosa, hemicelulosa, lignina, carbono orgánico total (COT), carbono inorgánico (C ing), carbono total (C tot) y nitrógeno total (N tot) de los cladodios secos.

Componente	Valor (%)
α -Celulosa	50
Hemicelulosa	18
Lignina	27
COT	6,206 \pm 0,001
C ing	0,451 \pm 0,008
C tot	6,705 \pm 0,173
N tot	1,878 \pm 0,041

15

En efecto el contenido en holocelulosa y en lignina de los cladodios de cactus secos confirma la naturaleza lignocelulósica de las muestras de cactus seco.

Ensayo 2. Pre-tratamiento termoquímico ácido de las fibras de cactus.

Una vez trituradas con un molino de martillos (Leshan Dongchuan Machinery Co. Ltd Sichuan. China) y caracterizadas exhaustivamente, las fibras de cactus seco fueron pre-tratadas mediante un pre-tratamiento termoquímico ácido utilizando un reactor a presión (Parr®, series 4600-4620) de un litro de volumen útil, equipado de válvulas de control de presión y temperatura; la regulación de la presión se hace mediante una válvula neumática con un compresor auxiliar.

El reactor a presión utilizado en esta etapa de pre-tratamiento es de tipo 'batch', sin agitación. Este reactor se llenó al 10% de su capacidad total con una suspensión de fibras al 10% en sólidos totales. Para generar un ambiente inerte dentro del reactor se empleó nitrógeno a una presión fija.

Las condiciones empleadas para el pretratamiento termoquímico ácido de las fibras secas del cactus empleadas fueron de una presión de 5 bares, 175°C de temperatura, con la adición del ácido sulfurico H₂SO₄ a una concentración del 0,06% y un tiempo de reacción de 75 minutos.

El análisis de la composición de las fibras de cactus después del pre-tratamiento termoquímico está presentado en la Tabla 4.

Tabla 4. Análisis de la composición de las fibras de cactus antes y después del pre-tratamiento termoquímico.

<i>Componente</i>	<i>Antes del pre-tratamiento</i>	<i>Después del pre-tratamiento</i>
Carbono total soluble (%)	6,705	11,85
Xilosa (%)	0,577	5,350
Glucosa (%)	0	0,360
Fructosa (%)	0	0,539
Sacarosa (%)	0	0,107
Acidez volátil total (%)	0	0,50
Hidroxi-metil-furfural (%)	0	0
α-Celulosa (%)	50,00	55,17
Hemicelulosa (%)	18,00	1,82
Lignina (%)	27,00	15,36
Cenizas (%)	8,24	7,90

El contenido en carbono total soluble (orgánico y inorgánico) se determinó mediante un equipo automático de carbono y nitrógeno (multi N/C3100 analyzer de Analytic Jena) utilizando una fase mobile de H₃PO₄ al 10%. El contenido en azúcares se ha determinado mediante un kit enzimático. La acidez volátil total
5 (expresada por gramos de ácido acético por cada 100g de muestra) ha sido determinada mediante un cromatógrafo de gases de Shimadzu GC2010. Los ácidos grasos volátiles de cadena corta determinados son el acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, isocaproico, caproico y heptanoico. El contenido en hidroximetilfurfural (HMF) se determinó por cromatografía
10 gaseosa.

Ensayo 3. Sacarificación enzimática de las fibras de cactus pre-tratadas.

A continuación se realizó un estudio de la sacarificación enzimática de las fibras de cactus secos pre-tratados. Esta hidrólisis enzimática se realizó preparando
15 suspensiones de fibras de cactus al 10% en materia seca con una concentración de la enzimas comercial Cellic®Cetc2 de 100 mg/g, diluida 10 veces a un pH de 4,8 y a una temperatura de 50 ± 1°C con una velocidad de agitación de 150 rpm mediante microincubadores. La duración de la sacarificación enzimática fue de 72 horas.

20 La Cellic®Cetc2 es una preparación enzimática de la marca Novozymes, con una concentración en proteínas totales de 217 g/L, una actividad de papel filtro de 120,5 FPU/mL y una actividad β-glucosidasa de 2731 U/mL.

