

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 879 988**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 1/02 (2006.01)

C12N 1/18 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2016 PCT/IB2016/054734**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2017 WO17021931**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2016 E 16757968 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.04.2021 EP 3331985**

54 Título: **Método de concentración de una suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginoso de levaduras oleaginosas**

30 Prioridad:

06.08.2015 IT UB20152958

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.11.2021

73 Titular/es:

**ENI S.P.A. (100.0%)
Piazzale E. Mattei 1
00144 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**BORTOLO, ROSSELLA;
BIANCHI, DANIELE y
BALDASSARRE, MARIO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 879 988 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

5 Método de concentración de una suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginosas de levaduras oleaginosas

La presente invención se enmarca dentro del campo de las biotecnologías y se refiere a un método para concentrar una suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginosas de levaduras oleaginosas.

10 Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para concentrar, con el fin de facilitar el posterior proceso de extracción de lípidos intracelulares, una suspensión celular que comprende una biomasa de levaduras oleaginosas fermentadas en caldo de fermentación en condiciones que permiten la acumulación intracelular de lípidos, caracterizándose dicha biomasa por contener cantidades significativas de material mucilaginoso.

15 Los lípidos producidos microbiológicamente pueden usarse convenientemente para la producción de bioplásticos o como intermedios de síntesis, particularmente en el campo de la llamada "química verde", o en la producción de biocombustibles como, por ejemplo, "biodiésel" o "diésel verde", que puede utilizarse como tal o mezclado con otros combustibles para vehículos de motor.

20 Para este tipo de aplicaciones, la producción microbiológica de lípidos se propone como una alternativa ventajosa a los métodos de producción actuales a partir de fuentes renovables. Con respecto al uso de aceites vegetales, los procesos microbiológicos son independientes de factores climáticos o geográficos y no compiten con la explotación agrícola del suelo para uso alimentario. Otra ventaja radica en el hecho de que estos procesos aprovechan la propiedad de los microorganismos de reproducirse rápidamente utilizando sustratos económicos, como por ejemplo
25 derivados de la hidrólisis de materiales lignocelulósicos.

En el campo de la producción microbiológica de lípidos, las levaduras oleaginosas son particularmente prometedoras, es decir, levaduras que en condiciones de cultivo específicas son capaces de acumular lípidos en cantidades iguales o superiores al 25% de su peso seco.

30 El uso de levaduras oleaginosas para la producción de lípidos es parte de la técnica conocida.

La Solicitud de Patente Internacional WO2012/052368, por ejemplo, describe un proceso para la producción de lípidos a partir de levaduras oleaginosas seleccionadas de los géneros *Rhodotorula*, *Lypomyces*, *Trigonopsis*, *Candida*,
35 *Torulopsis* y *Pichia*, mediante procesos de fermentación en presencia de sustratos azucarados diluidos, obtenidos a partir de la hidrólisis de biomasa lignocelulósicas que incluyen al menos un polisacárido. Este proceso comprende: someter dicha biomasa que incluye al menos un polisacárido a hidrólisis ácida obteniendo una primera mezcla que comprende una primera fase sólida y una primera fase acuosa; alimentar dicha primera fase acuosa a un dispositivo de fermentación en presencia de al menos una levadura oleaginosas obteniendo un primer caldo de fermentación que
40 comprende una primera biomasa celular oleaginosas; someter dicha primera fase sólida a hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática obteniendo una segunda mezcla que comprende una segunda fase sólida y una segunda fase acuosa; alimentar dicha segunda fase acuosa a dicho dispositivo de fermentación en presencia de dicho primer caldo de fermentación obteniendo un segundo caldo de fermentación que comprende una segunda biomasa celular oleaginosas que incluye lípidos; someter al menos una parte de dicho segundo caldo de fermentación a microfiltración obteniendo un retenido y un permeado; alimentar dicho retenido a dicho dispositivo de fermentación.

Los lípidos así obtenidos se pueden utilizar ventajosamente en la producción de biodiésel o diésel verde que se pueden utilizar como tales o mezclados con otros combustibles para vehículos de motor.

50 Sin embargo, compite el uso de lípidos de origen microbiológico, tanto en la preparación de biocombustibles como, por ejemplo, biodiésel o diésel verde, como también como intermedios de síntesis, particularmente en el campo de la llamada "química verde". con el uso de combustibles e intermediarios químicos de origen fósil, que se obtienen mediante procesos casi siempre más convenientes económicamente. Por tanto, el estudio de procesos capaces de reducir los costes de producción de lípidos de origen biológico y particularmente microbiológico, y también de mejorar su rendimiento, sigue siendo de gran interés.

Uno de los mayores aspectos críticos relacionados con la producción microbiológica de lípidos radica en el hecho de que la productividad volumétrica (es decir, la cantidad de lípidos que se pueden obtener por unidad de volumen de medio de fermentación) es limitada, y generalmente inferior a 100 g/l. La aplicación industrial de estos procesos de
60 producción implica, por tanto, volúmenes de fermentación considerables de dichos microorganismos oleaginosos. Estos grandes volúmenes de suspensión celular deben ser tratados de forma natural para recuperar la biomasa resultante y proceder a la extracción de los lípidos, en plantas de gran tamaño, con elevados costes de puesta en marcha y de proceso.

65 Los métodos de extracción de los lípidos de los microorganismos oleaginosos también forman parte de la técnica conocida.

5 La Solicitud de Patente Internacional WO2012/078852, por ejemplo, describe un proceso para extraer triglicéridos de microalgas mediante tratamiento térmico de la biomasa celular en un ambiente ácido y en presencia de un solvente polar, con el fin de "acondicionar" la pared celular de las microalgas y favorecer la posterior extracción con disolvente apolar.

10 Casi todos los procesos de extracción del contenido lipídico de biomasa de microorganismos oleaginosos contemplan un paso previo a la recuperación de dichas biomasa de los medios de cultivo, al final del proceso de fermentación, que se efectúa con medios físicos como, por ejemplo, filtración, floculación o centrifugación.

15 Por supuesto, existen algunas excepciones: una de ellas, por ejemplo, está representada por la Solicitud de Patente WO2001/053512, en la que se describe un proceso de extracción de lípidos de microorganismos, donde dicha extracción puede efectuarse directamente en el medio de cultivo en un fermentador después de someter la biomasa a lisis.

20 Sin embargo, generalmente, como ya se mencionó, los procesos de extracción de lípidos de microorganismos oleaginosos incluyen una etapa preliminar de recuperación de la biomasa celular del medio de cultivo.

25 Por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional WO2012/052368 prevé que la biomasa, compuesta por células de levadura oleaginosa, se recupere después de la fermentación mediante microfiltración tangencial.

30 De forma análoga, la Solicitud de Patente Italiana MI2014A000761 describe un proceso para la producción de lípidos a partir de biomasa oleaginosa mediante fermentación, tras lo cual dicha biomasa que comprende lípidos se recupera del medio de cultivo mediante centrifugación.

35 En el documento US2001/0046691 en cambio, la biomasa oleaginosa se deshidrata completamente, transfiriendo la suspensión celular procedente del fermentador a un secador de tambor calentado y provocando así la evaporación del agua contenida en dicha suspensión.

40 Sin embargo, cabe señalar que algunas levaduras oleaginosas, como por ejemplo las levaduras de los géneros *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Trichosporon*, y otras, pueden producir bioemulsionantes y biosurfactantes (como se describe, por ejemplo, por R. Shepherd, J. Rockey, I.W. Sutherland and S. Roller en "Novel bioemulsifier from microorganisms for use in foods" (1995), J. Biotechnol., vol. 40 páginas 207-217) que dan a los cultivos líquidos de dichos microorganismos una naturaleza mucilaginoso característica. En particular, la producción de estas sustancias mucilaginosas se produce cuando se alcanzan altas concentraciones de biomasa durante las fermentaciones a escala industrial.

