

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional

14 de agosto de 2014 (14.08.2014) **WIPO | PCT**

(10) Número de Publicación Internacional

WO 2014/122331 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C12P 5/02 (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01) *C12P 13/04* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2013/070064

(22) Fecha de presentación internacional:

6 de febrero de 2013 (06.02.2013)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(71) Solicitantes: **ALGAENERGY, S.A.** [ES/ES]; Avenida de Europa, 19. Parque Empresarial "La Moraleja", E-28108 Alcobendas (Madrid) (ES). **UNIVERSIDAD DE ALMERIA** [ES/ES]; Ctra. De Sacramento, s/n. Edif. Central, planta baja, E-04120 Almería (ES).

(72) Inventores: **ORTIZ MONTOYA, Erika Yuliana**; Avenida de Europa, 19. Parque Empresarial "La Moraleja", E-28108 Alcobendas (Madrid) (ES). **LLAMAS MOYA, Bernardo**; Avenida de Europa, 19. Parque Empresarial "La Moraleja", E-28108 Alcobendas (Madrid) (ES). **MOLINA GRIMA, Emilio**; Ctra. de Sacramento, s/n. Edif. Central, planta baja, E-04120 Almería (ES). **GARCÍA CUADRA, Francisco**; Ctra. de Sacramento, s/n. Edif. Central, planta baja, E-04120 Almería (ES). **FERNANDEZ SEVILLA, José**; Ctra. de Sacramento, s/n. Edif. Central, planta baja, E-04120 Almería (ES). **ACIEN FERNANDEZ, Francisco Gabriel**; Ctra. de Sacramento, s/n. Edif. Central, planta baja, E-04120 Almería (ES).

(74) Mandatario: **MONZÓN DE LA FLOR, Luis Miguel**; C/ Velazquez 109, 2ºD, E-28006 Madrid (ES).

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con reivindicaciones modificadas (Art. 19(1))

(54) Title: METHOD FOR THE VALORISATION OF PHOTOSYNTHETIC MICROORGANISMS FOR INTEGRAL USE OF BIOMASS

(54) Título : PROCESO DE VALORIZACIÓN DE MICROORGANISMOS FOTOSINTETICOS PARA EL APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE LA BIOMASA

(57) Abstract: The invention relates to a method comprising the steps of: introducing a biomass of photosynthetic microorganisms (1) into a stirred tank using cellulolytic enzymes (2) in order to liquefy the sugars (3); separating the resulting mixture using a filtration and/or centrifugation process (4); producing bioethanol by means of the saccharification of the carbohydrates, followed by fermentation with yeast; producing concentrates of peptides and amino acids (10) using proteolytic enzymes (12) in an enzymatic hydrolysis process (11), in which the resulting reaction mixture must be separated using a filtration and/or centrifugation process (13); producing biodiesel by means of the transesterification (17) of the fatty acids present in the biomass with sulphuric acids and methanol; and producing biogas using an anaerobic digestion process (22).

(57) Resumen: Proceso que comprende las etapas de introducción de una biomasa de microorganismos fotosintéticos (1) en un tanque de agitado empleando de enzimas celulolíticas (2) para la licuefacción de los azúcares (3); la mezcla obtenida se separa mediante un proceso de filtración y/o centrifugación (4); una etapa de producción de bioetanol mediante sacarificación de los carbohidratos, seguido de una fermentación con levadura; una etapa de producción de concentrados de péptidos y aminoácidos (10) mediante el empleo de enzima proteolíticas (12) en un proceso de hidrólisis enzimática (11), la mezcla de reacción obtenida se debe separar mediante un proceso de filtración y/o centrifugación (13); una etapa de producción de biodiesel en la que se realiza la transesterificación (17) de los ácidos grasos presentes en la biomasa con ácidos sulfúrico y metanol y una etapa de producción de biogás, mediante un proceso de digestión anaerobia (22).



WO 2014/122331 A1

PROCESO DE VALORIZACIÓN DE MICROORGANISMOS
FOTOSINTÉTICOS PARA EL APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE LA
BIOMASA

5

DESCRIPCIÓN

OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se incluye dentro del campo técnico de la
10 producción de biocombustibles a partir de microorganismos fotosintéticos. En
concreto, se enmarca en el área de la obtención de compuestos de interés
comercial a partir de biomasa producida en sistemas masivos al exterior para
el mercado de biocombustibles.

15 El objeto de la patente consiste en un proceso optimizado de obtención
de productos de interés a partir de microorganismos fotosintéticos que
comprende la secuencia de etapas y sus condiciones óptimas de operación
para maximizar la cantidad y calidad de productos a obtener, consiguiendo un
aprovechamiento integro de la biomasa, todo ello de una forma sostenible y
20 económicamente viable.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las microalgas son organismos de gran utilidad debido a que presentan
25 gran número de aplicaciones beneficiosas en áreas tan diferentes como la
producción de compuestos farmacéuticos y nutracéuticos, la alimentación
humana y animal, el tratamiento de aguas residuales, y la producción de
biocombustibles (Spolaore, et al. 2006). Las ventajas del uso de microalgas
como fuente de biocombustibles son numerosas tales como que los cultivos de
30 microalgas pueden alcanzar productividades muy superiores a los cultivos
tradicionales, dando como resultado una mayor fijación de CO₂ y una mayor
cantidad de biomasa producida. Además, los cultivos de microalgas tienen

menores necesidades de agua y no compiten con los cultivos tradicionales, puesto que no necesitan terreno ni agua fértil. Por último, son una fuente legalmente aceptada de biocombustibles y dada la fijación de CO₂ que conllevan presentan hoy día una de las fuentes mas sostenibles de obtención

5 de biocombustibles de tercera generación (Chisti 2007).

Para producir biocombustibles a partir de microalgas se necesitan sistemas de producción a gran escala, en grandes extensiones de cientos de hectáreas, que den sentido a las inversiones necesarias, además de

10 instalaciones industriales de suficiente envergadura. En la etapa de producción se deben emplear materiales de bajo coste, tecnologías altamente eficientes, y emplearse residuos de otras industrias como CO₂ y efluentes contaminados con nitrógeno y fósforo, para conseguir un proceso sostenible y económicamente viable de producción (Olguín 2012; Pittman, et al. 2011). Sin

15 embargo, cualquiera que sea el proceso de producción instalado es imprescindible además disponer de un proceso de valorización de la biomasa que permita aprovechar por completo la misma y obtener la mayor cantidad posible de productos de calidad contrastada. Solo el aprovechamiento integral de la biomasa y su transformación en productos de valor puede hacer

20 económicamente viable el proceso global de producción + valorización (Acién, et al. 2012; Molina Grima, et al. 2003; Singh, et al. 2011).