El análisis de los azúcares por cromatografía gaseosa permitió estudiar la cinética de la sacarificación enzimática, igualmente, el contenido en glucosa ha sido
25 determinado con una técnica enzimática. Así, la Figura 3 muestra con detalles la cinética de la sacarificación enzimática de las fibras de cactus pre-tratadas.

Con este ensayo de sacarificación se alcanzó un rendimiento de glucosa de 19,10 % ± 0,530. y una materia seca residual de 5,50 % ± 0,36.

La composición en azúcares de las fracciones líquidas de la materia hidrolizada realizada mediante cromatografía gaseosa se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición en azúcares liberados durante la sacarificación enzimática de las fibras pre-tratadas del cactus seco, determinadas mediante cromatografía gaseosa.

Hidrólisis del Cactus al 10% en materia seca y 100 mg/g de enzima							
Exp.	Celobiosa	Lactosa	Glucosa	Xilosa	Galactosa	Arabinosa	Manosa
Patrón 24 h			0,093				
Patrón 48 h		0,319	0,079	0,082			
Patrón 72 h	0,47		0,144				
Muestra 24 h	10,027	0,681	9,237	2,602			
Muestra 48 h	8,233		8,318	2,268			
Muestra 72 h	8,07	0,825	8,936	2,458			

*Los contenidos en azúcares están expresados en g/L. Las concentraciones están determinadas después de 72 horas de hidrólisis.

Ensayo 4. Sacarificación y fermentación simultanea (SSF) de las fibras de cactus pre-tratadas termoquímicamente en medio ácido con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la enzima Cellic®Cetc2.

El objetivo de esta etapa es mejorar la eficacia del procedimiento, particularmente con respecto a la variable tiempo de reacción y de la concentración final en etanol. Para ello se preparó una suspensión de fibras de cactus al 14% en materia seca preparada con el tampón acetato de sodio a 50 mM a un pH de 4,82 con el 3% de la disolución de cloranfenicol al 0,2% preparada en el tampón de acetato para evitar contaminaciones bacterianas a lo largo de la reacción.

De la misma manera, se añadió al medio de la SSF una suspensión de la enzima Cellic®Cetc2 a 100 mg/g, diluida 10 veces a razón de 0,70 v/v con respecto al volumen total de la reacción. El medio de la reacción fue inoculado al 10% con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* procedente de un medio de cultivo líquido sintético de 20 g/L de azúcares a pH de 4,2. La composición de este medio de cultivo consta de extracto de levadura (4,00 g/L), peptona de caseína (3,60 g/L), (NH₄)₂SO₄ (3,00 g/L), MgSO₄ 7H₂O (2,05 g/L), KH₂PO₄ (2,00 g/L), xilosa (5 g/L); glucosa (10 g/L), fructosa (2,5 g/L), y sacarosa (2,5 g/L). Para favorecer el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* durante la SSF se añadió un medio de

cultivo líquido sintético concentrado 25 veces con una concentración de 0,025 v/v con respecto al volumen total. Este medio de cultivo concentrado tiene la composición siguiente: Extracto de levadura (50 g/L), peptona de caseína (45 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (37,5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (25,625 g/L), y KH_2PO_4 (25 g/L); todos los reactivos se ajustaron a un pH de 4,28.

La SSF se desarrolló en un microincubador operando a una temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ con agitación fija a 150 rpm durante 120 horas (5 días).

La producción de etanol obtenida al final del proceso de SSF se analizó mediante cromatografía gaseosa (GC) y usando un kit enzimático (Böehringer Mannheim, Cat. n° 176290) adaptado que permite calcular el rendimiento final de la conversión de glucosa a etanol. El rendimiento obtenido fue del 75% con respecto al rendimiento de conversión teórica. La concentración final obtenida en etanol ha sido de 0,5 g/L.

15 Ensayo 5. Sacarificación y fermentación simultánea (SSF) de las fibras de cactus pre-tratadas termoquímicamente en medio ácido mediante un cultivo de dos levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691) y la enzima Cellic®Cetc2

En este ensayo se probó la posibilidad de convertir a la vez los diferentes azúcares en C6 (glucosa y fructosa) y en C5 (xilosa), así como los disacáridos (sacarosa) producidos durante la digestión enzimática. Este objetivo se alcanzó mediante el empleo de un cultivo mixto de dos levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* y *Pachysolen tannophilus* durante la SSF.