45 A menudo se ha observado que las propiedades tensioactivas de estas sustancias dificultan la recuperación de los microorganismos que las producen, del medio de cultivo.

50 Algunos estudios (por ejemplo, en K. Pavlova, L. Koleva, M. Kratchanova, I. Panchev "Production and characterization of an exopolysaccharide by yeast" (2004), World J. of Microbiol. & Biotechnol., Vol. 20, páginas 435-439 y en I.N.A Van Bogaert, J. Zhang, W. Soetaert "Microbial Synthesis of sophorolipids" (2011) Process Biochemistry, vol. 46, páginas 821-833) han demostrado que la biosíntesis de estas sustancias mucilaginosas en la parte de los microorganismos oleaginosos puede ser estimulada por las mismas condiciones de cultivo utilizadas para favorecer la acumulación de lípidos. Esto significa que muchas veces es posible demostrar la existencia de una correlación entre la acumulación de lípidos y la producción de sustancias mucilaginosas, en la medida en que los microorganismos que producen más lípidos son también los que, por la formación de estas sustancias, son más difícil de recuperar del medio de cultivo.

55 En estos casos, de hecho, la masa celular puede adquirir una densidad aparentemente igual a la del medio de cultivo, evitando así la separación de las fases líquida y sólida mediante técnicas como, por ejemplo, la sedimentación o centrifugación, que aprovechan la diferencia de densidad entre las fases a separar.

60 Aparentemente, la producción de sustancias mucilaginosas por parte de microorganismos mutantes hiperproductores de lípidos provoca la formación de emulsiones estables que imposibilitan la recuperación de las células microbianas del caldo de fermentación utilizando técnicas conocidas en la técnica. Un ejemplo de levadura oleaginosa que produce sustancias mucilaginosas es la levadura oleaginosa mutante *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495, descrita en la Solicitud de Patente MI2014A002292.

65 En otros casos, la producción de material mucilaginoso puede ir acompañada de un aumento significativo de la viscosidad del caldo de fermentación en el fermentador, como se puede observar por ejemplo para algunos cultivos de alta productividad (que tienen una concentración de biomasa igual a o superior a 80 g de biomasa por litro de cultivo) de levaduras de la especie *Cryptococcus* o *Trichosporon*, que pueden causar dificultad no solo durante los procesos de concentración sino incluso en la fase de descarga del caldo de fermentación de los fermentadores y transferencia para separación o tratamiento sistemas para la extracción de lípidos.

Por tanto, el Solicitante ha considerado el problema de encontrar un método para recuperar una biomasa mucilaginoso de levaduras oleaginosas a partir de un caldo de fermentación, mediante la concentración de la suspensión bacteriana que comprende dicha biomasa mucilaginoso en un volumen suficientemente reducido, cuando los métodos y técnicas utilizados típicamente en la práctica industrial para este propósito resultan ineficaces.

Como ya se ha mencionado, la alta viscosidad del caldo de fermentación y/o la reducción de la diferencia de densidad entre las fases del caldo de fermentación, pueden hacer que la centrifugación "como tal" sea totalmente inefectivo para recuperar biomasa oleaginosas del medio de cultivo.

Entre los métodos utilizados para la concentración de suspensiones celulares, se puede mencionar la filtración en membranas planas o en filtros rotativos, pero las sustancias mucilaginosas producidas por los microorganismos oleaginosos pueden bloquear rápidamente los poros de dichos filtros evitando así la permeación de la fase acuosa; recurrir a aditivos específicos (los llamados prerrevestimientos o coadyuvantes de filtración), por otro lado, además de ser poco beneficioso, puede ser desaconsejable ya que interfiere negativamente en el posterior tratamiento de extracción de los lípidos. Estos aditivos son en realidad materiales sólidos, por ejemplo, a base de derivados de celulosa o arcillas, que, al permanecer englobados en la biomasa, pueden crear problemas en la posterior fase de extracción de los lípidos (provocando, por ejemplo, el bloqueo de los filtros, la formación de sólidos depósitos, dificultades de transferencia mediante bombas, etc.).

Asimismo, la adición al caldo de fermentación de agentes floculantes o promotores de la sedimentación de la biomasa puede, en estos casos, resultar inefectivo al no ser capaces de favorecer la separación de la biomasa de la fase líquida compuesta por el caldo de fermentación. Además, la naturaleza de algunos floculantes puede ser incompatible con los posteriores procesos de extracción de lípidos, debido a la alta afinidad de estas sustancias con los disolventes utilizados en la extracción. En la práctica, estos productos podrían extraerse junto con los lípidos intracelulares y, por lo tanto, representan impurezas que deben eliminarse antes del uso de los propios lípidos.

La microfiltración tangencial, en particular si está equipada con un sistema de contrapresión de pulso inverso, para compensar la reducción del caudal debido al ensuciamiento de las membranas, puede ser efectivo para la concentración de las suspensiones celulares que comprenden biomasa muy mucilaginosas; incluso esta técnica, sin embargo, no tiene una aplicación industrial real ya que el flujo de permeación sufre una caída repentina incluso después de un corto tiempo de uso, lo que resulta en un aumento insostenible de los tiempos de tratamiento.

Finalmente, aunque los métodos que prevén la evaporación del agua contenida en el caldo de fermentación (como, por ejemplo, las técnicas de secado en tambor de biomasa, liofilización o secado por aspersión) son efectivos para concentrar suspensiones de células altamente mucilaginosas, requieren consumo de energía y en todo caso determinar la concentración simultánea de componentes presentes en el caldo de fermentación que pueden ser incompatibles con los procesos de extracción posteriores o con el uso de los lípidos extraídos.

El solicitante ha encontrado ahora un método para concentrar una suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginoso de levaduras oleaginosas que no tiene los inconvenientes indicados anteriormente.

Dicho método comprende un tratamiento térmico de la suspensión celular de levaduras oleaginosas en un ambiente de pH ácido, en condiciones que no provoquen lisis celular, para favorecer la formación de dicha suspensión celular en forma concentrada con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante centrifugación.

Se obtienen numerosas ventajas al aplicar el método de acuerdo con la presente invención.

Dicho método, por ejemplo, permite recuperar la biomasa mucilaginoso que contiene células de levadura oleaginosas intactas, es decir, sustancialmente sin que se produzca degradación de las membranas celulares de dichas levaduras ni fenómenos de lisis celular, evitando así la dispersión de los lípidos endocelulares de interés.

Para los propósitos de la presente invención, las células de levadura oleaginosas de una suspensión celular se consideran intactas en la medida en que el contenido de lípidos del caldo de fermentación eliminado de la suspensión celular al final del proceso de acuerdo con el método de la presente invención, como se describe mejor a continuación (Ejemplo 5), resulta ser sustancialmente nula.

Otra ventaja importante radica en el hecho de que la concentración de la suspensión celular efectuada de acuerdo con el método de la presente invención, permite la eliminación de la biomasa celular, junto con la fase acuosa, de los compuestos originalmente presentes en el caldo de fermentación o que se hayan formado como resultado de la fermentación, que podrían perjudicar o reducir la eficacia del tratamiento posterior de extracción de lípidos.

Otra clara ventaja del método radica en el hecho de que el volumen de la suspensión celular se puede reducir considerablemente, permitiendo así que el tratamiento posterior de extracción de lípidos se efectúe a una escala reducida, con un evidente ahorro en términos de equipamiento y reactivos (por ejemplo, disolventes) y costes de proceso.