Se ha descrito previamente que las microalgas pueden ser utilizadas para producir bioetanol dado su elevado contenido en carbohidratos (Harun

25 and Danquah 2011). Para ello es necesario realizar un proceso de licuefacción de los carbohidratos contenidos en la biomasa, y posteriormente una sacarificación de los mismos para obtener monosacáridos fermentables. Las condiciones propuestas para llevar a cabo este proceso de licuefacción y sacarificación son normalmente extremas, trabajando a pH entre 1 y 3, y

30 temperaturas entre 100 y 250°C (Harun and Danquah 2011). Las condiciones de fermentación con levaduras son mas suaves, y deben adaptarse al óptimo de la levadura empleada, variando entre temperaturas de 20 a 50°C y

pH entre 7 y 9 (Khaw, et al. 2006; Mesa, et al. 2010). El mayor inconveniente de estos procesos es que desaprovechan el resto de compuestos presentes en la biomasa ya que durante la licuefacción y sacarificación se destruyen tanto los lípidos como las proteínas presentes, produciendo intermedios de degradación que pueden resultar tóxicos para los procesos de producción de biogás en condiciones anaerobias.

También se ha descrito que las microalgas se pueden emplear para producir concentrados de aminoácidos (Romero García, et al. 2012). Las microalgas presentan elevados contenidos en proteína, de hasta el 50%p.s., con perfiles de aminoácidos de alto interés por su calidad nutricional (Reboloso Fuentes, et al. 2000; Reboloso-Fuentes, et al. 2001). Los hidrolizados de aminoácidos pueden aplicarse para alimentación humana y animal (Morris 2008), o como biofertilizantes (Ördög, et al. 2004). Pueden obtenerse por vía química o enzimática, siendo recomendable la vía enzimática por mantener las propiedades óptimas de los aminoácidos contenidos en la biomasa. La rotura celular previa y liberación de aminoácidos conlleva la pérdida de carbohidratos por lo que mediante este tipo de procesos no es posible posteriormente producir bioetanol a partir de los carbohidratos contenidos en la biomasa.

En cuanto a la producción de biodiesel, las microalgas se pueden emplear para producir aceites y posteriormente transesterificarlos como se hace habitualmente con aceites vegetales, o alternativamente se puede realizar una transesterificación directa de la biomasa completa (Belarbi, et al. 2000). La extracción de aceites y posterior transesterificación está dificultada por la presencia de agua en la biomasa de microalgas, por lo que se deben emplear disolventes muy polares y condiciones de extracción agresivas, quedando además unos lípidos complejos por la naturaleza polar de la mayor parte de los lípidos contenidos en la biomasa de microalgas. Por otro lado la transesterificación directa se realiza en condiciones de alta temperatura y acidez, a temperaturas entre 100 y 300°C y pH entre 2 y 4, en presencia de metanol y ácido sulfúrico como catalizador, lo que provoca una

desnaturalización completa de todos los compuestos presentes en la biomasa. Al igual que en el caso de la licuefacción y sacarificación de azúcares esto conlleva el no aprovechamiento del resto de compuestos presentes en la biomasa y un posible perjuicio para la producción de biogás por la formación de compuestos tóxicos.

Cualquiera que sea el proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos hay que tener en cuenta las siguientes consideraciones para lograr un máximo rendimiento:

10

- La biomasa de microorganismos fotosintéticos es un material heterogéneo, compuesto de biomasa y agua, ya que los procesos de cosechado disponibles consiguen concentraciones máximas de materia seca del 20-30%, siendo el resto agua.
- 15 • La presencia de agua se puede eliminar mediante operaciones de secado pero esto repercute negativamente, tanto en el consumo de energía como en la viabilidad económica, por el coste asociado al secado. Por tanto los procesos de valorización deben hacerse por vía húmeda.
- 20 • Las células de microorganismos fotosintéticos constan de una pared celular dura que se debe romper para liberar el contenido intracelular y poder obtener los productos de interés. El empleo de productos químicos agresivos o condiciones extremas de presión y temperatura están penalizados ya que reducen la sostenibilidad y viabilidad económica de cualquier proceso.
- 25 • La realización de cualquier proceso de extracción o transformación de los compuestos presentes en la biomasa afecta al resto de compuestos por lo que el rendimiento o calidad de los productos siguientes se verá siempre afectado por los tratamientos a los que se ha sometido previamente a la biomasa.
- 30 • La realización de cualquier proceso de obtención de compuestos a

partir de la biomasa dará siempre lugar a unos residuos, cuya composición y condiciones vendrán determinadas por la secuencia de etapas previas. El aprovechamiento de dicho residuo y su eliminación como un objetivo simultáneo es imprescindible para mejorar la viabilidad completa del proceso desarrollado.

Referencias

- 10 Acién FG, Fernández JM, Magán JJ, Molina E. 2012. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnol Adv* 30:1344-1353
- 15 Belarbi E-, Molina E, Chisti Y. 2000. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Process Biochem* 35:951-969.
- Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25:294-306.
- 20 Harun R, Danquah MK. 2011. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochem* 46:304-309.
- 25 Khaw TS, Katakura Y, Koh J, Kondo A, Ueda M, Shioya S. 2006. Evaluation of performance of different surface-engineered yeast strains for direct ethanol production from raw starch. *Appl Microbiol Biotechnol* 70:573-579.
- 30 Mesa L, González E, Cara C, Ruiz E, Castro E, Mussatto SI. 2010. An approach to optimization of enzymatic hydrolysis from sugarcane bagasse based on organosolv pretreatment. *J Chem Technol Biotechnol* 85:1092-1098.
- 35 Molina Grima E, Belarbi E-, Acién Fernández FG, Robles Medina A, Chisti Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. *Biotechnol Adv* 20:491-515.
- Morris HJ. 2008. Cuba: Protein hydrolysates derived from green microalgae. *Ind. Bioprod* 30:7-14.
- 40 Olguín EJ. 2012. Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. *Biotechnol Adv* 30:1031-1046.
- Ördög V, Stirk WA, Lenobel R, Bancířová M, Strnad M, Van Staden J,