Para alcanzar el objetivo, se elaboró un protocolo experimental del establecimiento de la SSF similar al que está descrito previamente en el ejemplo 4, sobre el que se aplicaron las modificaciones siguientes: el medio de reacción fue inoculado al 10% con el cultivo mixto de las dos levaduras *Pachysolen tannophilus* y *Saccharomyces cerevisiae* con una proporción de 46% y de 54% respectivamente provenientes de pre-cultivos diferentes.

La determinación de la concentración final del etanol producido se determinó por cromatografía gaseosa (GC) y con el kit enzimático adaptado, siendo esta concentración próxima a 0,7 g/L.

5 **Ensayo 6. Destilación**

El objetivo de esta última etapa de destilación es aumentar la concentración de etanol en el producto final de la fermentación. La etapa de destilación consta en una separación líquido-vapor de los componentes de la mezcla obtenida en la etapa anterior mediante una sucesión de vaporización y condensación llevando la
10 mezcla a ebullición (o vaporización) del etanol, cuyo punto de ebullición a 1 atm es de 78,2 °C.

APLICACIÓN INDUSTRIAL

Los sectores industriales que pueden beneficiarse de este invento son:

- 15 ▪ Las empresas que operan en el campo de los biocombustibles, energías renovables o en general toda empresa biotecnológica.
- Las refinerías que quieren desarrollar una línea de energías nuevas y limpias.
- Todas las industrias que tratan los residuos ricos en fracciones
20 lignocelulósicas, fracciones celulósicas (industria pastero-papelera) o fracciones de polisacáridos (industria de almidón).
- Cualquier empresa de servicio de recogida de residuos agrícolas, forestales, o residuos sólidos urbanos, etc....

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la transformación de los cladodios de cactus *Opuntia ficus-indica* secos para producir bioetanol de segunda generación, que comprende la realización de las siguientes etapas:
- 10 a) Pre-tratamiento mecánico de trituración de las fibras, para reducir su tamaño a un diametro medio de particulas de 1 mm.
- b) Pre-tratameinto termoquímico ácido realizado en atmósfera inerte en presencia de N₂, a una temperatura de 175 °C, una presión de 5 bares, una concentración de ácido sulfúrico de 0,06% (m/v) y durante un tiempo de contacto de 75 minutos.
- 15 c) Sacarificación y fermentación simultánea (SSF) mediante el empleo de una mezcla enzimática, con las actividades endocelulasa y exocelulasa (β -glucosidasa) asi como las actividades xilanasas, e inoculando las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pachysolen-tannophilus* ATCC 32691 para convertir los disacaridos (sacarosa) y los monosacaridos fermentables en C6 (glucosa, fructosa..) y en C5 (principalmente xilosa) procedentes de la digestión enzimática simultánea de la fracción celulósica del pretratamiento
- 20 termoquímico ácido (etapa b).
- d) Destilación (separación líquida/vapor) para aumentar el contenido en alcohol del mosto obtenido.
- 25 2. Procedimiento para la transformación de los cladodios de cactus *Opuntia ficus-indica* secos para producir bioetanol de segunda generación, según reivindicación 1, caracterizado porque el pre-tratamiento termoquímico ácido se realiza en un reactor a presión tipo 'batch' sin agitación, lleno al 10% de su capacidad total con una suspensión de fibras al 10% en materia seca, con las siguientes condiciones de funcionamiento: presión de 5 bares,