- 5 Para los fines de la presente invención, la concentración de la biomasa en la suspensión celular se define como el peso seco de la biomasa con referencia a la unidad de volumen de suspensión. En particular, "peso seco" de la biomasa se refiere al peso de las células contenidas en un volumen conocido de suspensión celular, determinado pesando las células antes mencionadas después de eliminar todo el contenido de agua mediante tratamiento térmico en un horno ventilado a 105°C hasta peso constante (alrededor de 24 h). Entonces dicho peso puede relacionarse con 1 litro de suspensión celular, y por lo que la concentración se expresa en gramos/litro (g/l), o puede relacionarse con 100 g de suspensión celular, y en este caso la concentración de biomasa es expresado como porcentaje con respecto al peso total de la suspensión (% "en peso seco" o % ps).
- 10 Otras características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de los ejemplos de realización no limitativos.
- 15 Para los propósitos de la presente descripción y las siguientes reivindicaciones, las definiciones de los rangos numéricos siempre comprenden los extremos a menos que se especifique lo contrario.
- Para los propósitos de la presente descripción y las siguientes reivindicaciones, los porcentajes se refieren a porcentajes en peso, a menos que se especifique lo contrario.
- 20 Para los propósitos de la presente descripción y las siguientes reivindicaciones, el término "que comprende" también incluye los términos "que consiste esencialmente en" o "que consiste en".
- 25 En el sentido de la presente invención, el término "lípidos" se refiere a una categoría de sustancias, que generalmente comprenden una cadena de hidrocarburo alifático en la molécula, que se disuelven en disolventes orgánicos apolares y son poco solubles en agua. Los lípidos forman un grupo esencial de moléculas en las células vivas y comprenden, por ejemplo, grasas, aceites, ceras, ésteres de ceras, esteroides, terpenoides, isoprenoides, carotenoides, polihidroxicanoatos, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos, fosfolípidos, glicolípidos, esfingolípidos y acilglicerol como monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos.
- 30 Para los fines de la presente invención y con particular referencia a los cultivos de microorganismos y en particular cultivos de levaduras, el término "mucilago" se refiere a un complejo de sustancias orgánicas similar a un gel, capaz de retener líquidos, caracterizado por una consistencia viscosa y gomosa. Los mucílagos pueden consistir, por ejemplo, en mezclas de polisacáridos, glicolípidos, lipopéptidos, glicopéptidos, complejos polisacárido-lípido, complejos polisacárido-proteína. En algunos casos, los cultivos de levadura altamente mucilaginosos se caracterizan por viscosidades elevadas, iguales o superiores a 15 mPa·s (K. Pavlova, L. Koleva, M. Kratchanova, I. Panchev "Production and characterization of an exopolysaccharide by yeast" (2004), World Journal of Microbiol & Biotechnol., Vol. 20 páginas 435-439).
- 35 Para los fines de la presente invención, el término "microorganismo mucilaginoso" se refiere a un microorganismo que, en condiciones normales o fisiológicas, o en condiciones de estrés metabólico, o en presencia de sustratos específicos y/o en condiciones particulares de fermentación, produce mucílagos. El cultivo de microorganismos mucilaginosos conduce a la producción de "biomasas mucilaginosas".
- 40 En el sentido de la presente invención, el término "biodiésel" se refiere a un combustible para motores diésel que comprende ésteres de alquilo (por ejemplo, ésteres de metilo, propilo o etilo) de ácidos grasos de cadena larga derivados de fuentes biológicas.
- 45 En el sentido de la presente invención, el término "diésel verde" se refiere a un combustible para motores diésel que comprende productos de hidrogenación o desoxigenación de lípidos derivados de fuentes biológicas en presencia de hidrógeno y al menos un catalizador.
- 50 Para los fines de la presente invención, el término "bioplástico" se refiere a un tipo de plástico reciclable derivado de materias primas renovables de origen biológico, o es biodegradable, o tiene ambas propiedades.
- 55 Para los fines de la presente invención, el término "materia prima renovable" se refiere a una composición que se deriva al menos parcialmente de una fuente y/o un proceso que, debido a características naturales o al efecto de la actividad humana, se considera no es "agotable", es decir, se renueva con el tiempo y, por lo tanto, está disponible casi indefinidamente para su explotación.
- 60 Para los fines de la presente invención, la expresión "microorganismo oleaginoso" se refiere a un microorganismo capaz de acumular lípidos en una cantidad igual o superior al 25% de su peso celular seco. Las levaduras oleaginosas se incluyen entre los microorganismos oleaginosos.
- 65 Algunas variantes de levadura oleaginosa pueden ser capaces de acumular lípidos en un porcentaje igual o superior al 40% con respecto a su peso celular seco. En condiciones particulares, una levadura oleaginosa puede acumular lípidos en un porcentaje preferiblemente igual o superior al 60% con respecto a su peso celular seco.

Para los fines de la presente invención, las expresiones "cultivar" y "cultivo" indican los procesos mediante los cuales las células de un microorganismo crecen y se reproducen en condiciones controladas por el ser humano. La "fermentación" de la levadura oleaginosa, efectuada en algunas realizaciones de la invención, cae dentro de los procesos definidos por las expresiones mencionadas anteriormente.

Para los propósitos de la presente invención, las expresiones "medio" o "caldo" de fermentación (o cultivo), indican un líquido, o un gel, preparado para sostener el crecimiento de microorganismos, por ejemplo células de levadura oleaginosa.

Para los fines de la presente invención, el término "biomasa" se refiere a la combinación de células y/o material celular derivado de plantas, animales o microorganismos. En un aspecto preferido, las biomásas pueden derivar de células y/o material celular derivado de hongos, bacterias, levaduras, mohos y microalgas. Dichas biomásas pueden ser típicamente de origen natural. En algunas realizaciones de la invención, dichas biomásas pueden estar compuestas por mutantes naturales, mutantes inducidos u organismos modificados genéticamente. Preferiblemente, dichas biomásas se producen mediante fermentación u otros modos de cultivo.

Un objeto de la presente invención se refiere a un método para concentrar una suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginoso de levaduras oleaginosas, comprendiendo el método anterior las siguientes etapas:

a) cultivar dichas levaduras oleaginosas en un caldo de fermentación obteniendo así una suspensión celular que comprende dicha biomasa mucilaginoso;

b) someter la suspensión celular obtenida de la etapa a) a tratamiento térmico, a una temperatura dentro del rango de 95°C a 120°C y tratamiento ácido, obteniendo así una suspensión celular tratada que comprende dicha biomasa mucilaginoso que contiene células de levadura oleaginosas intactas;

c) concentrar la suspensión celular tratada obtenida en la etapa b) que comprende un paso para eliminar al menos parte de dicho caldo de fermentación obteniendo así una suspensión celular concentrada.

Las levaduras oleaginosas se seleccionan preferiblemente del grupo que comprende los géneros *Yarrowia*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Trigonopsis*, *Torulopsis*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* y consorcios de los mismos, preferiblemente *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Rhodospiridium* o consorcios de los mismos.

Las levaduras anteriores acumulan preferentemente lípidos en una cantidad igual o superior al 25%, preferentemente igual o superior al 40%, más preferentemente igual o superior al 60%, incluso más preferentemente igual o superior al 70% de su peso seco.

En un aspecto preferido, dichas levaduras oleaginosas pueden estar representadas por células de la levadura *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495.