- Szigeti J, Németh L. 2004. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. *J Appl Phycol* 16:309-314.
- 5 Pittman JK, Dean AP, Osundeko O. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresour Technol* 102:17-25.
- 10 Reboloso Fuentes MM, Acién Fernández GG, Sánchez Pérez JA, Guil Guerrero JL. 2000. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chem* 70:345-353.
- 15 Reboloso-Fuentes MM, Navarro-Pérez A, García-Camacho F, Ramos-Miras JJ, Guil-Guerrero JL. 2001. Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis*. *J. Agri Food Chem* 49:2966-2972.
- 20 Romero García JM, Acién Fernández FG, Fernández Sevilla JM. 2012. Development of a process for the production of l-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. *Bioresour Technol* 112:164-170.
- Singh A, Nigam PS, Murphy JD. 2011. Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels. *Bioresour Technol* 102:26-34.
- 25 Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosc Bioeng* 101:87-96.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- 30 La presente invención se refiere a un proceso optimizado de obtención de productos de interés a partir de microorganismos fotosintéticos que comprende la secuencia de etapas y sus condiciones óptimas de operación para maximizar la cantidad y calidad de productos a obtener, consiguiendo un aprovechamiento integro de la biomasa, todo ello de una forma técnicamente
- 35 realizable y escalable, pero sobre todo sostenible y económicamente viable.

El proceso propuesto comprende:

- Una primera etapa de extracción de carbohidratos mediante el empleo de enzimas celulolíticas que rompen la pared celular y
- 40 liberan los carbohidratos solubles, permaneciendo el resto de

- componentes en la biomasa residual. Se consigue con ello la licuefacción de gran parte de los carbohidratos presentes en la biomasa, que servirán como materia prima en procesos posteriores, como por ejemplo ácido láctico o bioetanol. Para ello la mezcla obtenida se debe separar mediante un proceso de filtración y/o centrifugación dando un clarificado rico en carbohidratos y un concentrado conteniendo la biomasa residual.
- 5
- Una etapa de producción de bioetanol a partir del clarificado anterior mediante sacarificación de los carbohidratos en condiciones de acidez ($\text{pH} = 1.5 - 2.5$) y temperatura ($95 - 115^{\circ}\text{C}$) moderados, seguido de una fermentación con levadura del género *Saccharomices*, durante 24 h para transformar los monosacáridos en bioetanol con elevados rendimientos. La levadura se puede recuperar mediante filtración y/o centrifugación para su reutilización, mientras que en la fase líquida quedan contenidos el bioetanol y restos de azúcares sin metabolizar. El bioetanol producido se puede separar por destilación a vacío y posterior desecado mediante tamices moleculares.
- 10
- 15
- Una etapa de producción de concentrados de péptidos y aminoácidos mediante el empleo de enzima proteolíticas que rompen las proteínas, solubilizándolas y transformándolas en péptidos y aminoácidos de menor peso molecular que se pueden emplear en alimentación o como fertilizantes agrícolas de alto valor. El proceso se lleva a cabo a partir de la biomasa residual de la etapa anterior en un tanque agitado a pH y temperatura controlados ($\text{pH} = 7.7 - 8.1$, $T = 40 - 55^{\circ}\text{C}$), durante 4 h, en condiciones suaves y sin emplear productos tóxicos ni condiciones agresivas. La mezcla de reacción obtenida se debe separar mediante un proceso de filtración y/o centrifugación dando un clarificado rico en péptidos-aminoácidos y un concentrado conteniendo la biomasa residual. La solución de aminoácidos - péptidos debe ser estabilizada mediante ajuste a pH ácido o alcalino para evitar su descomposición.
- 20
- 25
- 30

- 5 - Una etapa de producción de biodiesel a partir del concentrado anterior mediante la cual se realiza la transesterificación de los ácidos grasos presentes en la biomasa con ácidos sulfúrico como catalizador y metanol como reactivo, obteniéndose los respectivos ésteres metílicos que constituyen. La reacción se realiza en condiciones suaves sin el previo secado de la biomasa, empleando ácido sulfúrico al 2% y temperatura entre 90 – 110°C, durante 2 h. Transcurrida la reacción el biodiesel se extrae de la mezcla de reacción mediante hexano, el cual se evapora posteriormente para obtener el biodiesel. Del mismo modo el metanol no empleado se retira de la mezcla de reacción mediante destilación a vacío. De esta forma se recuperan ambos disolventes, se minimiza el consumo de los mismos, y se incrementa tanto la sostenibilidad como la viabilidad económica del proceso.
- 10
- 15 - Una etapa de producción de biogás a partir de la mezcla de reacción resultante, exenta de metanol y hexano, mediante la cual la materia carbonosa residual contenida en la misma se transforma en metano, hidrógeno y CO₂ por acción de bacterias metanogénicas. El proceso se realiza en tanques cerrados en condiciones anaerobias a
- 20 temperaturas entre 30-40°C, con un tiempo de residencia de aproximadamente 5-8 días,

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

- 25 El proceso propuesto puede ser realizado en todas o algunas de sus partes pero siempre respetando el orden y las condiciones de operación identificadas como óptimas para maximizar el aprovechamiento de la biomasa y todos sus componentes. La realización o no de una etapa vendrá determinada por la cantidad de compuesto a valorizar presente en la biomasa
- 30 (carbohidratos, proteínas, lípidos) y el interés o valor del producto a obtener (bioetanol, péptidos y aminoácidos, biodiesel, biogás, ácido láctico, ácidos grasos de alto valor). Cabe resaltar sin embargo que la no realización de una

etapa lejos de facilitar las etapas posteriores las dificulta ya que la retirada de los diversos compuestos presentes en la biomasa reduce por un lado la presencia de compuestos que puedan interferir en las reacciones siguientes, y por otro incrementa la riqueza en los productos restantes contenidos en la biomasa, incrementando así el rendimiento de las etapas posteriores.

La realización preferente de la invención se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** En la misma la biomasa de microorganismos fotosintéticos (1) procedente del sistema de cultivo y cosechado es acondicionada para obtener una concentración de materia seca entre el 15-20%. El lodo de microorganismos fotosintéticos disponible se introduce en un tanque agitado donde se ajusta la temperatura a las condiciones óptimas de operación de las enzimas celulolíticas a emplear Celulasa y se añade una cantidad de enzima (2%) (2), dejando actuar durante 2 h. En este tiempo se produce la licuefacción de los azúcares (3), liberándose los carbohidratos contenidos en la biomasa al medio. En función del contenido en carbohidratos de la biomasa la concentración de carbohidratos en el medio puede llegar hasta 60 g/l aunque raramente sobrepasa los 30 g/l. Al cabo de este tiempo de reacción el lodo se retira del tanque agitado y se filtra/centrifuga (4) para separar el clarificado contenido los carbohidratos de la biomasa restante. El clarificado (5) se somete entonces a un proceso de sacarificación mediante tratamiento acido-térmico a pH= 1.5 – 2.5 y T= 95 - 115°C durante 2 h (6). Ello se lleva a cabo en el mismo tanque u otro adicional, con agitación. Al cabo de este tiempo se enfría dicho concentrado hasta 30°C y se ajusta el pH (7), a las condiciones óptimas de operación de la levadura del genero *Saccharomyces*. Una vez estabilizadas las condiciones se añade un 2% de levadura y se deja fermentar con agitación y sin aireación, en condiciones anoxicas durante aproximadamente 24 h. Al cabo de este tiempo los azúcares libres se han transformado en CO₂ y bioetanol (8), quedando la levadura en suspensión. La levadura se puede recuperar mediante filtración/centrifugación y recircularse al proceso de un nuevo lote. El clarificado contiene el bioetanol que se debe recuperar mediante destilación a vacío, (P=10-20 mbar, T=30 -