- 5
175°C de temperatura, con empleo de ácido sulfurico H₂SO₄ a una concentración de 0,06% y un tiempo de reacción de 75 minutos en atmósfera inerte en presencia de nitrógeno gas.
- 10
3. Procedimiento para la transformación de los cladodios de cactus *Opuntia ficus-indica* secos para producir bioetanol de segunda generación, según reivindicación 1, caracterizado porque la concentración de fibras de cactus empleada en la etapa de sacarificación y fermentación simultanea es del 14% en materia seca con el tampón acetato de sodio a 50 Mm a un pH 4,82 con el 3% de una disolución de cloranfenicol al 0,2% preparada en el tampón acetato.
- 15
4. Procedimiento para la transformación de los cladodios de cactus *Opuntia ficus indica* secos para producir bioetanol de segunda generación, según las reivindicaciones número 1 y 3, caracterizado porque en la etapa de sacarificación y fermentación simultánea a las fibras de *cactus* se añade una suspensión de la enzima Cellic®Cetc2 a 100 mg/g, diluida 10 veces a razón de 0,70 v/v respecto al volumen total de la reacción.
- 20
5. Procedimiento para la transformación de los cladodios de cactus *Opuntia ficus indica* secos para producir bioetanol de segunda generación, según las reivindicaciones de 1, 3 y 4, caracterizado porque al medio de la reacción se inocula al 10% con un cultivo mixto de dos levaduras con proporciones del 46% y 54%, respectivamente, de *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 y de *Saccharomyces cerevisiae* a un pH de 4,2.
- 25

- 5 6. Procedimiento para la transformación de los cladodios de cactus *Opuntia ficus indica* secos para producir bioetanol de segunda generación, según la reivindicación 5, caracterizado porque la composición del medio de cultivo líquido sintético que contiene las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 es de un extracto de levadura (4,00 g/L), peptona de caseína (3,60 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3,00 g/L);
- 10 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,05 g/L), KH_2PO_4 (2,00 g/L), xilosa (5 g/L), glucosa (10 g/L), fructosa (2,5 g/L), y sacarosa (2,5 g/L).
- 15 7. Procedimiento para la transformación de los cladodios de cactus *Opuntia ficus indica* secos para producir bioetanol de segunda generación, según la reivindicación 6, caracterizado porque, para favorecer el crecimiento de las levaduras *S. cerevisiae* y *P. tannophilus* durante la SSF, se añade un medio de cultivo líquido sintético concentrado 25 veces con una concentración de 0,025 v/v respecto al volumen total con la siguiente composición: extracto de levadura (50 g/L), peptona de caseína (45 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (37,5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (25,625 g/L), y KH_2PO_4 (25 g/L); el
- 20 medio se ajusta a un pH de 4,82.
- 25 8. Procedimiento para la transformación de de los cladodios de cactus *Opuntia ficus-indica* secos para producir bioetanol de segunda generación, según las reivindicaciones de 1 a 7, caracterizado porque la etapa de sacarificación y fermentación simultánea se realiza en un agitador operando a una temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ con agitación fija a 150 rpm durante 120 horas (5 días).