La cepa mutante de levadura oleaginosa *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495 se obtuvo con métodos de mutagénesis *in vitro*, como se describe en la Solicitud de Patente Italiana MI2014A002292 presentada por el solicitante, y se caracteriza por rendimientos de acumulación intracelular de lípidos significativamente mayores con respecto a la cepa de tipo salvaje de la misma especie *Rhodospiridium azoricum* cuando se cultiva en un caldo de fermentación enriquecido con fuentes de nitrógeno.

Los caldos de fermentación pueden comprender soluciones de azúcares obtenidos de plantas con almidón o frutos azucarados (azúcares de primera generación). En otras realizaciones, se pueden utilizar caldos que comprenden azúcares obtenidos por tratamiento hidrolítico y sacarificación de biomásas lignocelulósicas no comestibles (azúcares de segunda generación).

En un aspecto preferido de la presente invención, el caldo de fermentación en donde se efectúa la fermentación de la levadura oleaginosa, puede derivar de la hidrólisis de biomásas lignocelulósicas.

En el sentido de la presente invención, los términos "material lignocelulósico" y "biomasa lignocelulósica" se refieren a una estructura compleja de origen vegetal que comprende celulosa, hemicelulosa y lignina. Los azúcares se obtienen a partir de este material, mediante tratamientos fisicoquímicos y enzimáticos conocidos en la técnica, que pueden ser utilizados como fuentes de carbono en procesos de fermentación de microorganismos para la producción de alcoholes y/o lípidos. En un aspecto preferido de la presente invención, los azúcares obtenidos de plantas con contenido de almidón o frutos azucarados (azúcares de primera generación) u obtenidos por tratamiento hidrolítico y sacarificación de biomásas lignocelulósicas no comestibles (azúcares de segunda generación), se alimentan a un fermentador en el cual se inocula un precultivo de levaduras oleaginosas. Además de los azúcares, también se pueden alimentar al fermentador otros nutrientes como vitaminas, sales o compuestos nitrogenados. El caldo de fermentación utilizado en la etapa a) anterior del método de acuerdo con la invención procede preferiblemente de la hidrólisis de biomásas lignocelulósicas.

Durante la etapa b) anterior en la que la suspensión celular se somete a tratamiento térmico y tratamiento de acidificación, la suspensión anterior se puede mantener sin agitación o se puede someter a agitación lenta, intermitente o continua. En un aspecto preferido, la suspensión celular se puede mantener bajo agitación lenta.

5 El tratamiento térmico se lleva a cabo preferiblemente durante un tiempo que varía de 3 a 12 horas, preferiblemente durante un tiempo que varía de 4 a 8 horas.

10 El tratamiento térmico se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura dentro del intervalo de 100°C a 110°C. Se puede obtener un tratamiento equivalente con diferentes combinaciones de tiempo y temperatura. Cuanto mayor sea la temperatura a la que se lleve a cabo dicho tratamiento térmico, por ejemplo, menor será el tiempo necesario. En particular, en un aspecto preferido de la presente invención, el tratamiento térmico se puede llevar a cabo a 100°C durante aproximadamente 8 horas. En otro aspecto preferido de la presente invención, el tratamiento térmico se puede llevar a cabo a 110°C durante aproximadamente 4 horas.

15 Cabe señalar que el tratamiento térmico anterior se diferencia de otros tratamientos térmicos y/o pretratamientos descritos en la técnica conocida, como dichos pretratamientos, cuya finalidad es "pasteurizar" biomásas de microorganismos oleaginosos y permiten su conservación por largos periodos de tiempo antes de la extracción de los lípidos intracelulares, se realizan por tiempos muy reducidos y no incluyen el tratamiento con ácido en el protocolo estándar. Estos tratamientos de pasteurización, de hecho, han demostrado ser completamente ineficaces para concentrar suspensiones celulares que comprenden biomásas mucilaginosas de levaduras oleaginosas.

20 El método de la presente invención, por el contrario, caracterizado por un efecto sinérgico ligado al tratamiento de acidificación combinado con el tratamiento térmico durante un tiempo convenientemente establecido, permite inesperadamente que dichas suspensiones celulares se concentren sin dificultad alguna.

Después del tratamiento de acidificación de acuerdo con la presente invención, el pH de la suspensión celular puede estar dentro del intervalo de 1.5 a 6.0 y preferiblemente dentro del intervalo de 2.0 a 4.5.

30 El tratamiento de acidificación se puede efectuar durante el tratamiento térmico. En un aspecto preferido, el tratamiento térmico está precedido por el tratamiento de acidificación anterior.

35 El tratamiento de acidificación se lleva a cabo preferiblemente mediante la adición de un ácido de Brønsted orgánico o inorgánico, preferiblemente un ácido inorgánico.

El ácido se selecciona preferiblemente del grupo que comprende ácido acético, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido bórico, ácido fluorhídrico, ácido bromhídrico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido propiónico o mezclas de los mismos, más preferiblemente ácido sulfúrico.

40 Debe observarse que el ácido usado en el método de acuerdo con la presente invención puede tener cualquier concentración y, por lo tanto, puede ser un ácido diluido en agua o un ácido concentrado, y es preferiblemente un ácido concentrado.

45 Preferiblemente, la concentración final de dicho ácido, es decir, su concentración en el volumen total de suspensión celular al final del tratamiento de acidificación, puede estar comprendida dentro del rango de 0.05% a 0.5% p/v, y preferiblemente puede ser comprendido dentro del intervalo de 0.2% a 0.3% p/v.

50 Un experto en la materia puede determinar cuál es la concentración final de ácido más adecuada, teniendo en cuenta que el pH de la suspensión celular, al final de la adición de dicho ácido, debe estar dentro de los rangos especificados anteriormente.

55 Preferiblemente, la etapa c) anterior de concentración de la suspensión celular puede realizarse mediante sedimentación espontánea o por gravedad, sifón, evaporación al vacío, liofilización, floculación, microfiltración o centrifugación, y dicha etapa se realiza aún más preferiblemente por centrifugación. En un aspecto particularmente preferido, la etapa c) puede realizarse mediante centrifugación discontinua o mediante centrifugación continua. En este último caso, se puede utilizar una centrifuga decantadora con separación por sobreflujo o una centrifuga de platos.

60 Cuando la concentración de la suspensión celular que comprende la biomasa mucilaginosa de levaduras oleaginosas tras el tratamiento térmico y el tratamiento de acidificación de acuerdo con dicho método, se realiza mediante centrifugación, dicha centrifugación puede efectuarse con una aceleración en el rango de 1000 x g a 6000 x g, preferiblemente dentro del rango de 2000 x g a 5000 x g e incluso más preferiblemente se lleva a cabo con una aceleración dentro del rango de 3000 a 4000 x g.

65 Después de la centrifugación, la biomasa mucilaginosa constituida por levaduras oleaginosas puede formar un sedimento en el fondo del recipiente de centrifugación o puede concentrarse en una capa que flota sobre la superficie

del medio de cultivo. En este caso, el infranadante claro compuesto por el caldo de fermentación, se puede retirar de la biomasa flotante mediante un sifón de succión o descargando dicho infranadante claro a través de una válvula convenientemente colocada en correspondencia con el fondo del recipiente.

5 Cabe señalar que el método de la presente invención permite obtener una suspensión celular concentrada, que comprende células de levadura oleaginosas intactas, es decir, sin que se produzcan roturas de las células de levadura. De hecho, se ha demostrado (Ejemplo 5 proporcionado más adelante) que no se puede encontrar la presencia de lípidos en el caldo de fermentación eliminado de la biomasa al final del proceso de acuerdo con dicho método.

