



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 364 768**

⑫ Número de solicitud: 201150001

⑬ Int. Cl.:

C11B 1/10 (2006.01)

C11C 1/04 (2006.01)

C12M 1/107 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C11C 3/00 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **19.06.2009**

⑯ Prioridad: **30.06.2008 IT MI08A1203**

⑰ Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2011**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
14.09.2011

⑲ Solicitante/s: **ENI S.p.A.**
Piazzale E. Mattei 1
00144 Roma, IT

⑳ Inventor/es: **D'Addario, Ezio, Nicola;**
Capuano, Federico;
D'Angeli, Edoardo y
Medici, Roberto

㉑ Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

㉒ Título: **Procedimiento para la extracción de ácidos grasos a partir de biomasa de algas.**

㉓ Resumen:

Procedimiento para la extracción de ácidos grasos a partir de biomasa de algas, que comprende producir una suspensión acuosa de biomasa de algas; someter la suspensión acuosa de biomasa de algas a hidrólisis ácida y extracción mediante la adición de por lo menos un disolvente orgánico apolar y por lo menos un ácido inorgánico a dicha suspensión acuosa de biomasa de algas, de tal modo que se obtengan las tres fases siguientes: una fase semisólida que comprende una suspensión espesa de la biomasa de algas; una fase acuosa que comprende compuestos inorgánicos y compuestos orgánicos hidrófilos; una fase orgánica que comprende ácidos grasos y compuestos orgánicos hidrófobos distintos a dichos ácidos grasos.

ES 2 364 768 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la extracción de ácidos grasos a partir de biomasa de algas.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la extracción de ácidos grasos a partir de biomasa de algas.

Más en particular, la presente invención se refiere a un procedimiento para la extracción de ácidos grasos de biomasa de algas que comprende el tratamiento de una suspensión acuosa de biomasa de algas con por lo menos un disolvente apolar orgánico y por lo menos un ácido inorgánico.

10 Las algas, en particular, las microalgas, se cultivan actualmente para la producción de compuestos valiosos tales como, por ejemplo, ácidos grasos poliinsaturados [por ejemplo, ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA), y similares], vitaminas (por ejemplo, β -caroteno, y similares) y agentes de gelificación, que se incluyen en los campos nutricional, farmacéutico y cosmético.

El cultivo de microalgas para los sectores anteriores se caracteriza por capacidades de producción bastante limitadas (del orden de cientos-miles de toneladas al año) con un alto valor añadido de los compuestos obtenidos (cientos-miles de dólares por kilogramo). Éste es el motivo por el cual pueden tolerarse sistemas de producción, particularmente sistemas de extracción y purificación, caros y complejos que deben satisfacer los estrictos reglamentos de tipo sanitario y nutricional, típicos de los campos mencionados anteriormente.

El paso de los campos mencionados anteriormente de utilización tradicional de las microalgas, al campo medioambiental/energético, requiere el desarrollo de tecnologías que conduzcan a fuertes aumentos en la capacidad de producción (de cientos-miles de toneladas al año a millones de toneladas al año) y una fuerte reducción en los costes de producción debido al valor añadido limitado de los productos destinados para el campo medioambiental/energético (cientos-miles de dólares por tonelada).

Se describen en la técnica procedimientos relacionados con la extracción de compuestos de biomasa de algas.

30 La patente US nº 4.341.038, por ejemplo, describe un procedimiento para la recuperación de productos oleosos a partir de algas que comprende: (a) hacer crecer algas halófilas unicelulares, sin pared celular, en una solución salina; (b) recoger estas algas con el fin de obtener una suspensión espesa basada en algas y agua salina; (c) extraer los productos oleosos de dicha suspensión espesa utilizando un disolvente para dichos productos; (d) recuperar dichos productos oleosos y algas residuales. Dichos productos oleosos pueden utilizarse como fuentes de energía, en particular combustible, o como fuente de otros productos tales como, por ejemplo, fertilizantes, o para nutrición animal.

La patente US nº 5.338.673 describe un procedimiento para la producción selectiva de ácidos grasos poliinsaturados a partir de un cultivo de microalgas de la especie *Porphyridium cruentum*, así como un procedimiento para su extracción. En particular, el procedimiento de extracción incluye: concentrar la biomasa de algas; someter dicha biomasa de algas concentrada a lisis celular, preferentemente por medio de homogenización mecánica; separar la fase líquida de la fase sólida, conteniendo dicha fase sólida dichos ácidos grasos poliinsaturados; extraer dichos ácidos grasos poliinsaturados utilizando un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, hexano o cloroformo; evaporar dicho disolvente orgánico con el fin de obtener dichos ácidos grasos poliinsaturados.

45 Dichos ácidos grasos poliinsaturados, tales como, por ejemplo, ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA), ácido araquidónico, se utilizan particularmente en el sector farmacéutico.

La patente US nº 5.539.133 describe un procedimiento para obtener lípidos con una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que presentan entre 20 y 22 átomos de carbono, a través de la extracción de un material de partida de origen animal o vegetal, presentando dicho material de partida un contenido en agua de desde el 5% en peso hasta el 50% en peso y un tamaño de partícula comprendido entre 0,01 mm y 50 mm, llevándose a cabo dicha extracción utilizando un disolvente orgánico, preferentemente miscible con agua (por ejemplo, etanol) o a través de gas comprimido licuado (por ejemplo, dióxido de carbono, propano, o combinaciones de los mismos). Como material de partida que puede utilizarse para este fin, también se indican las algas unicelulares (microalgas), o macroalgas que pertenecen a la familia de las algas rojas, pardas o verdes. Dichos ácidos grasos poliinsaturados tales como, por ejemplo, ácido docosahexaenoico (DHA), ácido araquidónico, se utilizan particularmente en la industria alimentaria.

60 La patente US nº 6.166.231 describe un procedimiento para separar lípidos, en particular aceites alimentarios, de un material de origen biológico (por ejemplo, algas, levaduras o bacterias) que comprende: (a) poner en contacto un disolvente (por ejemplo, hexano, o diversos éteres de petróleo) con una suspensión acuosa del material de origen biológico que contiene los lípidos a contracorriente, siendo dicho disolvente esencialmente inmiscible con agua; (b) recoger el disolvente, conteniendo dicho disolvente los lípidos extraídos de dicha suspensión acuosa del material de origen biológico; y (c) separar los lípidos de dicho disolvente.

65 Dicha suspensión acuosa del material de origen biológico se somete preferentemente a centrifugación con el fin de alcanzar una concentración de sustancia sólida en la suspensión no superior al 50% y, posteriormente, a lisis celular por medio, por ejemplo, de homogenización mecánica. Puede obtenerse una extracción mejorada de los lípidos

a través de un aumento en el pH, preferentemente entre 5 y 10, de dicho material de origen biológico a través de procedimientos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, mediante la adición de una disolución cáustica (por ejemplo, hidróxido de potasio o hidróxido de sodio). El aumento en el pH también impide la formación de emulsiones entre el material de origen biológico y el disolvente.

Miao X. *et al.* describen la producción de biodiésel a partir de algas en el siguiente artículo: "Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil", publicado en "Bioresource Technology" 97 (2006), págs. 841-846. En dicho artículo, se secan algas de la especie *Chorella protothecoides*, hechas crecer de manera heterótrofa, y posteriormente se pulverizan en un mortero y se someten a extracción con hexano con el fin de extraer el aceite. El aceite extraído se somete posteriormente a transesterificación ácida en presencia de metanol y ácido sulfúrico como catalizador de transesterificación, con el fin de obtener biodiésel.