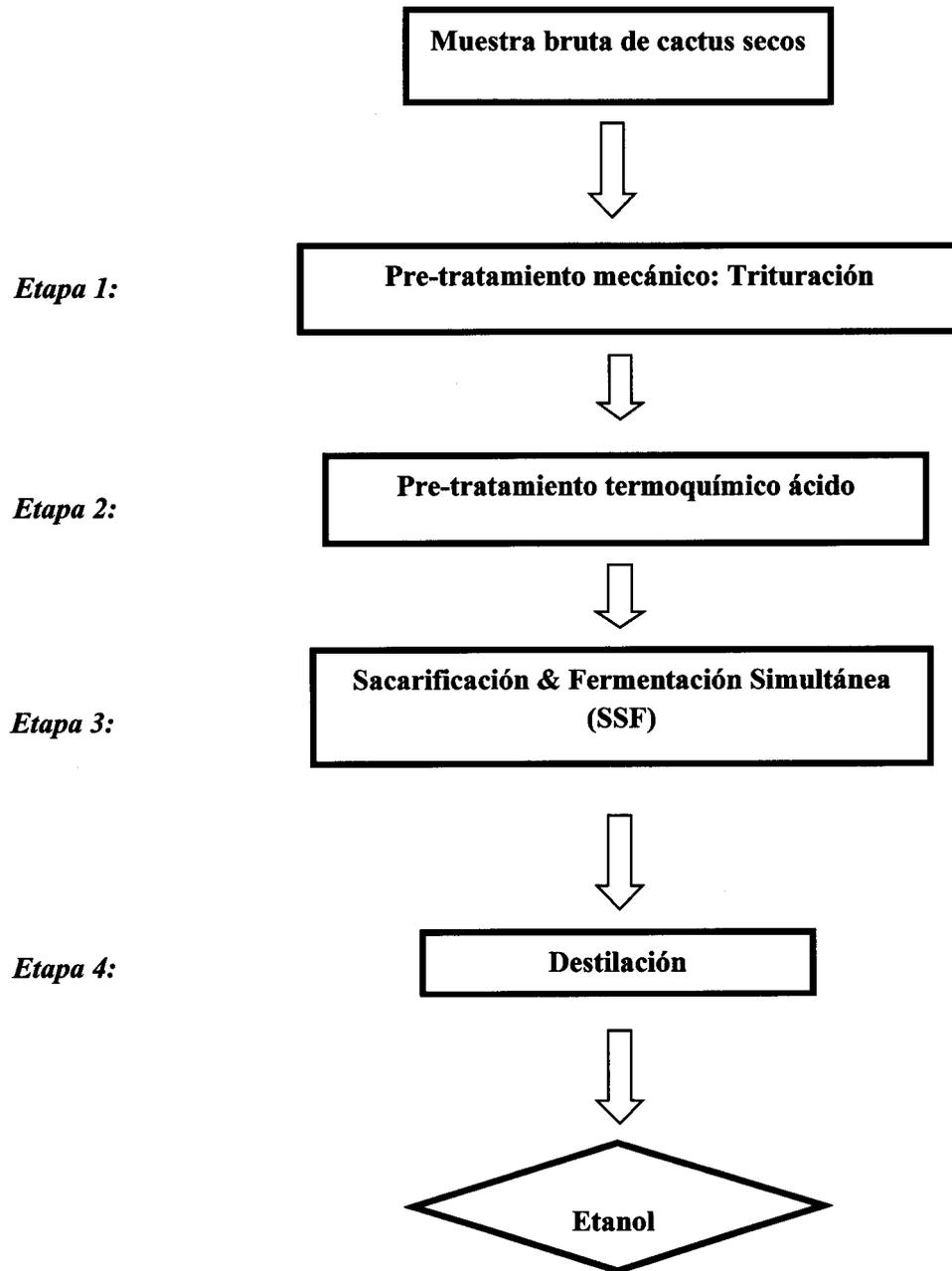


Figura 1

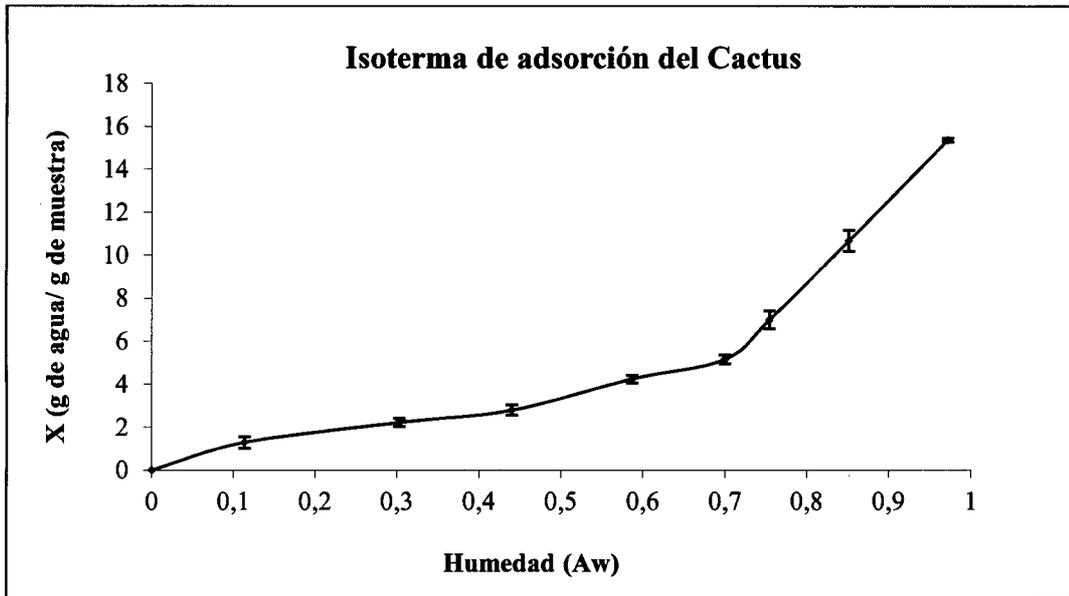


Figura 2

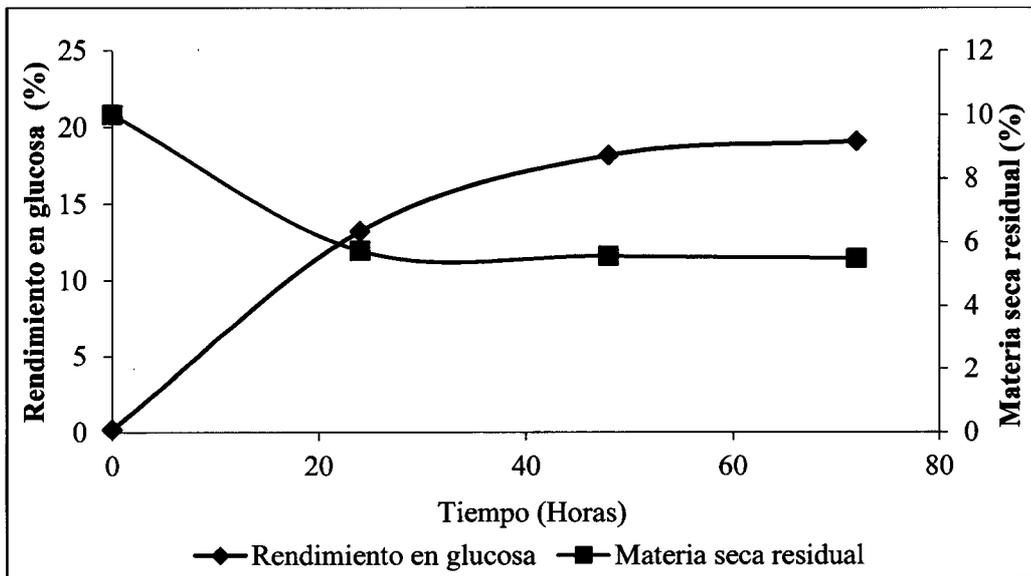