40°C) obteniéndose un azeótropo que contiene un 4% de agua y 96% de bioetanol. El agua se puede eliminar si es necesario mediante tamices moleculares para su empleo como biocombustible directo en mezcla con gasolinas.

5

En la realización preferente la biomasa resultante (9) tras el proceso de extracción de azúcares se puede emplear para la obtención de concentrados de péptidos y aminoácidos (10). Si no se ha llevado a cabo la etapa anterior igualmente la biomasa se puede emplear directamente para la obtención de concentrados de péptidos y aminoácidos pero en este caso los carbohidratos irán acompañando a dicha solución y no serán valorizados. Para la obtención de concentrados de péptidos y aminoácidos la biomasa húmeda, con entre un 15-20% de materia seca se añade a un tanque agitado dotado de control de pH y temperatura. Se ajusta el pH y la temperatura a las condiciones óptimas de la enzima (12) a utilizar, preferentemente endo y exo-proteasas, de pH= 7.7 – 8.1 y T= 40 - 55°C, en un proceso de hidrólisis enzimática (11). Se añade la primera enzima y a las 2 h se añade la segunda enzima, ambas en la misma cantidad del 2%. El proceso se completa aproximadamente en 4 h tras las cuales la mayor parte de la fracción proteica se ha hidrolizado y los péptidos y aminoácidos resultantes se encuentran disueltos en la fase líquida. Para separarlos la mezcla de reacción se centrifuga (13) quedando un clarificado (14) conteniendo dichos péptidos y aminoácidos (10), y una biomasa residual (15). El clarificado (14) debe ser estabilizado para evitar su rápida descomposición ya que es un caldo de cultivo perfecto para bacterias y levaduras. Para ello lo más sencillo es ajustar el pH del clarificado a valores que no permiten el crecimiento de bacterias y levaduras, obteniéndose buenos resultados tanto a pH ácido como alcalino. No se recomienda estabilizar a valores extremos de pH ya que además de resultar más costoso y peligroso, al tratarse de materiales más corrosivos, los propios péptidos y aminoácidos se pueden desnaturalizar perdiendo parte de sus propiedades.

30

En la realización preferente, tras el proceso de obtención de bioetanol y

concentrados de azúcares, la biomasa residual (15) resultante se puede emplear para producir biodiesel. Si no se han realizado previamente las etapas anteriores la biomasa puede ser igualmente sometida al proceso de producción de biodiesel, si bien el rendimiento del proceso será inferior y la

5 calidad de los productos también, por lo que se recomienda hacer las etapas anteriores y con ello ampliar la cantidad de productos obtenidos de la misma biomasa. Para llevar a cabo este proceso la biomasa húmeda, con un contenido en materia seca del 15-20%, se introduce en un reactor agitado donde se añade ácido sulfúrico como catalizador al 2%, y metanol (16) como

10 reactivo a razón de 1 L por cada litro de biomasa húmeda, se somete la mezcla a un proceso de transesterificación (17). Se calienta la mezcla hasta una temperatura entre 90 - 110°C y se deja reaccionar durante 2 h. Ya que en este caso se trabaja con disolventes orgánicos el reactor a emplear debe ser cerrado y cumplir con las normas ATEX aplicables. Tras este tiempo a la

15 mezcla resultante se le añade hexano y se agita (18) durante 0.5 h para conseguir la transferencia de los esteres metílicos formados de la fase acuosa-metanólica a la fase hexánica. Se retira la fase hexánica y se recupera el hexano mediante destilación a vacío (19) (P=10-20 mbar, T=30-40°C) resultando el biodiesel líquido (20). La fase acuosa-metanólica se debe tratar

20 para recuperar el metanol en exceso añadido, para lo cual se somete también a destilación a vacío (P=10-20 mbar, T=30-40°C) hasta recuperación completa del metanol. De esta forma tanto el metanol como el hexano se recuperan y son recirculados al proceso. Queda de esta forma la biomasa residual (21) en fase líquida, junto con los restos de reacción de todas las etapas anteriores.

25 Dicha biomasa se puede emplear para producir biogás.

En la realización preferente, después de las etapas de producción de bioetanol (8), péptidos-aminoácidos (10) y biodiesel (20), la biomasa residual (21) resultante se somete a un proceso de digestión anaerobia (22) para la

30 producción de biogás (23). Si no se realizan las etapas anteriores la biomasa puede someterse a digestión anaerobia para producir biogás pero el rendimiento del proceso es mas bajo ya que la biomasa no está lo

suficientemente rota, el contenido en nitrógeno es excesivamente alto, y la estructura química de los compuestos presentes es excesivamente compleja para que las bacterias metanogénicas puedan degradar eficientemente la materia orgánica. La producción de biogás se lleva a cabo introduciendo la

5 biomasa húmeda, con un contenido en materia seca del 15-20%, en un digestor anaerobio en continuo, con un tiempo de residencia de entre 5-8 días. El digestor anaerobio es un reactor cerrado que debe estar previamente estabilizado a una temperatura y pH adecuados, sin entrada de aire, y con una flora bacteriana adaptada al sustrato a metabolizar. El biogás formado se

10 extrae por la parte superior del tanque retirándose por la parte inferior el digestato (24), de mínimo volumen y que puede emplearse también como producto fertilizante por su elevado contenido en amonio y fósforo, y baja DQO.