La producción de biodiésel a partir de algas también se describe por Hossain S. *et al.* en el siguiente artículo: "Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy", publicado en "American Journal of Biochemistry and Biotechnology" 4 (3) (2008), págs. 250-254. En dicho artículo, se secan algas de las especies *Oedogonium* y *Spirogyra*, tras molerse y pulverizarse en mortero tanto como sea posible, en un horno termostático a 80°C, durante 20 minutos para eliminar el agua. Posteriormente, se mezcla una disolución de hexano y éter con las algas secadas para extraer el aceite. Se recupera el aceite extraído por medio de evaporación a vacío de dicha disolución en hexano y éter. Se lleva a cabo la reacción de transesterificación del aceite así obtenido, con el fin de obtener biodiésel, en presencia de una combinación de hidróxido de sodio como catalizador de transesterificación, y metanol (transesterificación básica).

Los procedimientos anteriores, sin embargo, pueden presentar diversos puntos críticos, tales como, por ejemplo:

- lisis celular de la biomasa efectuada normalmente mediante homogenización mecánica, molienda o pulverización, de modo que se liberen las fracciones lipídicas intra y endocelulares y se mejore el contacto con el disolvente;
- secado de la biomasa efectuada normalmente por medio de técnicas costosas, tales como, por ejemplo, secado por pulverización o liofilización, una operación que también requiere particular atención con respecto a la temperatura utilizada durante el secado que debe mantenerse dentro de un determinado intervalo de modo que no se ponga en peligro la calidad de los compuestos (por ejemplo, lípidos) que van a extraerse;
- difícil separación de la fase acuosa de la fase de disolvente que contiene las fracciones lipídicas, una operación que puede ser particularmente difícil debido a la formación de emulsiones.

El solicitante ha descubierto actualmente que la extracción de ácidos grasos de biomasa de algas puede llevarse a cabo ventajosamente por medio de un procedimiento que comprende el tratamiento de una suspensión acuosa de biomasa de algas con por lo menos un disolvente orgánico apolar y por lo menos un ácido inorgánico. Dicho procedimiento permite tanto la hidrólisis ácida de la fracción lipídica presente en la biomasa de algas, con el fin de obtener ácidos grasos, y la extracción contemporánea de dichos ácidos grasos, que va a efectuarse. En particular, dicho procedimiento permite que se obtengan las tres fases siguientes, sin intervenciones adicionales: (i) una fase semisólida que comprende una suspensión espesa de la biomasa de algas; (ii) una fase acuosa que comprende compuestos inorgánicos y compuestos orgánicos hidrófilos; (iii) una fase orgánica que comprende ácidos grasos y compuestos orgánicos hidrófobos diferentes de dichos ácidos grasos.

Un objetivo de la presente invención es, por tanto, proporcionar un procedimiento para la extracción de ácidos grasos de biomasa de algas, que comprende:

- producir una suspensión acuosa de biomasa de algas;
- someter la suspensión acuosa de biomasa de algas a hidrólisis ácida y extracción mediante la adición de por lo menos un disolvente orgánico apolar y por lo menos un ácido inorgánico a dicha suspensión acuosa de biomasa de algas, con el fin de obtener las tres fases siguientes:
 - (i) una fase semisólida que comprende una suspensión espesa de la biomasa de algas;
 - (ii) una fase acuosa que comprende compuestos inorgánicos y compuestos orgánicos hidrófilos;
 - (iii) una fase orgánica que comprende ácidos grasos y compuestos orgánicos hidrófobos distintos a dichos ácidos grasos.

La fracción lipídica presente en la biomasa de algas que proviene del cultivo de microalgas, comprende generalmente diversos grupos de moléculas lipídicas, tales como, por ejemplo: glicéridos, por ejemplo, mono-, di-, tri-acilglicéridos (que contienen ácidos grasos); ceras (que contienen ácidos grasos más alcoholes y ácidos grasos más esteróles); hidrocarburos; ácidos grasos libres; esterales; fosfolípidos, tales como, por ejemplo, diacil-fosfoglicéridos, alquil-acil-fosfolípidos, alquenil-acil-fosfoglicéridos (que contienen ácidos grasos más un grupo fosfórico), esfingo-

fosfolípidos (que contienen ácidos grasos más un grupo fosfórico y una base nitrogenada); glicolípidos (que contienen ácidos grasos más hidratos de carbono y una base nitrogenada); aminolípidos (que contienen ácidos grasos y una base nitrogenada). Además de estas moléculas lipídicas, otros compuestos orgánicos hidrófobos, tales como, por ejemplo, clorofilas, carotenoides, terpenos; tocoferoles, están presentes generalmente en dicha biomasa de algas.

La fracción lipídica mencionada anteriormente y dichos otros compuestos orgánicos hidrófobos se extraen normalmente por medio de disolventes, operando según procedimientos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, los descritos en los documentos notificados anteriormente.

Tal como se mencionó anteriormente, la adición de por lo menos un disolvente orgánico apolar y por lo menos un ácido inorgánico a la suspensión acuosa mencionada anteriormente de biomasa de algas, según el procedimiento objeto de la presente invención, permite que tanto la hidrólisis ácida de dicha fracción lipídica obteniéndose ácidos grasos, como la extracción de dichos ácidos grasos, se efectúen simultáneamente. Además, el procedimiento que es el objeto de la presente invención permite obtener, además de los ácidos grasos mencionados anteriormente, alcoholes hidrófilos, tales como, por ejemplo, glicerina a partir de triglicéridos, alcohol metílico a partir de clorofilas; alcoholes hidrófobos de cadena larga, tales como, por ejemplo, fitol a partir de clorofilas; compuestos orgánicos hidrófobos que, durante la hidrólisis ácida, sólo se hidrolizan parcialmente o no se hidrolizan. Al final de la hidrólisis y la extracción, los compuestos así obtenidos se dividen, como resultados de sus diferentes características, entre la fase orgánica (hidrófoba) y la fase acuosa (hidrófila).

Se ha verificado que la hidrólisis ácida de la suspensión acuosa de la biomasa de algas, permite que se liberen los ácidos grasos para solubilizarse instantáneamente en el disolvente, evitando así la formación de emulsiones y favoreciendo en consecuencia su recuperación, por ejemplo, mediante evaporación del disolvente.

La fase acuosa (ii) comprende preferentemente unos compuestos inorgánicos (por ejemplo, parte del ácido inorgánico utilizado para la hidrólisis ácida; sales de nitrógeno y sales de potasio que provienen del cultivo de algas) y compuestos orgánicos hidrófilos (por ejemplo, glicerina; alcohol metílico; aminoácidos y polipéptidos que provienen de la hidrólisis de las sustancias proteicas presentes en la biomasa de algas). Dichos compuestos orgánicos hidrófilos están presentes generalmente en una cantidad pequeña.

La fase orgánica (iii) comprende preferentemente, además de ácidos grasos, compuestos orgánicos hidrófobos diferentes de los ácidos grasos tales como, por ejemplo, fitol y otros alcoholes hidrófobos de cadena larga, clorofila, carotenoides.