10 Sin pretender imponer ninguna teoría en particular, se asume que el método de la presente invención favorece la degradación de las sustancias mucilaginosas presentes en la superficie de las células de levadura para facilitar la agregación de las mismas células y favorecer la separación del caldo de fermentación. Al evitar la destrucción de la pared celular, se obtiene la doble ventaja de evitar la dispersión de los lípidos intracelulares por filtración al medio de cultivo y limitar el contenido de material biológico y orgánico en la fase acuosa lo que aumentaría la DQO (Demanda Química de Oxígeno) y puede requerir un tratamiento específico de los medios agotados antes de ser eliminados.

15 Gracias al método de acuerdo con la presente invención, tras la eliminación de al menos parte del caldo de fermentación en la etapa c) de dicho método, la concentración de biomasa en la suspensión celular obtenida puede oscilar entre el 19.0% en peso seco y el 35.0% en peso seco, y la concentración varía preferiblemente de 21.0% en peso seco a 30.0% en peso seco.

20 Después de concentrar la suspensión celular que comprende la biomasa de levaduras oleaginosas con el proceso de acuerdo con el método de la presente invención, la biomasa anterior puede ser sometida al proceso de lisis y posterior extracción de los lípidos con cualquiera de los procesos de la técnica conocida.

25 De acuerdo con el método descrito en la Solicitud de Patente WO2012/052368, por ejemplo, la biomasa se puede transferir a un autoclave donde se puede someter a un tratamiento térmico adicional a 140°C durante 4 horas, para provocar su lisis. La suspensión obtenida se puede transferir luego a un reactor y someterse a extracción con al menos un disolvente orgánico polar inmiscible con agua (por ejemplo, etil-tert-butil-éter, metil-iso-butil-cetona, acetato de etilo) o al menos un disolvente orgánico apolar (por ejemplo, isooctano, hexano o mezclas de parafinas lineales o ramificadas que tienen un número de átomos de carbono de 5 a 10, benceno, tolueno o xileno puro o en una mezcla con disolventes polares solubles en agua (por ejemplo, etanol, propanol, isopropanol).

30 Después de extraerse en un disolvente orgánico, la mezcla de triglicéridos contenida en las células puede aislarse por evaporación del propio disolvente orgánico.

35 La fracción lipídica se puede analizar mediante técnicas cromatográficas, por ejemplo mediante cromatografía de gases o mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de acuerdo con procesos de la técnica conocida.

40 Mediante estos métodos analíticos se ha comprobado que los lípidos acumulados en las células de levadura oleaginosa están representados por al menos un 90% de triglicéridos, preferentemente ésteres de glicerol de ácidos grasos de 8 a 24 átomos de carbono, como, por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido α -linoleico.

45 Otros lípidos que pueden estar presentes son: fosfolípidos, monoglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres o mezclas de los mismos.

50 Los lípidos obtenidos de acuerdo con el procedimiento objeto de la presente invención se pueden utilizar ventajosamente como intermedios de síntesis, particularmente en el campo de la denominada "química verde". También se pueden someter a transesterificación en presencia de al menos un alcohol de 1 a 4 átomos de carbono, preferiblemente metanol o etanol, y al menos un catalizador ácido o básico, para producir glicerol y alquil ésteres, en particular metil ésteres o ésteres etílicos (biodiésel).

55 Alternativamente, dichos lípidos pueden someterse a hidrogenación/desoxigenación en presencia de hidrógeno y al menos un catalizador para producir "diésel verde". Los procesos de hidrogenación/desoxigenación son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Europea EP 1 728 844.

60 Se proporcionan algunos ejemplos no limitantes para una mejor ilustración de la presente invención y para su realización práctica.

Ejemplo 1 (fermentación de la levadura oleaginosa *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495)

A continuación se proporciona un ejemplo de la preparación de una suspensión celular de la levadura oleaginosa *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495.

65

ES 2 879 988 T3

En un matraz de 1 l se introdujeron 200 ml de medio YEPD (extracto de levadura 10 g/l, peptona 10 g/l, glucosa 20 g/l) previamente esterilizado en autoclave a 80°C durante 45 minutos.

5 El caldo de fermentación inicial así obtenido se inoculó con una muestra de la cepa de levadura oleaginosa *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495.

10 Este precultivo se mantuvo a 30°C con agitación a 200 rpm durante 24 horas, y luego se transfirió a un fermentador de 20 l que contenía 8 l de un medio que contenía glucosa 50 g/l, sólidos empapados de maíz 5 g/l, extracto de levadura 2 g/l, KH₂PO₄ 6 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.3 g/l, NaCl 0.06 g/l CaCl₂·2H₂O 0.06 g/l, previamente esterilizado a 80°C durante 45 minutos.

15 Este primer cultivo en el fermentador se mantuvo a 30°C durante 24 horas, en condiciones aeróbicas mediante insuflación de 1 l/min de aire estéril y agitación variando de 600 a 900 rpm, modulado con el flujo de aire de manera que se mantenga la concentración de oxígeno disuelto (DO₂) igual al 30% del valor de saturación.

20 Al cabo de 24 horas, la suspensión celular obtenida se transfirió, mediante una bomba peristáltica, a un fermentador de 200 l, que contenía 80 l de un medio que contenía glucosa 80 g/l, sólidos escarpados de maíz 8 g/l, extracto de levadura 3.2 g/l, KH₂PO₄ 6 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.3 g/l, NaCl 0.06 g/l CaCl₂·2H₂O 0.06 g/l, (NH₄)₂SO₄ 8 g/l previamente esterilizado a 121°C durante 20 minutos.

25 Este segundo cultivo en el fermentador también se mantuvo a 30°C durante 24 horas, en condiciones aeróbicas mediante insuflación de aire estéril y agitación variando de 600 a 900 rpm, modulado con el flujo de aire para mantener la concentración de oxígeno disuelto (DO₂) igual al 30% del valor de saturación, y a un pH igual a aproximadamente 5.0, mantenido mediante la adición, cuando sea necesario, de unas gotas de una solución de KOH 5 M o H₂SO₄ al 10% (vol/vol).

30 Al cabo de 24 horas, se determinó el contenido de glucosa residual de acuerdo con procesos conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando un analizador enzimático de membranas tal como un analizador bioquímico YSI 2900, o mediante cromatografía de intercambio iónico (HPAE-PAD), utilizando un cromatógrafo Dionex, equipado con una columna Carbobac PA100, con un gradiente de hidróxido de sodio y acetato de sodio como contraión.

35 Luego se conectaron dos tanques al fermentador: se introdujo una solución estéril de glucosa 614 g/l, en uno de estos tanques, se alimentó al fermentador en continuo con un caudal promedio de 1 l/h de acuerdo con la cinética de consumo del microorganismo en el cultivo, para mantener una concentración constante de glucosa en el cultivo igual a 30 g/l. Se introdujo una solución estéril de extracto de levadura 80 g/l y (NH₄)₂SO₄ 200 g/l, en el segundo tanque, alimentado al fermentador en continuo con un caudal promedio de 400 ml/h.

A continuación, se continuó la fermentación en las condiciones descritas anteriormente durante un total de 117 horas.

40 Al final, se descargó la suspensión celular (un total de 187 kg) del fermentador y posteriormente se realizaron pruebas de concentración. La suspensión celular así obtenida se caracterizó por una concentración de la biomasa igual a 112.3 g/l de peso seco celular (ps), o 11.23% ps y un contenido total de lípidos igual al 51% en peso, con respecto al peso seco de las celdas. Además, dicha suspensión se caracterizó por una viscosidad, medida a 30°C con un microviscosímetro Stabinger SVR 3000 Anton Paar ("tasa de cizallamiento" 1/1000) igual a 4.1 mPa·s, una densidad de 1.023 g/cm³ a 30°C y un aspecto mucilaginoso.