REIVINDICACIONES

1.-Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa caracterizado por que comprende
5 las etapas de:

- Una primera etapa en la que partiendo de una biomasa de microalgas (1) se introduce en un tanque de agitado en la que mediante el empleo de enzimas celulolíticas (2) se produce la
10 licuefacción de los azúcares (3) que rompen la pared celular y liberan los carbohidratos solubles, permaneciendo el resto de componentes en la biomasa residual; la mezcla obtenida se debe separar mediante un proceso de filtración y/o centrifugación (4) dando un clarificado (5) rico en carbohidratos y un concentrado
15 conteniendo la biomasa residual (9).
- Una etapa de producción de bioetanol y otros productos derivados, como el ácido láctico, a partir del clarificado (5) anterior mediante sacarificación (6) de los carbohidratos, seguido de una fermentación
20 alcohólica (7) con levadura para transformar los monosacáridos en bioetanol (8) con elevados rendimientos.
- Una etapa de producción de concentrados de péptidos y aminoácidos (10) mediante el empleo de enzimas proteolíticas (12)
25 que rompen las proteínas, solubilizándolas, en un proceso de hidrólisis enzimática (11), y transformando las proteínas en péptidos y aminoácidos de menor peso molecular que se pueden emplear en alimentación o como fertilizantes agrícolas de alto valor, a continuación la mezcla de reacción obtenida se debe separar
30 mediante un proceso de filtración y/o centrifugación (13) dando un clarificado (14) rico en péptidos-aminoácidos y un concentrado conteniendo la biomasa residual (15).

- 5 - Una etapa de producción de biodiesel a partir del concentrado (15) anterior mediante la cual se realiza la transesterificación (17) de los ácidos grasos presentes en la biomasa con ácido sulfúrico como catalizador y metanol como reactivo (16), obteniéndose los respectivos ésteres metílicos que lo constituyen. Transcurrida la reacción el biodiesel (20) se extrae de la mezcla de reacción mediante hexano (18), el cual se evapora posteriormente para obtener el biodiesel (20).
- 10
- 15 - Una etapa de producción de biogás, en la que la biomasa residual (21) de la etapa anterior se somete a un proceso de digestión anaerobia (22) por acción de bacterias metanogénicas, para la producción de biogás (23) a partir de la mezcla de reacción resultante (21), exenta de metanol y hexano, mediante la cual la materia carbonosa residual contenida en la misma se transforma en metano, hidrógeno y CO₂.
- 20 2.- Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa, según la reivindicación 1 caracterizado por que en la etapa de producción de bioetanol (8) la sacarificación (6) de los carbohidratos se produce en condiciones de acidez en un rango de pH y temperatura moderados (pH= 1.5 – 2.5 T= 95 – 115°C)
- 25 3.- Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa, según la reivindicación 1 ó 2 caracterizado por que la levadura empleada en la fermentación pertenece al género *Saccharomices* y *tiene lugar* durante 24 h.
- 30 4.- Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa, según la reivindicación 1 ó 2 ó 3 caracterizado por que la etapa de fermentación alcohólica (7) empleado en

la etapa de obtención de bioetanol (8) se realiza enfriando el concentrado hasta 30°C y ajustando el pH hasta 8.

5 5.- Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la levadura se recupera mediante filtración y/o centrifugación para su reutilización, mientras que en la fase líquida quedan contenidos el bioetanol y restos de azúcares sin metabolizar.

10

6.- Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa, según la reivindicación 1 caracterizado por que el bioetanol (8) producido se separa por destilación a vacío y posterior desecado mediante tamices moleculares.

15

7.- Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa, según la reivindicación 1 caracterizado por que el proceso de hidrólisis enzimática (11) se lleva a cabo a partir de la biomasa residual (9) en un tanque agitado a pH y temperatura controlados (pH= 7.7 – 8.1 T= 40 – 55°C), durante aproximadamente 4 h, en condiciones suaves y sin emplear productos tóxicos ni condiciones agresivas

20

8.- Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa, según la reivindicación 1 caracterizado por que el concentrado de péptidos y aminoácidos (10) se estabiliza mediante ajuste a pH ácido o alcalino para evitar su descomposición.

25

9.- Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa, según la reivindicación 1 caracterizado por que la transesterificación (17), se realiza en condiciones suaves sin el previo secado de la biomasa, empleando ácido sulfúrico al 2% y temperatura entre 90 – 110°C, durante 2 h

30

10.- Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa, según la reivindicación 1 caracterizado por que en la etapa de obtención del biodiesel (20), el metanol
5 no empleado se retira de la mezcla de reacción mediante destilación a vacío.

11.- Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa, según la reivindicación 1 caracterizado por que el proceso de digestión anaerobia (22) de la etapa de
10 obtención de biogás se realiza en tanques cerrados en condiciones anaerobias a temperaturas entre 30-40°C, con un tiempo de residencia de aproximadamente 5-8 días,

REIVINDICACIONES MODIFICADAS
recibidas por la oficina Internacional el 18 de diciembre de 2013 (18.12.13)

- 5 1.-Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa caracterizado por que comprende las etapas de:
- 10 - Una primera etapa en la que partiendo de una biomasa de microalgas (1) se introduce en un tanque de agitado en la que mediante el empleo de enzimas celulolíticas (2) se produce la licuefacción de los azúcares (3) que rompen la pared celular y liberan los carbohidratos solubles, permaneciendo el resto de componentes en la biomasa residual; la mezcla obtenida se debe
- 15 separar mediante un proceso de filtración y/o centrifugación (4) dando un clarificado (5) rico en carbohidratos y un concentrado conteniendo la biomasa residual (9).
- 20 - Una etapa de producción de bioetanol y otros productos derivados, como el ácido láctico, a partir del clarificado (5) anterior mediante sacarificación (6) de los carbohidratos, seguido de una fermentación alcohólica (7) con levadura para transformar los monosacáridos en bioetanol (8) con elevados rendimientos.
- 25 - Una etapa de producción de concentrados de péptidos y aminoácidos (10) de la biomasa residual (9) mediante el empleo de enzimas proteolíticas (12) que rompen las proteínas, solubilizándolas, en un proceso de hidrólisis enzimática (11), y transformando las proteínas en péptidos y aminoácidos de menor
- 30 peso molecular que se pueden emplear en alimentación o como fertilizantes agrícolas de alto valor, a continuación la mezcla de reacción obtenida se debe separar mediante un proceso de filtración

y/o centrifugación (13) dando un clarificado (14) rico en péptidos-aminoácidos y un concentrado conteniendo la biomasa residual (15).