La suspensión acuosa de biomasa de algas proviene preferentemente del cultivo de algas, preferentemente unicelulares (microalgas), efectuado con aguas residuales procedentes de aguas residuales industriales. En este caso, el cultivo de algas metaboliza las sustancias que contienen nitrógeno y/o fósforo contenidas en el mismo contribuyendo a su purificación. El CO₂ contenido en los gases de combustión industriales (refinerías, estaciones termoeléctricas, plantas de generación de hidrógeno, etc.) puede utilizarse como el CO₂ necesario para el crecimiento de las algas.

La suspensión acuosa de biomasa de algas se somete preferentemente a espesamiento para obtener una mayor concentración de sustancia seca en dicha biomasa de algas. Dichos espesamiento puede efectuarse por medio de diversos procedimientos, tales como, por ejemplo:

- separación por gravedad en sedimentadores utilizados habitualmente en plantas de tratamiento de agua;
- filtración a vacío;
- tratamiento por medio de prensas de filtro de banda.

La sedimentación de cepas de algas de agua dulce tales como, por ejemplo, la cepa *Scenedesmus sp.*, puede facilitarse mediante la utilización de polielectrolitos catiónicos (por ejemplo poliacrilamidas) utilizados en cantidades de 2 ppm-5 ppm (transición de la concentración de algas de desde 0,4 g/l hasta 40-50 g/l en unas cuantas horas).

Para los objetivos de la presente descripción y de las siguientes: reivindicaciones, la definición de los intervalos numéricos comprende siempre los extremos, a menos que se especifique lo contrario.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, la suspensión acuosa de biomasa de algas presenta una concentración de sustancia seca comprendida entre el 3% en peso y el 40% en peso, más preferentemente entre el 5% en peso y el 35% en peso, con respecto al peso total de la suspensión acuosa de biomasa de algas.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, el disolvente orgánico apolar puede seleccionarse de hidrocarburos alifáticos, tales como, por ejemplo, hexano, n-octano, hidrocarburos aromáticos tales como, por ejemplo, isómeros de xileno; cortes de refinería que comprenden combinaciones de dichos hidrocarburos alifáticos y/o aromáticos, presentando preferentemente dichos cortes de refinería un punto de ebullición que oscila desde 60°C hasta 160°C; éteres de petróleo; o combinaciones de los mismos. Se prefieren hexano, n-octano o combinaciones de los mismos.

Otros disolventes, tales como, por ejemplo, éteres, cetonas, hidrocarburos clorados o combinaciones de los mismos no se excluyen de la presente invención, con la condición de que sean inmiscibles con agua.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, la razón entre la concentración de sustancia seca en la biomasa de algas y el volumen de disolvente orgánico apolar está comprendida entre 1:1 y 1:80, preferentemente entre 1:3 y 1:70.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, el ácido inorgánico puede seleccionarse de ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, o combinaciones de los mismos. Se prefieren ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, o sus combinaciones.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, la razón entre la concentración de sustancia seca en la biomasa de algas y el volumen de ácido inorgánico está comprendida entre 1:0,01 y 1:5, preferentemente entre 1:0,02 y 1:3.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, la hidrólisis ácida y la extracción se llevan a cabo, a presión atmosférica, al punto de ebullición del disolvente cuando dicha temperatura es inferior a 100°C, o a 100°C cuando el punto de ebullición del disolvente es superior a 100°C. La hidrólisis ácida y la extracción se llevan a cabo preferentemente a presión atmosférica, a 100°C.

Según una forma de realización adicional de la presente invención, la hidrólisis ácida y la extracción se efectúan a una temperatura de 100°C, a la presión de equilibrio del disolvente a esta temperatura.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, la hidrólisis ácida y la extracción se llevan a cabo a un valor de pH comprendido entre 0,5 y 3. La hidrólisis ácida y la extracción se llevan a cabo preferentemente a un valor de pH de 2.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, la hidrólisis ácida y la extracción se llevan a cabo durante un periodo que oscila desde 1 hora hasta 3 horas. La hidrólisis ácida y la extracción se llevan a cabo preferentemente durante un periodo de 2 horas.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, el disolvente orgánico apolar y el ácido inorgánico se añaden de manera contemporánea a la biomasa de algas.

Según una forma de realización adicional de la presente invención, el disolvente orgánico apolar se añade a la biomasa de algas antes del ácido inorgánico.

Según una forma de realización adicional de la presente invención, el disolvente orgánico apolar se añade a la biomasa de algas tras el ácido inorgánico.

Al final de la hidrólisis y la extracción, se obtienen las tres fases siguientes (i)-(iii) que se separan por gravedad. Dichas tres fases (i)-(iii) se recuperan posteriormente y se someten a un tratamiento conocido en la técnica con el fin de obtener los compuestos de interés.

Debe observarse que las tres fases (i)-(iii) se separan fácilmente por gravedad sin la necesidad de ningún tratamiento de separación particular.

Preferentemente, la fase semisólida (i) que comprende una suspensión espesa de la biomasa de algas, tras la eliminación del agua residual por medio de procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, a través de decantación, se somete a pirólisis con el fin de obtener aceites pirólíticos.

Preferentemente, la fase acuosa (ii) que comprende compuestos inorgánicos y compuestos orgánicos hidrófilos, se somete a digestión anaerobia por medio de microorganismos en ausencia de oxígeno con el fin de obtener biogás (metano, en un porcentaje del 50% al 70%, dióxido de carbono y otros subproductos de reacción).

Alternativamente, pueden mezclarse la fase (i) y la fase (ii) y posteriormente someterse a digestión anaerobia por medio de microorganismos, en ausencia de oxígeno, para obtener biogás.

Debe observarse que en la producción de biogás, es preferible no utilizar ácido sulfúrico como disolvente orgánico apolar ya que podría interferir negativamente en la producción del mismo biogás. Podrían surgir fenómenos de competencia, por ejemplo, entre floras bacterianas metanogénicas y reductoras de azufre debido a la presencia de concentraciones significativas de sulfato, o podrían desarrollarse cantidades relevantes de ácido sulfúrico en el biogás producido. En el caso de la producción de biogás, es preferible utilizar ácido clorhídrico como disolvente orgánico apolar.

La fase orgánica (iii) que comprende ácidos grasos y otros compuestos orgánicos hidrófobos diferentes de dichos ácidos grasos, se somete preferentemente a una etapa de evaporación con el fin de recuperar el disolvente orgánico apolar que se recircula al procedimiento, los ácidos grasos y los otros compuestos orgánicos hidrófobos diferentes de

dichos ácidos grasos. Tras la evaporación, dicha fase orgánica (iii) se esterifica en presencia de un alcohol que presenta desde 1 hasta 4 átomos de carbono, preferentemente metanol, etanol, y un catalizador ácido o básico, para producir glicerol y ésteres alquílicos, en particular ésteres metílicos o ésteres etílicos (biodiésel).

Alternativamente, tras la evaporación, dicha fase orgánica (iii) puede someterse a hidrogenación/desoxigenación en presencia de hidrógeno y un catalizador con el objetivo de producir diésel verde. Los procedimientos de hidrogenación/desoxigenación se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente europea EP 1.728.844.

Dependiendo de la utilización específica del biodiésel o diésel verde producido según se describió anteriormente y que puede utilizarse como tal o en una combinación con otros combustibles para vehículos de motor, los compuestos orgánicos hidrófobos diferentes de dichos ácidos grasos que, al contrario que dichos ácidos grasos, no se esterifican ni hidrogenan/desoxigenan, pueden permanecer en dichos biodiésel o diésel verde, o pueden retirarse utilizando técnicas conocidas en la materia, tales como, por ejemplo, tratamiento con materiales sólidos adsorbentes (por ejemplo, gel de sílice, u otros materiales polares porosos) o tratamiento térmico.