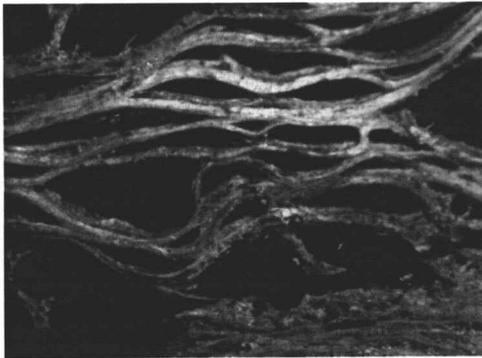


Figura 3

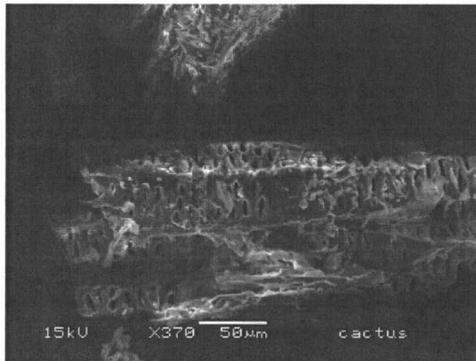


(a)

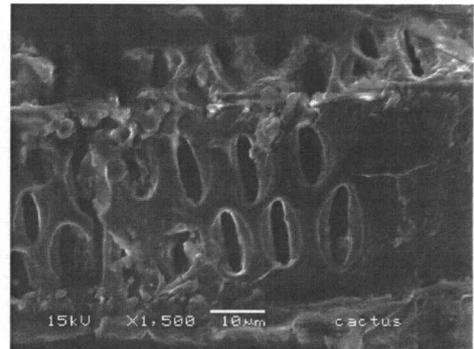


(b)

Figura 4



(c)



(d)