- 5 - Una etapa de producción de biodiesel a partir del concentrado (15) anterior mediante la cual se realiza la transesterificación (17) de los ácidos grasos presentes en la biomasa con ácido sulfúrico como catalizador y metanol como reactivo (16), obteniéndose los respectivos ésteres metílicos que lo constituyen. Transcurrida la
- 10 reacción el biodiesel (20) se extrae de la mezcla de reacción mediante hexano (18), el cual se evapora posteriormente para obtener el biodiesel (20).
- 15 - Una etapa de producción de biogás, en la que la biomasa residual (21) de la etapa anterior se somete a un proceso de digestión anaerobia (22) por acción de bacterias metanogénicas, para la producción de biogás (23) a partir de la mezcla de reacción resultante (21), exenta de metanol y hexano, mediante la cual la
- 20 materia carbonosa residual contenida en la misma se transforma en metano, hidrógeno y CO₂.

2.- Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa, según la reivindicación 1 caracterizado por que en la etapa de producción de bioetanol (8) la

25 sacarificación (6) de los carbohidratos se produce en condiciones de acidez en un rango de pH y temperatura moderados (pH= 1.5 – 2.5 T= 95 – 115°C)

3.- Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa, según la reivindicación 1 ó 2

30 caracterizado por que la levadura empleada en la fermentación pertenece al género *Saccharomices* y *tiene lugar* durante 24 h.

4.- Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa, según la reivindicación 1 ó 2 ó 3 caracterizado por que la etapa de fermentación alcohólica (7) empleado en la etapa de obtención de bioetanol (8) se realiza enfriando el concentrado
5 hasta 30°C y ajustando el pH hasta 8.

5.- Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la levadura se recupera
10 mediante filtración y/o centrifugación para su reutilización, mientras que en la fase líquida quedan contenidos el bioetanol y restos de azúcares sin metabolizar.

6.- Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa, según la reivindicación 1
15 caracterizado por que el bioetanol (8) producido se separa por destilación a vacío y posterior desecado mediante tamices moleculares.

7.- Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa, según la reivindicación 1
20 caracterizado por que el proceso de hidrólisis enzimática (11) se lleva a cabo a partir de la biomasa residual (9) en un tanque agitado a pH y temperatura controlados ($\text{pH} = 7.7 - 8.1$ $T = 40 - 55^\circ\text{C}$), durante aproximadamente 4 h, en condiciones suaves y sin emplear productos tóxicos ni condiciones agresivas

25

8.- Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa, según la reivindicación 1 caracterizado por que el concentrado de péptidos y aminoácidos (10) se estabiliza mediante ajuste a pH ácido o alcalino para evitar su descomposición.

30

9.- Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa, según la reivindicación 1

caracterizado por que la transesterificación (17), se realiza en condiciones suaves sin el previo secado de la biomasa, empleando ácido sulfúrico al 2% y temperatura entre 90 – 110°C, durante 2 h

- 5 10.- Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa, según la reivindicación 1 caracterizado por que en la etapa de obtención del biodiesel (20), el metanol no empleado se retira de la mezcla de reacción mediante destilación a vacío.
- 10 11.- Proceso de valorización de microorganismos fotosintéticos para el aprovechamiento integral de la biomasa, según la reivindicación 1 caracterizado por que el proceso de digestión anaerobia (22) de la etapa de obtención de biogás se realiza en tanques cerrados en condiciones anaerobias a temperaturas entre 30-40°C, con un tiempo de residencia de
- 15 aproximadamente 5-8 días,