Alternativamente, la fase orgánica (iii) que comprende ácidos grasos y otros compuestos orgánicos hidrófobos diferentes de dichos ácidos grasos, puede someterse directamente a esterificación o hidrogenación/desoxigenación. En este caso, se evita la etapa de evaporación del disolvente orgánico apolar.

La presente invención se ilustra a continuación con mayor detalle por medio de una forma ilustrativa haciendo referencia a la figura 1 notificada a continuación.

Según una forma de realización típica del procedimiento de la presente invención, la suspensión acuosa de la biomasa de algas se produce a través de cultivo de algas, preferentemente microalgas, efectuado con aguas residuales procedentes de aguas residuales industriales. La producción de microalgas, por ejemplo, puede llevarse a cabo adecuadamente combinando sistemas de cultivo tales como fotorreactores y estanques abiertos.

La suspensión acuosa de biomasa de algas así obtenida se espesa mediante separación por gravedad.

El agua residual con un contenido reducido de sustancias contaminantes nitrogenadas y/o fosfóricas puede descargarse directamente, o someterse a tratamiento de purificación de acabado antes de descargarse, para poder cumplir con los requisitos legales (no representado en la figura 1).

Si el agua disponible para el cultivo de algas no es suficiente, puede recircularse en gran medida el agua liberada del espesamiento de la biomasa de algas y reutilizarse en el procedimiento como aguas residuales industriales (tal como se muestra en la figura 1).

La biomasa de algas espesada se alimenta preferentemente a un reactor equipado con un refrigerante de reflujo.

A continuación, se alimentan los siguientes productos a dicho reactor:

- una suspensión acuosa de biomasa de algas que presenta un contenido variable de sustancia seca, preferentemente desde el 5% en peso hasta el 40% en peso con respecto al peso total de la suspensión acuosa de biomasa de algas;
- un disolvente orgánico apolar, preferentemente hexano o n-octano;
- un ácido inorgánico, preferentemente ácido sulfúrico o ácido clorhídrico, hasta que se obtiene un pH de aproximadamente 2.

Dicho reactor, mantenido a presión atmosférica, se calienta hasta el punto de ebullición del disolvente cuando dicha temperatura es inferior a 100°C, o hasta 100°C si dicha temperatura es superior a 100°C. Dicha temperatura se mantiene constante por medio del refrigerante del reactor que condensa el agua que se evapora.

La formación de ácidos grasos, debida a la hidrólisis ácida a la que se somete la biomasa de algas, se monitoriza por medio de análisis mediante cromatografía de gases del disolvente.

Cuando la hidrólisis y la extracción han concluido (verificado por medio de análisis mediante cromatografía de gases: se facilitan detalles adicionales referentes a dicho análisis en los siguientes ejemplos), las tres fases (i), (ii) y (iii) se separan por gravedad. Dichas tres fases (i), (ii) y (iii) se someten preferentemente al tratamiento descrito anteriormente con el fin de obtener: aceites pirolíticos, biodiésel o diésel verde, biogás.

Se proporcionan algunos ejemplos ilustrativos y no limitativos para una mejor comprensión de la presente invención y para su realización.

ES 2 364 768 A1

Ejemplo 1

Preparación de la biomasa de algas

5 En los siguientes ejemplos 2-6, se utilizó la cepa de algas *Scenedesmus sp.*, de la colección interna, que normalmente crece en agua dulce. El procedimiento de cultivo adoptado se describe a continuación en la presente memoria.

Se preparó el inóculo que iba a introducirse en el tanque de crecimiento descrito a continuación en la presente memoria, tal como sigue:

10

- se descongeló una muestra de cultivo monoalgal conservado previamente a -85°C en una disolución de glicerina al 10%, dejándola a temperatura ambiente, se sometió luego a centrifugación para eliminar el sobrenadante obteniendo una pasta celular;

15

- se inóculó la pasta celular así obtenida en tres matraces de 250 ml que contenían 50 ml de disolución que comprendía nutrientes obteniéndose un cultivo de algas;

- dicho cultivo de algas se hizo crecer en una cámara climática iluminada a una temperatura constante de 30°C, en presencia de un 0,5% de CO₂ en aire;

20

- tras aproximadamente una semana, el matraz alcanzó una concentración de 0,3 g/l, se utilizó este cultivo como inóculo para tres matraces de 1 litro que contenían 500 ml de disolución que comprendía nutrientes y se colocaron en la cámara climática;

25

- tras 2 días, el cultivo presentaba una concentración de 0,5 g/l y se utilizó este cultivo como inóculo para un tanque de crecimiento de laboratorio que presentaba un volumen de 35 litros.

30 Se hizo crecer el inóculo, preparado según se describió anteriormente, en el medio de cultivo M4N, descrito en la bibliografía para el cultivo de microalgas. Las condiciones de crecimiento fueron las siguientes:

Agua: potable;

35

KNO₃: 5,0 g/l;

KH₂PO₄: 1,25 g/l;

CaCl₂: 0,01 g/l;

40

FeSO₄·7H₂O: 0,003 g/l;

MgSO₄·7H₂O: 2,5 g/l;

45

Microelementos: 1 ml/l de la siguiente disolución: 2,86 g de H₃BO₃, 1,81 g de MnCl₂·4H₂O, 80 mg de CuSO₄·5H₂O, 220 mg de ZnSO₄·7H₂O, 210 mg de Na₂MoO₄, 25 g de FeSO₄·7H₂O, 33,5 g de EDTA y 1 gota de H₂SO₄, concentrado por litro;

pH de funcionamiento: 7,8.

50

Tanque de inóculo: 10% en volumen del cultivo anterior en medio M4N.

55 Se iluminó el tanque desde el exterior por medio de lámparas de tungsteno de 17.500 Lux y se mantuvo a 28°C por medio de circulación de agua termostática. También se alimentó el tanque con una mezcla de aire y CO₂ al 10% en aire, a una velocidad de flujo de 200 litros/hora, con un control del pH (punto de referencia de pH de 7,0).

Medio de cultivo del tanque (M4N optimizado)

60

Agua: potable;

KNO₃: 1,5 g/l;

KH₂PO₄: 1,25 g/l;

65

K₂HPO₄: 0,1 g/l;

CaCl₂: 0,01 g/l;

ES 2 364 768 A1

FeSO₄·7H₂O: 0,003 g/l;

MgSO₄·7H₂O: 1,5 g/l;

Microelementos: 1 ml/l de la siguiente disolución: 2,86 g de H₃BO₃, 1,81 g de MnCl₂·4H₂O, 80 mg de CuSO₄·5H₂O, 220 mg de ZnSO₄·7H₂O, 210 mg de Na₂MoO₄, 25 g de FeSO₄·7H₂O, 33,5 g de EDTA y 1 gota de H₂SO₄ concentrado por litro;

pH de funcionamiento: 7,0.

Cuando se observaron cambios de $\pm 0,2$ unidades con respecto a pH 7,0, se modificó manualmente el flujo de CO₂.

Se obtuvo la composición notificada anteriormente modificando el medio de cultivo típico M4N descrito en la bibliografía para el cultivo de microalgas. En particular, las modificaciones realizadas son:

- reducción del contenido en KNO₃ desde 5,0 g/l hasta 1,5 g/l;
- adición de K₂HPO₄ en una cantidad de 0,1 g/l;
- reducción en el contenido de MgSO₄·7H₂O desde 2,5 g/l hasta 1,5 g/l;
- reducción en el pH de funcionamiento desde 7,8 hasta 7,0.