45 Ejemplo 2 de acuerdo con la invención (ensayo de concentración de una suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginosa de levadura oleaginosa *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495 mediante tratamiento térmico a 100°C y tratamiento de acidificación).

50 El presente ejemplo muestra que el tratamiento térmico a 100°C junto con un tratamiento de acidificación de la suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginosa de levadura oleaginosa es efectivo para concentrar adecuadamente la misma suspensión celular.

55 Se introdujeron 200 ml de suspensión celular obtenida de acuerdo con el proceso del Ejemplo 1 anterior, en un autoclave de 500 ml y 0.4 g de H₂SO₄ 96% (correspondiente a una concentración de ácido igual a 0.2% en peso con respecto al volumen de la misma suspensión). El pH obtenido fue igual a 3.2. A continuación, la suspensión celular se llevó a 100°C y se mantuvo a esta temperatura durante 8 horas con agitación lenta. Al final, después de enfriar, se observó la separación de un infranadante claro y una fase superior constituida por la biomasa celular separada.

60 Después de enfriar, la suspensión celular se descargó del autoclave y se introdujo en recipientes de centrifugación y se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos a 20°C con una centrífuga Thermo-Scientific IEC-CL31R Multispeed.

65 Al final de la centrifugación, la suspensión celular que comprende células ricas en lípidos se concentró en una fase superior "flotante" sobre un infranadante claro compuesto por el caldo de fermentación. Luego de remover el

infranadante claro, se obtuvieron 85.73 ml de suspensión celular concentrada, caracterizada por una concentración de biomasa igual a 26.2% ps, adecuada para los propósitos del proceso posterior de extracción de lípidos.

5 Ejemplo 3 de acuerdo con la invención (ensayo de concentración de una suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginoso de levadura oleaginoso *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495 mediante tratamiento térmico a 110°C y tratamiento de acidificación).

10 El presente ejemplo muestra que el tratamiento térmico a 110°C junto con un tratamiento de acidificación de la suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginoso de levadura oleaginoso también es efectivo para concentrar adecuadamente la misma suspensión celular.

15 Se introdujeron 200 ml de suspensión celular obtenida de acuerdo con el proceso del Ejemplo 1 anterior, en un autoclave de 500 ml y 0.4 g de H₂SO₄ 96% (correspondiente a una concentración de ácido igual al 0.2% en peso con respecto al volumen de la suspensión). El pH obtenido fue igual a 3.2. A continuación, la suspensión celular se llevó a 110°C y se mantuvo a esta temperatura durante 4 horas con agitación lenta. Después de enfriar, la suspensión celular se descargó del autoclave y se introdujo en recipientes de centrifugación y se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos a 20°C con una centrífuga Thermo-Scientific IEC-CL31R Multispeed.

20 Al final de la centrifugación, la suspensión celular que comprende células ricas en lípidos se concentró en una fase superior "flotante" sobre un infranadante claro compuesto por el caldo de fermentación. Luego de remover el infranadante claro, se obtuvieron 80 ml de suspensión celular concentrada, caracterizada por una concentración de biomasa igual a 28.1% ps, adecuada para los propósitos del proceso posterior de extracción de lípidos.

25 Ejemplo 4 de acuerdo con la invención (concentración de una suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginoso de levadura oleaginoso *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495 mediante tratamiento térmico a 110°C y tratamiento de acidificación).

30 El presente ejemplo muestra que el tratamiento térmico a 110°C junto con un tratamiento de acidificación de la suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginoso de levadura oleaginoso, efectuado de acuerdo con el Ejemplo 3 anterior, es efectivo para concentrar adecuadamente dicha suspensión celular incluso cuando se aplica a gran escala.

35 Se introdujeron 14.4 kg de suspensión celular obtenida de acuerdo con el proceso del Ejemplo 1 anterior, en un autoclave de 20 l y 28.8 g de H₂SO₄ 96% (correspondiente a una concentración de ácido igual a 0.2% en peso con respecto al volumen de la misma suspensión celular). El pH obtenido fue igual a 3.2. A continuación, la suspensión celular se llevó a 110°C y se mantuvo a esta temperatura durante 4 horas con agitación lenta. Al final, después de enfriar, la suspensión celular completa se descargó del autoclave y se introdujo en recipientes de centrifugación y se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos a 20°C con una centrífuga Beckman Coulter Avanti J-26XP con un rotor de ángulo fijo JLA-8.1000.

40 Después de la centrifugación, la suspensión celular que comprende células ricas en lípidos se concentró en una fase superior "flotante" sobre un infranadante transparente compuesto por el caldo de fermentación. Luego de remover el infranadante claro, se obtuvieron 7.7 kg de suspensión celular concentrada, caracterizada por una concentración de biomasa igual a 21.2% ps, adecuada para los propósitos del proceso de extracción de lípidos posterior.

45 Ejemplo 5 (determinación del contenido lipídico del infranadante obtenido tras tratamiento térmico a 110°C y tratamiento de acidificación)

50 El presente ejemplo muestra que el tratamiento térmico junto con el tratamiento de acidificación permite obtener una suspensión celular, en la cual las células de levadura oleaginosas están intactas, es decir, no provoca la lisis de las células oleaginosas.

55 Se introdujeron 500 ml de infranadante de centrifugación claro obtenido de acuerdo con el proceso del Ejemplo 4 anterior en un reactor de vidrio encamisado, equipado con agitador y condensador. Se añadió 1 l de isooctano puro (99.8%) a dicho infranadante, se llevó la temperatura a 80°C con agitación para tener una mezcla perfecta de las dos fases líquidas inmiscibles. La suspensión se mantuvo en estas condiciones de temperatura y agitación durante 2 horas, y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente sin agitar, con el fin de favorecer la separación de la fase acuosa subyacente de la fase orgánica superior, que se retiró y se recogió en un matraz de destilación, del que luego se evaporó el disolvente al vacío. El análisis del residuo después de la evaporación del disolvente confirmó que no contenía lípidos.

60 Ejemplo 6 (comparativo) (ensayo de concentración de una suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginoso de levadura oleaginoso *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495 mediante centrifugación)

Se comparó el método de concentración de una suspensión celular de acuerdo con la presente invención con las técnicas utilizadas como práctica habitual para recuperar la biomasa tras la fermentación, mediante unos ensayos sobre muestras de suspensión celular obtenidas con el proceso del Ejemplo 1.

5 El presente ejemplo muestra que la centrifugación no es efectiva para concentrar adecuadamente la suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginoso de levadura oleaginoso, a menos que esté precedida por el tratamiento de acuerdo con el método de la presente invención.

10 Se introdujeron 14 ml de suspensión celular obtenida como se describe en el Ejemplo 1 en un tubo de ensayo de centrifuga graduado y se sometieron a centrifugación en una centrifuga Thermo-Scientific IEC-CL31R Multispeed a 3000 x g durante 5 minutos a 20°C. Al final de la centrifugación, se observó la separación de 2 ml de infranadante claro, mientras que el volumen restante (12 ml, igual a 85.7% vol/vol) permanece turbio. A continuación, la suspensión celular se concentró 1.16 veces, alcanzando una concentración de biomasa igual a 13.1% en peso seco. Este valor no es adecuado para los fines del proceso de extracción de lípidos posterior.

15 Ejemplo 7 (comparativo) (ensayo de concentración de una suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginoso de levadura oleaginoso *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495 mediante tratamiento térmico y centrifugación)

20 El presente ejemplo muestra que el simple tratamiento térmico del caldo de fermentación antes de la centrifugación no es efectiva, por sí sola, para concentrar adecuadamente la suspensión que comprende una biomasa mucilaginoso de levadura oleaginoso.