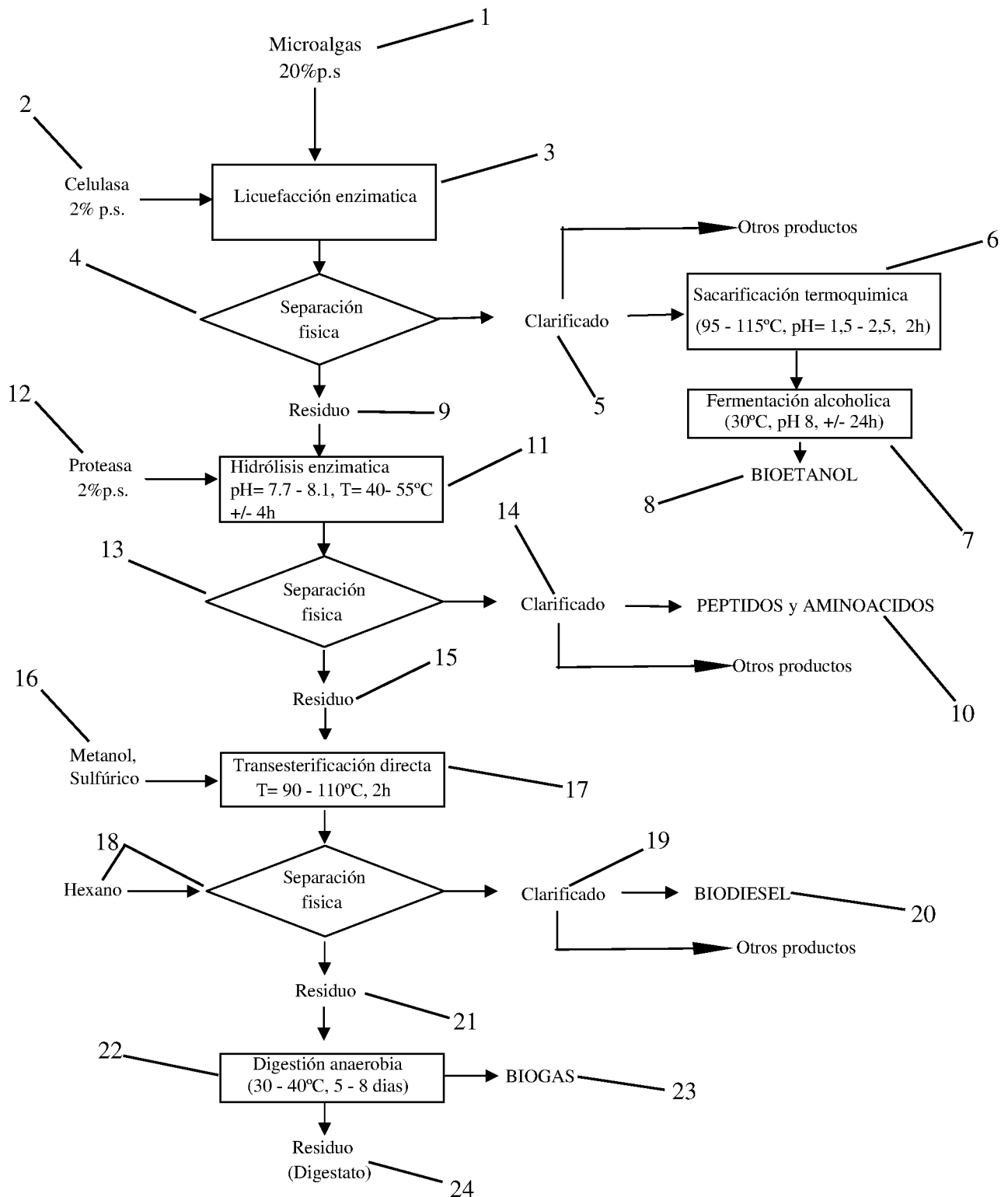


FIG. 1

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2013/070064

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12P5/02

C12P7/06

C12P7/64

C12P13/04

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
Y	DE 10 2010 001072 A1 (VOITH PATENT GMBH [DE]) 28 de Julio de 2011 (28-07-2011) página 2, col. izquierda, párrafo [0001]-[0002] página 3, col. izquierda, párrafo [0013] - página 4, col. izquierda, párrafo paragraph [0016] página 4, col. izquierda, párrafo [0021] page 5, col. izquierda, párrafo [0029] página 6, col. izquierda, párrafo [0040] página 15, col. izquierda, párrafo [0093]-[0095] reivindicación 2-26 ----- -/-	1-11

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
1 October 2013	30/10/2013
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional	Funcionario autorizado
EPO	
N° de fax	N° de teléfono

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2013/070064

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
Y	US 2012/270304 A1 (JOHNSON WAYNE L [US] ET AL) 25 de Octubre de 2012 (25-10-2012) página 1, col. izquierda, párrafo [0012] página 2, col. izquierda, párrafo [0021]; figura 1 página 8, col. izquierda, párrafo [0127] - página 9, col. izquierda párrafo [0141] US 2007/048859 A1 (SEARS JAMES T [US]) 01 de Marzo de 2007 (01-03-2007) página 1, col. izquierda párrafo [0002] página 3, col. izquierda párrafo [0018] figura 4, col. izquierda párrafo [0055] página 11, col. izquierda párrafo [0103] figura 1 -----	1-11
Y	US 2008/160593 A1 (OYLER JAMES R [US]) 03 de Julio de 2008 (03-07-2007) página 6, col. izquierda, párrafo [0063] página 9, col. izquierda, párrafo [0091] -----	1-11
Y	Danquah, M. et al.,: "Analysis of process configurations for bioethanol production from microalgal biomass"; "Chapter 20" In: Dr. Shahid Shaukat (Ed.): "Progress in Biomass and Bioenergy Production", 2011, XP002713870, ISBN: 978-953-307-491-7 página 395-408, DOI: 10.5772/17468, página 400, párrafo 1 - página 406, párrafo 1; figura 2; tabla 4 -----	1-11
Y	MORRIS H J ET AL: "Utilisation of Chlorellavulgaris cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates", BIORESOURCE TECHNOLOGY, vol. 99, no. 16, 01 de Noviembre de 2008 (01-11-2008), página 7723-7729, XP022735260, ELSEVIER BV, GB ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2008.01.080 [retrieved on 2008-03-24] Resumen página 7724, col. izquierda, párrafo 2 página 7724, col. izquierda, párrafo 3 página 7725, col. izquierda, párrafo 2; tables 1,2 página 7727, col. izquierda, párrafo 2 página 7729, col. izquierda, párrafo 1; tablas 3,4	1-11

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
Y	Schneider, R.S.C. et al.: "Potential Production of Biofuel from Microalgae Biomass Produced in Wastewater"; "Chapter 1" In: Prof. Zhen Fang (Ed.): "Biodiesel-Feedstocks, Production and Applications", 2012, XP002713871, ISBN: 978-953-51-0910-5, páginas 3-24, DOI: 10.5772/52439, página 3, último - página 4, párrafo 3; figuras 1, 3 páginas 8, párrafo 2 - página 16, párrafo 3	1-11
Y	HANNON, M. ET AL.: "Biofuels from algae: challenges and potential", NIH Public Access Author Manuscript Septiembre de 2010 (2010-09), páginas 1-35, XP055081834, Retrieved from the Internet: URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3152439/ [retrieved on 2013-09-27] página 9, paragraph 2 - página 18, párrafo 1; figura 4 Published in final form as: Biofuels. 2010 Septiembre; 1(5): 763-784	1-11
Y	WILLIAMS P J LE B ET AL: "Microalgae as biodiesel and biomass feedstocks: review and analysis of the biochemistry, energetics and economics", ENERGY & ENVIRONMENTAL SCIENCE, vol. 3, 1 February 2010 (2010-02-01), páginas 554-590, XP009149363, ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, UK ISSN: 1754-5692, DOI: 10.1039/B924978H [retrieved on 2010-03-22] página 577, col. izquierda, párrafo 1 - página 588, col. izquierda, párrafo 3	1-11
Y	HARUN R ET AL: "Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products", RENEWABLE AND SUSTAINABLE ENERGY REVIEWS, vol. 14, no. 3, 01 de Abril de 2010 (01-04-2010) pages 1037-1047, XP026867884, ELSEVIERS SCIENCE, NEW YORK, NY, US ISSN: 1364-0321 [retrieved on 2009-11-24] página 1041, col. derecha, párrafo 2 - página 1045, col. izquierda, párrafo 1	1-11

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2013/070064

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X,P	MARTÍN, M AND GROSSMANN, I.E: "Optimal engineered algae composition for the integrated simultaneous production of bioethanol and biodiesel", AICHE JOURNAL , vol. 59, no. 8 02 de abril de 2013 (02-04-2013), páginas 2872-2883, XP002713872, DOI: 10.1002/aic.14071 Retrieved from the Internet: URL:http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14071/pdf [retrieved on 2013-09-24] todo el documento	1-11
X	----- RASHID, N. ET AL.M: "Recycling and reuse of spent microalgal biomass for sustainable biofuels", BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL , vol. 75 Junio 2013 (06-2013) , páginas 101-107, XP055081838, Retrieved from the Internet: URL:http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.04.001 [retrieved on 2013-09-27] todo el documento -----	1-11

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES2013/070064

DE 102010001072 A1	28-07-2011	NINGUNO			

US 2012270304 A1	25-10-2012	NINGUNO			

US 2007048859 A1	01-03-2007	AU 2006282946 A1			01-03-2007
		BR P10615085 A2			28-06-2011
		CN 101341243 A			07-01-2009
		EP 1928994 A2			11-06-2008
		JP 2009505660 A			12-02-2009
		US 2007048848 A1			01-03-2007
		US 2007048859 A1			01-03-2007
		WO 2007025145 A2			01-03-2007