Se tomaron tres muestras de cultivo en un tanque y se sometieron a mediciones de la densidad óptica por medio de un espectrofotómetro Varian C 900 para poder seguir la tendencia de crecimiento de las algas.

Además de esta medición, se realizaron mediciones de peso seco para determinar la concentración eficaz alcanzada por los cultivos. La tabla 1 resume los resultados obtenidos (valores por triplicado).

TABLA 1

	Densidad óptica (750 nm)									Peso seco (g/l)
Tiempo (h)	0	3	5	20,5	24	29	44,5	48	52	
	0,415	0,500	0,570	1,550	1,840	2,200	2,850	3,180	3,350	0,835
	0,670	0,760	0,830	1,500	1,550	1,720	2,300	2,410	2,540	0,925
	0,510	0,570	0,620	1,330	1,250	1,460	1,900	1,980	2,060	0,580

Se centrifugó la biomasa de algas obtenida en una centrífuga de discos del tipo Alfa Laval obteniendo una suspensión acuosa de biomasa de algas que presentaba un volumen de aproximadamente 2 litros (concentración de sustancia seca de 10 g/litro).

A continuación, se sometió la suspensión acuosa de biomasa de algas a filtración a vacío hasta que se obtuvo una concentración de sustancia seca que variaba desde el 5% en peso hasta el 10% en peso con respecto al peso total de la suspensión acuosa de biomasa de algas.

Se conservaron las muestras obtenidas en una nevera antes de someterse a hidrólisis y extracción de ácidos grasos.

Ejemplo 2 (invención)

Extracción de ácidos grasos (concentración de sustancia seca igual al 10%) y su esterificación para la producción de ésteres metílicos (biodiésel)

Se añadieron 50 ml de n-octano y 0,5 ml de ácido sulfúrico concentrado al 96% a un matraz de tres bocas de 250 ml, equipado con un refrigerante de reflujo y agitador, que contenía 50 g de una suspensión acuosa de biomasa de algas de la cepa *Scenedesmus sp.* obtenida según se describe en el ejemplo 1, que presentaba una concentración de sustancia seca igual al 10% en peso con respecto al peso total de la suspensión acuosa de biomasa de algas.

Se llevó el matraz al punto de ebullición del agua (100°C) por medio de una camisa de calefacción. Se mantuvo la mezcla de reacción, con agitación, a dicha temperatura, durante 2 horas.

Durante la hidrólisis/extracción, se monitorizó la formación de ácidos grasos por medio de análisis mediante cromatografía de gases de muestras de la mezcla de reacción tomadas directamente del matraz de reacción en diversos momentos: los resultados obtenidos se notifican en la tabla 2.

Con este fin, las muestras tomadas en diversos momentos se sometieron a centrifugación rápida con el fin de separar el disolvente (n-octano) que contenía los ácidos grasos a medida que se formaron en la mezcla de reacción. Las muestras de disolvente obtenidas de este modo se analizaron utilizando un cromatógrafo de gases mod. 6890 de Agilent, equipado con una columna DB-5HT de 30 m de largo, que presentaba un diámetro interno de 0,32 mm, y con un detector FID (detector de ionización de llama), funcionando en las siguientes condiciones:

- gas portador: helio a 15 psi;
- detector de temperatura FID: 400°C;
- temperatura del horno: 50°C (inicial); aumento de temperatura de 10°C/min hasta 400°C; permanencia a 400°C durante 12 min.

Tras 2 horas, se detuvo la agitación, se llevó de nuevo la mezcla a temperatura ambiente y se dejó que se separasen las tres fases por gravedad.

Se recuperó la fase orgánica, aproximadamente 50 ml, que comprendía n-octano, ácidos grasos y compuestos orgánicos hidrófobos diferentes de dichos ácidos grasos, tomándola directamente del matraz de reacción y se puso en una ampolla equipada con un refrigerante de reflujo y agitador.

A continuación, se añadieron 20 ml de metanol y 1 ml de ácido sulfúrico concentrado al 96% como catalizador de esterificación de los ácidos grasos. Se llevó a cabo la reacción de esterificación a 60°C, con agitación.

Se monitorizó la formación de ésteres metílicos por medio de análisis mediante cromatografía de gases en diversos momentos, funcionando en las mismas condiciones descritas anteriormente: los resultados obtenidos se notifican en la tabla 2.

TABLA 2

Resultados del análisis mediante cromatografía de gases (% con respecto a la concentración de sustancia seca inicial)		
Tiempo de reacción (h)	Ácidos grasos totales extraídos	Ésteres metílicos totales (ácidos grasos con esterificación)
0,5	4,5	4,2
1,0	5,5	5,4
1,5	6,3	6,0
2,0	6,3	6,5

ES 2 364 768 A1

Ejemplo 3 (comparativo)

Extracción de ácidos grasos y lípidos (concentración de sustancia seca igual al 10%) y transesterificación de dichos lípidos para la producción de ésteres metílicos (biodiésel)

Se efectuó una prueba de producción de ésteres metílicos a partir de lípidos como control, utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

Para este fin, se sometieron 50 g de una suspensión acuosa de biomasa de algas de la cepa *Scenedesmus sp.* obtenida según se describe en el ejemplo 1, que presentaba una concentración de sustancia seca igual al 10% en peso con respecto al peso total de la suspensión acuosa de biomasa de algas, a lisis mecánica en un molino de bolas (Fritsch Pulverisette), funcionando al 50% de la velocidad máxima, durante 20 minutos, luego se secaron mediante liofilización.

Se extrajo la fracción lipídica de 5 g de biomasa de algas tratada según se describió anteriormente con 150 ml de una mezcla de cloroformo/metanol (1:2 v/v). Tras la separación de la fase semisólida que contenía la suspensión espesa de la biomasa de algas mediante centrifugación, se eliminó el metanol de la fase orgánica mediante la adición de agua y posterior separación mediante segregación de la fase acuosa y parte del metanol contenido en la misma.

Se puso una alícuota de esta fase orgánica igual a 20 ml en una ampolla equipada con un refrigerante de reflujo y agitador. Se añadió posteriormente 1 ml de ácido sulfúrico concentrado al 96%.

Se consiguió que la ampolla alcanzara una temperatura de 60°C por medio de una camisa de calefacción. Se mantuvo la mezcla de reacción, con agitación, a esta temperatura, durante 2 horas.

Tras 2 horas, se detuvo la agitación y se llevó de nuevo la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se midió la cantidad de ácidos grasos formados por medio de análisis mediante cromatografía de gases funcionando en las mismas condiciones descritas anteriormente: los resultados se indican en la tabla 3.

Se introdujo una segunda alícuota de dicha fase orgánica igual a 20 ml en una ampolla equipada con un refrigerante de reflujo y agitador. Se añadieron posteriormente 20 ml de metanol y 1 ml de ácido sulfúrico concentrado al 96% como catalizador de transesterificación.

Se llevó la ampolla a una temperatura de 60°C por medio de una camisa de calefacción. Se mantuvo la mezcla de reacción, con agitación, a esta temperatura durante 2 horas.