25 Se introdujeron 200 ml de suspensión celular obtenida como se describe en el Ejemplo 1 en un autoclave de 500 ml y se llevaron a 110°C durante 4 horas con agitación lenta.

30 Al final, se introdujeron 14 ml de suspensión celular sometida a tratamiento térmico en un tubo de ensayo de centrifuga graduada y se sometieron a centrifugación en una centrifuga Thermo-Scientific IEC-CL31R Multispeed a 3000 x g durante 5 minutos a 20°C. Al final de la centrifugación, se observó la separación de 0.5 ml de infranadante claro, mientras que el volumen restante (13.5 ml, igual a 96.4% vol/vol) permanece turbio. A continuación, la suspensión celular se concentró sólo 1.04 veces, alcanzando una concentración de biomasa igual al 11.6% en peso seco. Este valor no es adecuado para los fines del proceso de extracción de lípidos posterior.

35 Ejemplo 8 (comparativo) (ensayo de concentración de una suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginoso de levadura oleaginoso *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495 mediante la adición de ácido y centrifugación)

40 El presente ejemplo muestra que el tratamiento simple con ácido sin tratamiento térmico de la suspensión celular antes de la centrifugación no es efectivo, por sí solo, para concentrar adecuadamente la suspensión celular en sí.

45 Se introdujeron 200 ml de suspensión celular obtenida como se describe en el Ejemplo 1, en un matraz de 500 ml y 0.4 g de H₂SO₄ 96% (correspondiente a una concentración de ácido igual al 0.2% en peso con respecto al volumen de la celda suspensión). El pH obtenido es igual a 3.2. A continuación, el matraz se coloca en un agitador orbital (MPM Instruments) con la temperatura fijada a 30°C y se mantiene bajo agitación lenta durante 8 horas.

50 Al final, se introdujeron 14 ml de suspensión celular sometida a tratamiento en un tubo de ensayo de centrifuga graduado y se sometieron a centrifugación en una centrifuga Thermo-Scientific IEC-CL31R Multispeed a 3000 x g durante 5 minutos a 20°C. Al final de la centrifugación, no se observó separación de fases, lo que demuestra que el tratamiento efectuado no es el adecuado para obtener una concentración de la suspensión celular al nivel deseado.

Ejemplo 9 (comparativo) (ensayo de concentración de una suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginoso de levadura oleaginoso *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495 mediante microfiltración tangencial)

55 El presente ejemplo muestra que la microfiltración tangencial, como la centrifugación, no es efectiva para concentrar adecuadamente la suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginoso de levadura oleaginoso, a menos que esté precedida por el tratamiento de acuerdo con el método de la presente invención.

60 Se sometieron 93.6 kg de suspensión celular obtenida como se describe en el Ejemplo 1 a microfiltración tangencial utilizando la planta Hydro Air HAR P19 en modo de "pulso inverso" y membranas cerámicas de 0.2 µm.

La microfiltración se realizó durante 6 horas a temperatura ambiente a un valor de caudal igual a 8000 l/h, produciendo 40.5 kg de retenido (suspensión celular concentrada) y 53.1 kg de permeado (caldo de fermentación exento de células). La suspensión celular concentrada se caracteriza por una concentración de biomasa igual a 195 g/l (es decir, 19.5% en peso seco). Este valor resulta apenas adecuado para los fines del proceso de extracción de lípidos posterior.

65

Sin embargo, durante la microfiltración, el flujo de permeación descendió desde los 60 kg·h⁻¹·m⁻² iniciales hasta aproximadamente 10 kg·h⁻¹·m⁻². Dicho flujo de permeación final es demasiado bajo para ser aplicado convenientemente a un proceso industrial.

5 La suspensión celular utilizada, que comprende una biomasa mucilaginoso de *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495, aparentemente provocó un deterioro en las prestaciones de la membrana filtrante utilizada en el proceso de microfiltración. Incluso si, de hecho, al final del proceso de microfiltración, las membranas se regeneraron de acuerdo con las instrucciones del productor lavándolas con 150 l de agua destilada durante aproximadamente 5 horas, seguidos de 60 l de una solución de NaOH al 0.5% en peso durante 5 horas más y finalmente con 150 l más de agua
10 destilada durante 5 horas más, los flujos de permeación no se restablecieron a los valores característicos de la membrana.

En conclusión, incluso si la microfiltración tangencial fuese efectiva para concentrar la suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginoso de levadura oleaginoso, esta técnica en la práctica no se puede aplicar al
15 proceso industrial debido a la degradación en las prestaciones del dispositivo tras un único tratamiento.

Ejemplo 10 (comparativo) (ensayo de concentración de una suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginoso de levadura oleaginoso *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495 mediante floculación)

20 El presente ejemplo muestra que la floculación, como la centrifugación y la microfiltración tangencial, no es efectiva para concentrar adecuadamente la suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginoso de levadura oleaginoso, a menos que esté precedida por el tratamiento de acuerdo con el método de la presente invención.

Se introdujeron 200 ml de suspensión celular obtenida como se describe en el Ejemplo 1, en un cilindro graduado de
25 500 ml, y se añadió una suspensión floculante catiónica a base de poliacrilamida (BASF Zetag® 9068FS), muy lentamente y bajo suave agitación a dicha suspensión, a temperatura ambiente (20°C); el inicio de la floculación se observó después de la adición de 0.5 g de agente floculante, correspondiente a una dosis igual a aproximadamente 2.5 kg/m³ de suspensión. Esta cantidad se considera excesiva para su aplicación en procesos industriales, sobre todo por el hecho de que en cualquier caso la eficacia del tratamiento no es satisfactoria. Al final de la adición del agente
30 floculante, de hecho, sólo se separaron 50 ml de caldo de fermentación claro, con la consecuente concentración de biomasa en la suspensión celular desde el 11.3% en peso seco inicial al 15.0% en peso seco. Este valor no es adecuado para los fines del proceso de extracción de lípidos posterior.

Ejemplo 11 (extracción de lípidos de la suspensión celular concentrada que comprende una biomasa mucilaginoso de
35 levadura oleaginoso)

El presente ejemplo muestra que la suspensión celular concentrada obtenida con el método de acuerdo con la presente invención se puede someter ventajosamente a un proceso de extracción de lípidos intracelulares.

40 Se introdujeron 5.9 kg de suspensión celular concentrada obtenida de acuerdo con el Ejemplo 4 anterior, y correspondientes a 1.25 kg de peso seco celular, en un autoclave de 20 l, se llevó a 140°C y se mantuvo a esta temperatura durante 4 horas.

Al final del tratamiento, la suspensión obtenida se transfirió a un reactor de vidrio encamisado de 30 l equipado con
45 agitador y condensador. Se añadieron a la suspensión 3 l (igual a 2.073 g) de isooctano puro (99.8%), se llevó la temperatura a 80°C con agitación para garantizar una mezcla perfecta de las dos fases inmiscibles. La mezcla se mantuvo en estas condiciones de temperatura y agitación durante 2 horas, y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente (20°C) sin agitar, con el fin de favorecer la separación de la fase acuosa subyacente de la fase orgánica superior, que se retirados y recogidos en un recipiente apropiado.

50 El proceso de extracción con isooctano a 80°C durante 2 horas con agitación se repitió dos veces más, usando la misma cantidad de isooctano fresco para cada ciclo. Las fases orgánicas de los tres procesos de extracción se unieron en el mismo recipiente y posteriormente se sometieron a evaporación del solvente. El residuo obtenido tras la eliminación del disolvente se pesó y analizó, proporcionando un contenido de lípidos de 620.3 g, correspondiente a un
55 rendimiento de extracción igual al 98% en peso con respecto a la cantidad total teórica.