Figura 5



- ① N.º solicitud: 201400440
② Fecha de presentación de la solicitud: 30.05.2014
③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: **C12P7/10** (2006.01)
C12R1/185 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RETAMAL, N., DURAN, J. M., FERNANDEZ, J. Ethanol production by fermentation of fruits and cladodes of prickly pear cactus [<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Miller]. J. Sci. Food Agric., 1987; vol. 40, nº 3, páginas 213-218. ISSN 0022-5142. Doi: 10.1002/jsfa.2740400304	1,5
A	PILAVTEPE, M; CELIKTAS, M S; SARGIN S, YESIL-CELIK TAS, O. Transformation of <i>Posidonia oceanica</i> residues to bioethanol. Industrial Crops and Products, 2013; vol. 51, páginas 348-354. ISSN: 0926-6690 Doi: 10.1016/j.indcrop.2013.09.020	2,4-8
A	KUMAR P, BARRET D M, DELWICHE M J, STROEVE P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. Ind. Eng. Chem. Res., 2009; vol. 48, nº 8, páginas 3713-3729. Doi: 10.1021/ie801542g	1,2,5
A	ALVIRA P, TOMAS-PEJÓ E, BALLESTERO M, NEGRO M J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresource Technology, 2010; vol. 101, nº 13, páginas 4851-4861. ISSN 0960-8524. Doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.093	1,2
A	YE SUN, JIAYANG CHENG. Hydrolysis of Lignocellulosic materials for ethanol production: A review. Bioresource Technology, 2002; vol. 83, nº 1, páginas 1-11. ISSN 0960-8524. Doi: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7	1,2
A	WO 2009102609 A1 (UNIVERSITY LOUISIANA STATE) 20.08.2009, página 3, [0007]; página 6, [0017]-[0021],[0023],[0024]; página 13, [0037].	1,2

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
20.01.2015

Examinador
A. Sukhwani

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, X-FULL, NPL, CAPLUS, ENERGY, PASCAL, SCISEARCH

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.01.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1 - 8	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1 - 8	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

La presente invención tiene por objeto un procedimiento para la transformación de los cladodios de cactus *Opuntia ficus-indica* para producir bioetanol de segunda generación que comprende las etapas (reivindicación 1):

- Pre-tratamiento mecánico de trituración de fibras para reducirlas a partículas de 1 mm.
- Pre-tratamiento termoquímico ácido en atmósfera inerte de N₂ a 175°C, presión de 5 bares con ácido sulfúrico de 0,06% m/v, durante 75 minutos,
- Sacarificación y fermentación simultánea (SSF) mediante el empleo de una mezcla enzimática, inoculando levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pachysolen tannophilus*,
- Destilación

El pre-tratamiento termoquímico ácido se realiza en un reactor a presión de 5 bares a 175°C con ácido sulfúrico de 0,06% m/v, durante 75 minutos (reiv. 2) y la concentración de fibras de cactus en la etapa c) es de 14% en materia seca con tampón de acetato de sodio con el 3% de una disolución de cloranfenicol al 0,2% preparada en el tampón acetato (reiv. 3).

Simultáneamente se añade una suspensión de la enzima CellicCetc2 a 100 mg/g (reiv. 4) y al medio de la reacción se inocula al 10% con un cultivo mixto de dos levaduras con proporciones del 46% y 54%, respectivamente, de *Pachysolen tannophilus* y *Saccharomyces cerevisiae* (reiv. 5). La composición de este medio de cultivo es de un extracto de levadura, peptona de caseína, etc. (reiv. 6), al que se le puede añadir un medio de cultivo líquido sintético concentrado para favorecer el crecimiento de las levaduras (reiv. 7).

Por último, la etapa de sacarificación y fermentación simultánea se realiza en un agitador a appx. 35°C con agitación fija a 150 rpm durante 120 horas (5 días) (reiv. 8).