Tras 2 horas, se detuvo la agitación y se llevó de nuevo la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se midió la cantidad de ésteres metílicos formados por medio de análisis mediante cromatografía de gases, funcionando en las mismas condiciones descritas anteriormente: los resultados obtenidos se indican en la tabla 3.

TABLA 3

Resultados del análisis mediante cromatografía de gases (% con respecto a la concentración de sustancia seca inicial)		
Tiempo de reacción (h)	Ácidos grasos totales extraídos	Ésteres metílicos totales (transesterificación lipídica)
2	6,3	6,5

Comparando la tabla 3 con la tabla 2, puede observarse que el procedimiento según la presente invención, aunque mucho más sencillo, presenta rendimientos análogos a los obtenidos con los procedimientos conocidos en la técnica.

Ejemplo 4 (invención)

Extracción de ácidos grasos (concentración de sustancia seca igual al 5%)

Se añadieron 50 ml de n-octano y 0,5 ml de ácido sulfúrico concentrado al 96% a un matraz de tres bocas de 250 ml, equipado con un refrigerante de reflujo y agitador, que contenía 50 g de una suspensión acuosa de biomasa de algas de la cepa *Scenedesmus sp.* obtenida según se describe en el ejemplo 1, que presentaba una concentración de sustancia seca igual al 5% en peso con respecto al peso total de la suspensión acuosa de biomasa de algas.

ES 2 364 768 A1

Se llevó el matraz al punto de ebullición de agua (100°C) por medio de una camisa de calefacción. Se mantuvo la mezcla de reacción, con agitación, a dicha temperatura, durante 2 horas.

Tras 2 horas, se detuvo la agitación y se llevó de nuevo la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se midió la cantidad de ácidos grasos formados por medio de análisis mediante cromatografía de gases, funcionando en las mismas condiciones descritas anteriormente: se observó una cantidad de ácidos grasos igual al 6,3% con respecto a la concentración de sustancia seca inicial.

Ejemplo 5 (invención)

Extracción de ácidos grasos (concentración de sustancia seca igual al 5% - diferente ácido inorgánico)

Se añadieron 50 ml de n-octano y 1,0 ml de ácido clorhídrico al 37% a un matraz de tres bocas de 250 ml, equipado con un refrigerante de reflujo y agitador, que contenía 50 g de una suspensión acuosa de biomasa de algas de la cepa *Scenedesmus sp.* obtenida según se describe en el ejemplo 1, que presentaba una concentración de sustancia seca igual al 5% en peso con respecto al peso total de la suspensión acuosa de biomasa de algas.

Se llevó el matraz al punto de ebullición de agua (100°C) por medio de una camisa de calefacción. Se mantuvo la mezcla de reacción, con agitación, a dicha temperatura, durante 2 horas.

Tras 2 horas, se detuvo la agitación y se llevó de nuevo la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se midió la cantidad de ácidos grasos formados por medio de análisis mediante cromatografía de gases, funcionando en las mismas condiciones descritas anteriormente: se observó una cantidad de ácidos grasos igual al 6,6% con respecto a la concentración de sustancia seca inicial.

Ejemplo 6 (invención)

Extracción de ácidos grasos (concentración de sustancia seca igual al 10% - diferente disolvente orgánico)

Se añadieron 50 ml de hexano y 0,5 ml de ácido sulfúrico concentrado al 96% a un matraz de tres bocas de 250 ml, equipado con un refrigerante de reflujo y agitador, que contenía 50 g de una suspensión acuosa de biomasa de algas de la cepa *Scenedesmus sp.* obtenida según se describe en el ejemplo 1, que presentaba una concentración de sustancia seca igual al 10% en peso con respecto al peso total de la suspensión acuosa de biomasa de algas.

Se llevó el matraz al punto de ebullición próximo al del hexano (69°C) por medio de una camisa de calefacción. Se mantuvo la mezcla de reacción, con agitación, a dicha temperatura, durante 2 horas.

Durante la hidrólisis/extracción, se monitorizó la formación de ácidos grasos por medio de análisis mediante cromatografía de gases de muestras de la mezcla de reacción tomadas directamente del matraz de reacción en diversos momentos, funcionando en las mismas condiciones descritas anteriormente: los resultados obtenidos se indican en la tabla 4.

TABLA 4

Resultados del análisis mediante cromatografía de gases (% con respecto a la concentración de sustancia seca inicial)	
Tiempo de reacción (h)	Ácidos grasos totales extraídos
1,0	3,3
2,0	4,2
3,0	5,0
4,0	5,8

ES 2 364 768 A1

Ejemplo 7 (invención)

Cuantificación y caracterización de los compuestos presentes en las tres fases (i)-(iii)

5 Se añadieron 300 ml de n-octano y 13 ml de ácido clorhídrico al 37% a un matraz de tres bocas de 2 litros, equipado con un refrigerante de reflujo y agitador, que contenía 630 g de una suspensión acuosa de biomasa de algas de la cepa *Scenedesmus sp.* obtenida según se describe en el ejemplo 1, que presentaba una concentración de sustancia seca igual al 5% en peso con respecto al peso total de la suspensión acuosa de biomasa de algas.

10 Se llevó el matraz al punto de ebullición de agua (100°C) por medio de una camisa de calefacción. Se mantuvo la mezcla de reacción, con agitación, a dicha temperatura, durante 2 horas.

Tras 2 horas, se detuvo la agitación y se llevó de nuevo la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se midió la cantidad de ácidos grasos formados por medio de análisis mediante cromatografía de gases, funcionando en las mismas condiciones descritas anteriormente: se observó una cantidad de ácidos grasos igual al 6,2% con respecto a la concentración de sustancia seca inicial, y una cantidad de total lípidos igual al 7,2% con respecto a la concentración de sustancia seca inicial.

20 Las fases líquidas: la fase acuosa (ii) y la fase orgánica (iii) se recuperaron por medio de desbordamiento.

La fase sólida (i) que quedó en el matraz se lavó dos veces con aproximadamente 160 ml de agua cada vez. Se eliminó el agua de lavado decantando la biomasa de algas residual y mediante posterior desbordamiento.

A continuación, se recuperaron los siguientes materiales:

25 fase semisólida (i): 90,2 g de suspensión espesa de la biomasa de algas con una concentración de sustancia seca del 12,5% en peso con respecto al peso total de la suspensión acuosa de la biomasa de algas;

30 fase acuosa (ii): 974 ml de fase acuosa que también comprendía la fase de lavado de la suspensión espesa de la biomasa de algas;

fase orgánica (iii): 300 ml de fase orgánica que presentaba un contenido de ácidos grasos igual a 6,5 g/litro (6,2% en peso con respecto a la concentración de sustancia seca inicial).

35 Se sometieron los materiales anteriores a los análisis indicados en la tabla 5 los resultados obtenidos se indican en la tabla 6.

40 TABLA 5

	Procedimiento de análisis
45 COD	Greenberg, Clescerl, Eaton, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater ("Procedimientos estándar para el examen de agua y aguas residuales") n.º 5220, 18ª Ed., Hanover Maryland, (1992)
50 Hidratos de carbono	Trevelyan y Harrison, Arch. Biochem. Biophys. 39(2): págs. 419-139 (1952)
55 Proteínas	Bradford, Bio-rad Protein Assay ("Ensayo de proteínas Bio-rad") Biochem 72, pág. 248 (1976)

65

ES 2 364 768 A1

Se midieron la cantidad de lípidos totales y la cantidad de ácidos grasos por medio de análisis mediante cromatografía de gases funcionando en las mismas condiciones descritas anteriormente: los resultados se indican en la tabla 6.