Ejemplo 12 (fermentación de la levadura oleaginoso *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509)

60 A continuación se proporciona un ejemplo para la preparación de una suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginoso de levadura oleaginoso *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509.

En un matraz de 1 l se introdujeron 200 ml de medio YEPD (extracto de levadura 10 g/l, peptona 10 g/l, glucosa 20 g/l) previamente esterilizado en autoclave a 80°C durante 45 minutos.

65 El caldo de fermentación inicial así obtenido se inoculó con una muestra de la cepa de levadura oleaginoso *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509.

5 El cultivo se mantuvo a 30°C con agitación a 200 rpm durante 24 horas, y luego se transfirió a un fermentador de 20 l que contenía 6 l de un medio que contenía glucosa 100 g/l, sólidos empapados de maíz 5 g/l, extracto de levadura 2 g/l, (NH₄)₂SO₄ 5 g/l, KH₂PO₄ 6 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.3 g/l, NaCl 0.06 g/l CaCl₂·2H₂O 0.06 g/l, previamente esterilizado a 80°C durante 45 minutos.

10 Este cultivo en el fermentador se mantuvo a 30°C durante 24 horas, en condiciones aeróbicas mediante insuflación de 1 l/min de aire estéril y agitación variable de 600 a 900 rpm, modulado con el flujo de aire para mantener la concentración de oxígeno disuelto (DO₂) superior al 30% del valor de saturación, y a un pH de aproximadamente 5.0, mantenido mediante la adición, cuando sea necesario, de unas gotas de una solución de KOH 5 M o H₂SO₄ al 10% (vol/vol).

15 Al cabo de 24 horas, se agregaron 32.5 g de (NH₄)₂SO₄ y 200 ml de licor de maceración de maíz, al caldo en el fermentador, luego se conectó un tanque al fermentador, que contenía una solución estéril de glucosa 600 g/l alimentado en continuo al fermentador con un caudal variable que va de 50 a 100 ml/h, de acuerdo con la cinética de consumo del microorganismo en el cultivo, para mantener una concentración constante de glucosa en el cultivo igual a 30 g/l.

20 A continuación, se continuó la fermentación en las condiciones descritas anteriormente durante un total de 140 horas.

25 Al final, se descargaron del fermentador un total de 8.6 l de suspensión celular, caracterizada por una concentración de la biomasa igual a 118 g/l de peso seco, o 11.8% de peso seco y por un contenido total de lípidos igual a 66% en peso, con respecto al peso seco de las células. Además, dicha suspensión celular se caracterizó por una viscosidad, medida a 30°C con un microviscosímetro Stabinger SVR 3000 Anton Paar ("velocidad de cizallamiento" 1/1000) igual a 160 mPa·s.

30 Ejemplo 13 de acuerdo con la invención (concentración de una suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginoso de levadura oleaginoso *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 mediante tratamiento térmico a 110°C y tratamiento de acidificación).

El presente ejemplo muestra que el tratamiento térmico a 110°C junto con un tratamiento de acidificación de acuerdo con la presente invención, también es efectivo para concentrar adecuadamente una suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginoso de levadura oleaginoso *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509.

35 Se introdujeron 200 ml de suspensión celular obtenida de acuerdo con el proceso del Ejemplo 12 anterior, en un autoclave de 500 ml y 0.4 g de H₂SO₄ 96% (correspondiente a una concentración de ácido igual a 0.2% en peso con respecto al volumen de la suspensión celular). El pH obtenido fue igual a 3. La suspensión celular se llevó luego a 110°C y se mantuvo a esta temperatura durante 4 horas. Al final, después de enfriar, se midió la viscosidad de la suspensión tratada con un microviscosímetro Stabinger SVR 3000 Anton Paar ("velocidad de cizallamiento" 1/1000) a 30°C, proporcionando un valor de viscosidad igual a 18 mPa·s.

40 La suspensión celular se descargó luego del autoclave y se introdujo en recipientes de centrifugación y se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos a 20°C con una centrifuga Beckman Coulter Avanti J-26XP con un rotor de ángulo fijo JLA-8.1000.

45 Al final de la centrifugación y retiro del infranadante claro, se obtuvieron 80 ml de suspensión celular concentrada, caracterizada por una concentración de biomasa igual a 29.5% ps, adecuada para los propósitos del proceso posterior de extracción de lípidos.

50 Se realizó una determinación del contenido de lípidos sobre el infranadante claro como se describe en el Ejemplo 5 anterior. También en este caso, el análisis del residuo obtenido mostró que no contiene lípidos en el mismo, lo que confirma que el método de concentración de acuerdo con la invención permite obtener una suspensión celular, en la cual las células de levadura oleaginosas están intactas, es decir, en otras palabras, dicho método no determina la lisis de las células.

55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de concentración de una suspensión celular que comprende una biomasa mucilaginoso de levaduras oleaginosas, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 10 a) cultivar dichas levaduras oleaginosas en un caldo de fermentación obteniendo así una suspensión celular que comprende dicha biomasa mucilaginoso;
- 15 b) someter la suspensión celular obtenida de la etapa a) a tratamiento térmico, a una temperatura comprendida entre 95°C y 120°C y tratamiento ácido, obteniendo así una suspensión celular tratada que comprende dicha biomasa mucilaginoso que contiene células de levadura oleaginosas intactas;
- 20 c) concentrar la suspensión celular tratada obtenida de la etapa b) que comprende una etapa de eliminar al menos parte de dicho caldo de fermentación obteniendo así una suspensión celular concentrada.
- 25 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en dicha etapa b) dicho tratamiento térmico está precedido por dicho tratamiento ácido.
- 30 3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dichas levaduras oleaginosas se seleccionan del grupo que comprende los géneros *Yarrowia*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Trigonopsis*, *Torulopsis*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, y consorcios de las mismas, preferiblemente *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Rhodospiridium* o consorcios de los mismos.
- 35 4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dichas levaduras acumulan lípidos en una cantidad del 25% o más, preferiblemente del 40% o más, más preferiblemente del 60% o más, incluso más preferiblemente 70% o más de su peso seco.
- 40 5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho caldo de fermentación se deriva de la hidrólisis de biomasa lignocelulósicas.
- 45 6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho tratamiento térmico se lleva a cabo a una temperatura comprendida en el intervalo entre 100°C y 110°C.
- 50 7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho tratamiento térmico se realiza durante un tiempo comprendido entre 3 y 12 horas, preferiblemente llevado a cabo durante un tiempo comprendido entre 4 y 8 horas.
- 55 8. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde después de dicho tratamiento ácido, el pH de la suspensión celular está comprendido en el intervalo entre 1.5 y 6.0 y preferiblemente comprendido en el intervalo 2.0-4.5.
9. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho tratamiento ácido se lleva a cabo añadiendo un ácido de Brønsted orgánico o inorgánico, preferiblemente un ácido inorgánico.
10. Método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el ácido se selecciona del grupo que comprende ácido acético, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido bórico, ácido fluorhídrico, ácido bromhídrico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido propiónico, o mezclas de los mismos, preferiblemente ácido sulfúrico.
11. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde dicha etapa c) de concentración de dicha suspensión celular se realiza por sedimentación espontánea o por gravedad, sifón, evaporación al vacío, liofilización, floculación, microfiltración o centrifugación, preferiblemente por centrifugación.
12. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde en la etapa c), después de la etapa de retirar al menos parte del caldo de fermentación, la concentración de biomasa en dicha suspensión celular obtenida está comprendida entre 19.0% ps y 35.0% ps, preferiblemente entre 21.0% ps y 30.0% ps.