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	RETAMAL, N., DURAN, J. M., FERNANDEZ, J. Ethanol production by fermentation of fruits and cladodes of prickly pear cactus [<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Miller]. J. Sci. Food Agric., 1987; vol. 40, nº 3, páginas 213-218.	1987
D02	PILAVTEPE, M; CELIKTAS, M S; SARGIN S, YESIL-CELIK TAS, O. Transformation of <i>Posidonia oceanica</i> residues to bioethanol. Industrial Crops and Products, 2013; vol. 51, páginas 348-354.	2013
D03	KUMAR, P, BARRET, D M, DELWICHE, M J, STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. Ind. Eng. Chem. Res., 2009; vol. 48, nº 8, páginas 3713-3729.	2009
D04	ALVIRA P, TOMAS-PEJÓ E, BALLESTERO M, NEGRO M J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresource Technology, 2010; vol. 101, nº 13, páginas 4851-4861.	2010
D05	YE SUN, JIAYANG CHENG. Hydrolysis of Lignocellulosic materials for ethanol production: A review. Bioresource Technology, 2002; vol. 83, nº 1, páginas 1-11.	2002
D06	WO 2009102609 A1 (UNIVERSITY LOUISIANA STATE)	20.08.2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

NOVEDAD

Los documentos citados **D01** a **D06** se refieren a la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica siendo el más relevante **D01** porque utiliza cladodios de la misma especie. En efecto:

- **D01** divulga la producción de etanol por fermentación de frutos y cladodios de *Opuntia ficus-indica* tras un tratamiento de molido, seguido de hidrólisis: a) con celulasa y b) con CIH para proseguir con una fermentación alcohólica con *Saccharomyces cerevisiae* (página 214, 216), las condiciones reivindicadas del pre-tratamiento con ácido sulfúrico y cultivo mixto de levaduras para la transformación de cladodios, difieren mucho de las divulgadas en **D01** por lo que este documento no anticipa la invención.

En el documento **D02**, las condiciones son más parecidas pero el sustrato no es la *Opuntia*, así:

- **D02** se refiere a la transformación de residuos de *Posidonia oceanica* en bioetanol con un pre-tratamiento ácido de la biomasa, hidrólisis enzimática con el mismo preparado Cellic CTec2 reivindicado, fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* con la composición del medio de cultivo con extracto de levadura, peptona, etc., en condiciones de agitación de 150 rpm (página 349, párrafos 2.4.1., 2.5.1) y con levaduras como *Pachysolen tannophilus* y *Saccharomyces cerevisiae* (página 352, primera columna, primer párrafo), si bien no divulga un cultivo mixto con ambas levaduras a la vez, ni la atmósfera inerte en presencia de N₂, ni la *Opuntia* como sustrato de partida, tal como lo hace la solicitud en estudio, por lo que se considera un documento del estado de la técnica para las reivindicaciones 2, 4-8.

También son del estado de la técnica los documentos **D03** a **D06** que recogen distintos pre-tratamientos de biomasa lignocelulósica algunos comprenden tratamientos termoquímicos con ácido sulfúrico en condiciones parecidas pero sin que el sustrato de partida sea la *Opuntia ficus-indica* y tampoco utilizan el cultivo mixto de levaduras *Pachysolen tannophilus* y *Saccharomyces cerevisiae*, por lo que ninguno anticipa la invención.

Por ello, a la vista de los documentos D01 a D06, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 8** son nuevas de acuerdo con el Artículo 6 LP 11/86.

ACTIVIDAD INVENTIVA

El procedimiento objeto de la invención para la transformación de los cladodios de *Opuntia ficus-indica* no resulta evidente para el experto en la materia, a la vista de los documentos citados **D01** a **D06**, siendo el más relevante **D01**. En efecto:

- En **D01**, la fermentación parte de *Opuntia ficus-indica* pero en condiciones de pre-tratamiento con CIH y no con sulfúrico, con presión, temperatura y tiempo distintos y sin utilizar el cultivo mixto de levaduras *Pachysolen tannophilus* y *Saccharomyces cerevisiae*.

El resto de los documentos citados utilizan condiciones de pre-tratamiento más parecidas pero no parten de este cactus ni en ninguno se divulga el cultivo mixto de levaduras, por lo que el experto en la técnica no tendría base para elegir este sustrato, las mismas condiciones de pre-tratamiento ni el cultivo mixto reivindicado.

Por ello, a la vista de los documentos D01 a D06, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 8** tienen actividad inventiva según el Artículo 8 LP 11/86.