US 2008160593 A1	03-07-2008	US 2008160593 A1			03-07-2008
		US 2009077863 A1			26-03-2009
		US 2009081748 A1			26-03-2009
		US 2009269839 A1			29-10-2009
		US 2010304452 A1			02-12-2010
		US 2011131869 A1			09-06-2011
		US 2011136189 A1			09-06-2011
		US 2011136217 A1			09-06-2011
		US 2012285077 A1			15-11-2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES2013/070064

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12P5/02 C12P7/06 C12P7/64 C12P13/04
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE 10 2010 001072 A1 (VOITH PATENT GMBH [DE]) 28 July 2011 (2011-07-28) page 2, left-hand column, paragraph [0001]-[0002] page 3, right-hand column, paragraph [0013] - page 4, left-hand column, paragraph [0016] page 4, right-hand column, paragraph [0021] - page 5, right-hand column, paragraph [0029] page 6, right-hand column, paragraph [0040] page 15, left-hand column, paragraph [0093]-[0095] claims 2-26 ----- -/-	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 October 2013

Date of mailing of the international search report

30/10/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2013/070064

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2012/270304 A1 (JOHNSON WAYNE L [US] ET AL) 25 October 2012 (2012-10-25) page 1, right-hand column, paragraph [0012] page 2, left-hand column, paragraph [0021]; figure 1 page 8, right-hand column, paragraph [0127] - page 9, left-hand column, paragraph [0141] -----	1-11
Y	US 2007/048859 A1 (SEARS JAMES T [US]) 1 March 2007 (2007-03-01) page 1, left-hand column, paragraph [0002] page 3, left-hand column, paragraph [0018] page 4, left-hand column, paragraph [0055] page 11, left-hand column, paragraph [0103]; figure 1 -----	1-11
Y	US 2008/160593 A1 (OYLER JAMES R [US]) 3 July 2008 (2008-07-03) page 6, left-hand column, paragraph [0063] - page 9, left-hand column, paragraph [0091] -----	1-11
Y	Danquah, M. et al.,: "Analysis of process configurations for bioethanol production from microalgal biomass"; "Chapter 20" In: Dr. Shahid Shaukat (Ed.): "Progress in Biomass and Bioenergy Production", 2011, XP002713870, ISBN: 978-953-307-491-7 pages 395-408, DOI: 10.5772/17468, page 400, paragraph 1 - page 406, paragraph 1; figure 2; table 4 -----	1-11
Y	MORRIS H J ET AL: "Utilisation of Chlorellavulgaris cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates", BIORESOURCE TECHNOLOGY, vol. 99, no. 16, 1 November 2008 (2008-11-01), pages 7723-7729, XP022735260, ELSEVIER BV, GB ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2008.01.080 [retrieved on 2008-03-24] abstract page 7724, left-hand column, paragraph 2 page 7724, right-hand column, paragraph 3 - page 7725, right-hand column, paragraph 2; tables 1,2 page 7727, left-hand column, paragraph 2 - page 7729, right-hand column, paragraph 1; tables 3,4 -----	1-11
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES2013/070064

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Schneider, R.S.C. et al.: "Potential Production of Biofuel from Microalgae Biomass Produced in Wastewater"; "Chapter 1" In: Prof. Zhen Fang (Ed.): "Biodiesel-Feedstocks, Production and Applications", 2012, XP002713871, ISBN: 978-953-51-0910-5, pages 3-24, DOI: 10.5772/52439, page 3, last paragraph - page 4, paragraph 3; figures 1,3 page 8, paragraph 2 - page 16, paragraph 3 -----	1-11
Y	HANNON, M. ET AL.,: "Biofuels from algae: challenges and potential", NIH Public Access Author Manuscript , September 2010 (2010-09), pages 1-35, XP055081834, Retrieved from the Internet: URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3152439/ [retrieved on 2013-09-27] page 9, paragraph 2 - page 18, paragraph 1; figure 4 Published in final form as: Biofuels. 2010 September; 1(5): 763-784 -----	1-11
Y	WILLIAMS P J LE B ET AL: "Microalgae as biodiesel and biomass feedstocks: review and analysis of the biochemistry, energetics and economics", ENERGY & ENVIRONMENTAL SCIENCE, vol. 3, 1 February 2010 (2010-02-01), pages 554-590, XP009149363, ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, UK ISSN: 1754-5692, DOI: 10.1039/B924978H [retrieved on 2010-03-22] page 577, left-hand column, paragraph 1 - page 588, left-hand column, paragraph 3 -----	1-11
Y	HARUN R ET AL: "Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products", RENEWABLE AND SUSTAINABLE ENERGY REVIEWS, vol. 14, no. 3, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 1037-1047, XP026867884, ELSEVIERS SCIENCE, NEW YORK, NY, US ISSN: 1364-0321 [retrieved on 2009-11-24] page 1041, right-hand column, paragraph 2 - page 1045, left-hand column, paragraph 1 ----- -/--	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2013/070064

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	MARTÍN, M AND GROSSMANN, I.E: "Optimal engineered algae composition for the integrated simultaneous production of bioethanol and biodiesel", AICHE JOURNAL , vol. 59, no. 8 2 April 2013 (2013-04-02), pages 2872-2883, XP002713872, DOI: 10.1002/aic.14071 Retrieved from the Internet: URL:http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14071/pdf [retrieved on 2013-09-24] the whole document -----	1-11
X	RASHID, N. ET AL.M: "Recycling and reuse of spent microalgal biomass for sustainable biofuels", BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL , vol. 75 June 2013 (2013-06), pages 101-107, XP055081838, Retrieved from the Internet: URL:http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.04.001 [retrieved on 2013-09-27] the whole document -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/ES2013/070064

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 102010001072 A1	28-07-2011	NONE	
US 2012270304 A1	25-10-2012	NONE	
US 2007048859 A1	01-03-2007	AU 2006282946 A1 BR PI0615085 A2 CN 101341243 A EP 1928994 A2 JP 2009505660 A US 2007048848 A1 US 2007048859 A1 WO 2007025145 A2	01-03-2007 28-06-2011 07-01-2009 11-06-2008 12-02-2009 01-03-2007 01-03-2007 01-03-2007
US 2008160593 A1	03-07-2008	US 2008160593 A1 US 2009077863 A1 US 2009081748 A1 US 2009269839 A1 US 2010304452 A1 US 2011131869 A1 US 2011136189 A1 US 2011136217 A1 US 2012285077 A1	03-07-2008 26-03-2009 26-03-2009 29-10-2009 02-12-2010 09-06-2011 09-06-2011 09-06-2011 15-11-2012