TABLA 6

	Biomasa de algas		% en peso con respecto a la suspensión acuosa de la biomasa de algas inicial		
	g/l(*)	g (**)	Fase semi-sólida (i)	Fase acuosa (ii)	Fase orgánica (iii)
COD	75,0	47,2	53,3	36,2	10,4
Hidratos de carbono	5,0	3,1	80,0	12,0	8,0
Proteínas	32,0	20,3	40,0	58,5	1,5
Lípidos totales	11,0	6,9	-	-	32,8
Ácidos grasos	0,5	0,3	-	-	651

(*): g/l en el inóculo inicial;

(**): g en la suspensión acuosa de biomasa de algas inicial

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la extracción de ácidos grasos a partir de biomasa de algas, **caracterizado** porque comprende:

- producir una suspensión acuosa de biomasa de algas;
- someter la suspensión acuosa de biomasa de algas a hidrólisis ácida y extracción mediante la adición de por lo menos un disolvente orgánico apolar y por lo menos un ácido inorgánico a dicha suspensión acuosa de biomasa de algas, de tal modo que se obtengan las tres fases siguientes:
 - (i) una fase semisólida que comprende una suspensión espesa de la biomasa de algas;
 - (ii) una fase acuosa que comprende compuestos inorgánicos y compuestos orgánicos hidrófilos;
 - (iii) una fase orgánica que comprende ácidos grasos y compuestos orgánicos hidrófobos distintos a dichos ácidos grasos.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la suspensión acuosa de biomasa de algas proviene del cultivo de algas unicelulares (microalgas), efectuado con aguas residuales que proceden de aguas residuales industriales.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque la suspensión acuosa de biomasa de algas se somete a espesamiento con el fin de obtener una mayor concentración de sustancia seca en dicha biomasa de algas.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la suspensión acuosa de biomasa de algas presenta una concentración de sustancia seca comprendida entre 3% en peso y 40% en peso con respecto al peso total de la suspensión acuosa de biomasa de algas.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque suspensión acuosa de biomasa de algas presenta una concentración de sustancia seca comprendida entre el 5% en peso y el 35% en peso con respecto al peso total de la suspensión acuosa de biomasa de algas.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el disolvente orgánico apolar se selecciona de entre hidrocarburos alifáticos tales como hexano, n-octano; hidrocarburos aromáticos, tales como isómeros de xilenos; cortes de refinería que comprenden mezclas de dichos hidrocarburos alifáticos y/o aromáticos; éteres de petróleo; o mezclas de los mismos.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque el disolvente orgánico apolar se selecciona de entre hexano, n-octano, o mezclas de los mismos.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la razón entre la concentración de sustancia seca en la biomasa de algas y el volumen de disolvente orgánico apolar está comprendida entre 1:1 y 1:80.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** porque la razón entre la concentración de sustancia seca en la biomasa de algas y el volumen de disolvente orgánico apolar está comprendida entre 1:3 y 1:70.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el ácido inorgánico se selecciona de entre ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, o mezclas de los mismos.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado** porque el ácido inorgánico se selecciona de entre ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, o mezclas de los mismos.

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la razón entre la concentración de sustancia seca en la biomasa de algas y el volumen de ácido inorgánico está comprendida entre 1:0,01 y 1:5.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, **caracterizado** porque la razón entre la concentración de sustancia seca en la biomasa de algas y el volumen de ácido inorgánico está comprendida entre 1:0,02 y 1:3.

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la hidrólisis ácida y la extracción se llevan a cabo, a presión atmosférica, al punto de ebullición del disolvente, si dicha temperatura es inferior a 100°C.

15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado** porque la hidrólisis ácida y la extracción se llevan a cabo, a presión atmosférica, a 100°C, si el punto de ebullición del disolvente es superior a 100°C.

16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado** porque la hidrólisis ácida y la extracción se llevan a cabo, a presión atmosférica, a 100°C.

17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado** porque la hidrólisis ácida y la extracción se llevan a cabo a una temperatura de 100°C, a la presión de equilibrio del disolvente a dicha temperatura.

18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la hidrólisis ácida y la extracción se llevan a cabo a un pH comprendido entre 0,5 y 3.

19. Procedimiento según la reivindicación 18, **caracterizado** porque la hidrólisis ácida y la extracción se llevan a cabo a pH 2.

20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la hidrólisis ácida y la extracción se llevan a cabo durante un tiempo comprendido entre 1 hora y 3 horas.

21. Procedimiento según la reivindicación 20, **caracterizado** porque la hidrólisis ácida y la extracción se llevan a cabo durante 2 horas.

22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el disolvente orgánico apolar y el ácido inorgánico se añaden de manera contemporánea a la biomasa de algas.

23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, **caracterizado** porque el disolvente orgánico apolar se añade a la biomasa de algas antes del ácido inorgánico.

24. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, **caracterizado** porque el disolvente orgánico apolar se añade a la biomasa de algas tras el ácido inorgánico.

25. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la fase semisólida (i) que comprende una suspensión espesa de la biomasa de algas, tras eliminar el agua residual, se somete a pirólisis con el fin de obtener aceites pirólíticos.

26. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la fase acuosa (ii) que comprende compuestos inorgánicos y compuestos orgánicos hidrófilos se somete a digestión anaerobia por medio de microorganismos en ausencia de oxígeno con el fin de obtener biogás.

27. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, **caracterizado** porque la fase (i) y la fase (ii) se mezclan y posteriormente se someten a digestión anaerobia por medio de microorganismos en ausencia de oxígeno con el fin de obtener biogás.

28. Procedimiento según la reivindicación 26 ó 27, **caracterizado** porque el disolvente orgánico apolar es ácido clorhídrico.

29. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la fase orgánica (iii) que comprende ácidos grasos y otros compuestos orgánicos hidrófobos distintos a dichos ácidos grasos se somete a evaporación con el fin de recuperar el disolvente orgánico apolar que se recircula al procedimiento.

30. Procedimiento según la reivindicación 29, **caracterizado** porque dicha fase orgánica (iii) se somete a esterificación en presencia de un alcohol que presenta entre 1 y 4 átomos de carbono y un catalizador ácido o básico, con el fin de producir glicerol y ésteres alquílicos (biodiésel).

31. Procedimiento según la reivindicación 29, **caracterizado** porque dicha fase orgánica (iii) se somete a hidrogenación/desoxigenación en presencia de hidrógeno y un catalizador con el fin de producir diésel verde.

32. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, **caracterizado** porque la fase orgánica (iii) que comprende ácidos grasos y otros compuestos orgánicos hidrófobos distintos a dichos ácidos grasos se somete directamente a esterificación, o hidrogenación/desoxigenación.

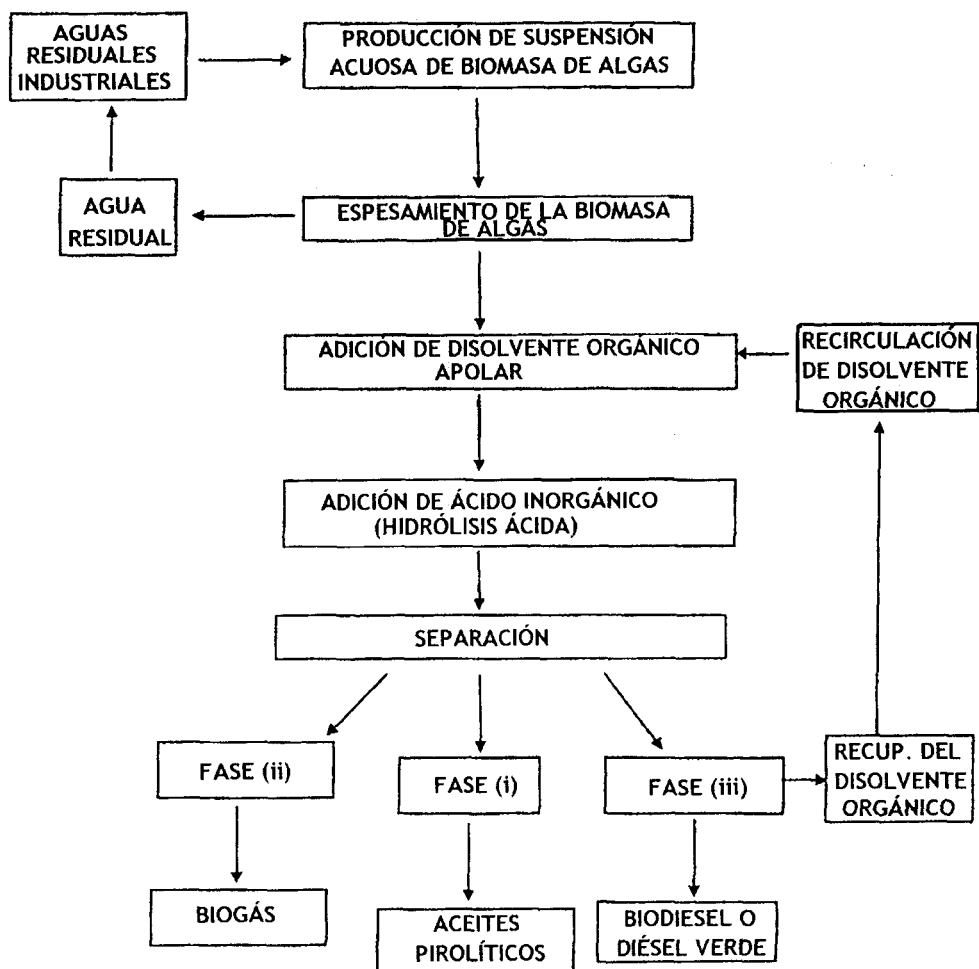


Fig. 1



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201150001

②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.06.2009

③② Fecha de prioridad: **30-06-2008**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	PYLE D et al. Production of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid from Biodiesel-Waste Glycerol by Microalgal Fermentation. Annual international meeting of the American Society of Agricultural & Biological Engineers 2007: Junio 17 - 20, 2007, Minneapolis, Minnesota, USA, 20070617; 20070617 - 20070620 American Society of Agricultural and Biological Engineers, Minneapolis, USA. No. 77028, Páginas: 6436-6445. Isbn: ISBN 978-1-60423-961-4; ISBN 1-60423-961-1.	1-32
X	BELARBI E-H et al. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. Process Biochemistry, 20000501 Elsevier Science Publishers Ltd, GB. Vol. 35, No. 9, Páginas: 951-969. Isbn: ISSN 0032-9592.	1-32
X	CRANWELL P A. Decomposition of aquatic biota and sediment formation: bound lipids in algal detritus and lake sediments. FRESHWATER BIOLOGY, 19790101 BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB. Vol. 9, No. 4, Páginas: 305 - 313. Isbn: ISSN 0046-5070.	1-32
X	KIM M K et al. Enhanced production of <i>Scenedesmus spp.</i> (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. BIORESOURCE TECHNOLOGY, 20070801 ELSEVIER BV, GB. Vol. 98, No. 11, Páginas: 2220-2228. Isbn: ISSN 0960-8524.	1-32

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
26.08.2011

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C11B1/10 (2006.01)
C11C1/04 (2006.01)
C12M1/107 (2006.01)
C12M1/00 (2006.01)
C11C3/00 (2006.01)
C12P7/64 (2006.01)

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

C11B, C11C, C12M, C12P

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, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.08.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-32	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-32	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.

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	PYLE D et al. Production of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid from Biodiesel-Waste Glycerol by Microalgal Fermentation. Annual international meeting of the American Society of Agricultural & Biological Engineers 2007: Junio 17 - 20, 2007, Minneapolis, Minnesota, USA, 20070617; 20070617 - 20070620 American Society of Agricultural and Biological Engineers, Minneapolis, USA. No. 77028, Páginas: 6436 - 6445. Isbn: ISBN 978-1-60423-961-4; ISBN 1-60423-961-1.	
D02	BELARBI E-H et al. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. Process Biochemistry, 20000501 Elsevier Science Publishers Ltd, GB. Vol. 35, No. 9, Páginas: 951-969. Isbn: ISSN 0032-9592.	
D03	CRANWELL P A. Decomposition of aquatic biota and sediment formation: bound lipids in algal detritus and lake sediments. FRESHWATER BIOLOGY, 19790101 BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB. Vol. 9, No. 4, Páginas: 305-313. Isbn: ISSN 0046-5070.	
D04	KIM M K et al. Enhanced production of <i>Scenedesmus spp.</i> (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. BIORESOURCE TECHNOLOGY, 20070801 ELSEVIER BV, GB. Vol. 98, No. 11, Páginas: 2220 - 2228. Isbn: ISSN 0960-8524.	

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

La solicitud reivindica un procedimiento para la extracción de ácidos grasos a partir de biomasa de algas que han crecido en aguas residuales procedentes de la industria. El procedimiento comprende la producción de una suspensión acuosa de biomasa de algas que se somete posteriormente a una hidrólisis ácida y a extracción mediante la adición de, por lo menos, un disolvente orgánico. La adición de este disolvente orgánico conduce a la formación de tres fases. De ellas, la llamada fase orgánica es la que contiene los ácidos grasos que se extraen mediante el procedimiento de la invención.

D01 se refiere a un procedimiento de extracción de ácidos grasos a partir de biomasa de algas. La suspensión acuosa se trata con una disolución que contiene un disolvente apolar (cloroformo) y un ácido inorgánico (ácido sulfúrico), formándose así dos fases. La existencia de una tercera fase debería considerarse implícita, ya que no se reporta la destrucción de la fase sólida correspondiente a la biomasa.

D02 describe un procedimiento para extraer ácidos grasos a partir de biomasa de algas. Se trata la pasta de algas (biomasa) con una disolución de un ácido (cloruro acético) en metanol, seguido de la adición de un disolvente apolar (hexano) para extraer los ácidos grasos. D02 revela la formación de fases, aunque no entra en detalle.

D03 y D04 describen procedimientos que incluyen hidrólisis y extracción con disolventes apolares de ácidos grasos a partir de algas.

Así, parece que todas las etapas utilizadas en el procedimiento de la reivindicación 1 pertenecerían al estado de la técnica ya conocido por el que un experto en la materia extraería ácidos grasos a partir de algas. Dado que no se ha demostrado efecto inesperado alguno en las etapas de la reivindicación 1, se considera que ésta no cumple el requisito de actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/1986. Lo mismo ocurre para las otras reivindicaciones (2-32) que no presentan característica técnica tal que en combinación con las de la reivindicación 1 pudiera satisfacer dicho requisito.

Se considera que la solicitud sí que cumple el requisito de novedad en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986.