

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 862 583**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2011 PCT/EP2011/068043**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2012 WO12052368**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2011 E 11770115 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2021 EP 2630248**

54 Título: **Proceso para la producción de lípidos a partir de biomasa**

30 Prioridad:

22.10.2010 IT MI20101951

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

07.10.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FRANZOSI, GIULIANA;
PIZZA, FRANCESCA;
CUCCHETTI, DANIELA;
BIANCHI, DANIELE;
COMPAGNO, CONCETTA MARIA y
GALAFASSI, SILVIA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 862 583 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

Proceso para la producción de lípidos a partir de biomasa

La presente invención se refiere a un proceso para la producción de lípidos a partir de biomasa, incluyendo al menos un polisacárido.

5 Más específicamente, la presente invención se refiere a un proceso para la producción de lípidos a partir de biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, que comprende someter dicha biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, a hidrólisis ácida, obteniendo una fase sólida y una fase acuosa, someter dicha fase sólida a hidrólisis ácida o a hidrólisis enzimática, obteniendo una fase sólida adicional y una fase acuosa adicional, someter las fases acuosas obtenidas a partir de dichas hidrólisis a fermentación en presencia de al menos una levadura oleaginosa, obteniendo un caldo de fermentación que comprende una biomasa celular oleaginosa y someter al menos una parte de dicho caldo de fermentación a microfiltración.

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

15 En términos generales, una biomasa es cualquier sustancia con una matriz orgánica, vegetal o animal, que se pueda destinar a fines energéticos, por ejemplo, como materia prima para la producción de biocombustibles o componentes que se puedan añadir a los combustibles. Por lo tanto, la biomasa puede constituir una fuente de energía renovable como alternativa a las materias primas tradicionales de origen fósil, normalmente usadas en la producción de combustibles. Para este fin, la biomasa lignocelulósica resulta particularmente útil.

La producción de azúcares a partir de biomasa, en particular, biomasa lignocelulósica, se conoce en la técnica.

20 La biomasa lignocelulósica es una estructura compleja que comprende tres componentes principales: celulosa, hemicelulosa y lignina. Sus cantidades relativas varían de acuerdo con el tipo de biomasa lignocelulósica usada. En el caso de las plantas, por ejemplo, dichas cantidades varían de acuerdo con la especie y la edad de la planta.

25 La celulosa es el mayor constituyente de la biomasa lignocelulósica y está presente, generalmente, en cantidades que varían del 30 % en peso al 60 % en peso con respecto al peso total de la biomasa lignocelulósica. La celulosa consiste en moléculas de glucosa (de aproximadamente 500 a 10.000 unidades) unidas entre sí a través de un enlace de β -1,4 glucósido. El establecimiento de enlaces de hidrógeno entre las cadenas causa la formación de dominios cristalinos que dan resistencia y elasticidad a las fibras vegetales. En la naturaleza, esta únicamente se puede hallar en su estado puro en plantas anuales, tales como el algodón y el lino, mientras que en las plantas leñosas, esta siempre va acompañada de hemicelulosa y lignina.

30 La hemicelulosa, que está presente, generalmente, en una cantidad que varía del 10 % en peso al 40 % en peso con respecto al peso total de la biomasa lignocelulósica, aparece como un polímero mixto, relativamente corto (de 10 a 200 moléculas) y ramificado, compuesto por ambos azúcares con seis átomos de carbono (glucosa, manosa, galactosa) y también azúcares con cinco átomos de carbono (xilosa, arabinosa). Algunas propiedades importantes de las fibras vegetales se deben a la presencia de hemicelulosa, cuya propiedad principal es la de favorecer la imbibición de dichas fibras vegetales, cuando está presente el agua, causando su hinchamiento. La hemicelulosa también tiene propiedades adhesivas y, por lo tanto, tiende a endurecerse o a desarrollar una consistencia córnea, con la consecuencia de que dichas fibras vegetales se vuelven rígidas y se embeben más lentamente.

35 40 La lignina está presente, generalmente, en cantidades que varían del 10 % en peso al 30 % en peso con respecto al peso total de la biomasa lignocelulósica. Su función principal consiste en unir y cementar las diversas fibras vegetales entre sí dando a la planta compacidad y resistencia y también proporciona protección contra los insectos, los agentes patógenos, las lesiones y la luz ultravioleta. Esta se usa principalmente como combustible, pero actualmente también se usa ampliamente en la industria como dispersante, endurecedor, agente emulsionante, para laminados de plástico, cartones y productos de caucho. Esta también se puede tratar químicamente para producir compuestos aromáticos, del tipo vainillina, siringaldehído, p-hidroxibenzaldehído, que se pueden usar en la química farmacéutica o en las industrias cosmética y alimentaria.

45 Con el fin de optimizar la transformación de la biomasa lignocelulósica en productos para uso energético, se conoce el sometimiento de dicha biomasa lignocelulósica a un tratamiento preliminar para separar la lignina e hidrolizar la celulosa y la hemicelulosa a azúcares simples, tales como, por ejemplo, glucosa y xilosa. Dichos azúcares se pueden usar como fuentes de carbono en los procesos de fermentación en presencia de microorganismos para la producción de alcoholes y/o lípidos.

La solicitud de patente US 2008/0102176, por ejemplo, describe un método para la extracción de grasas vegetales, que comprende: pulverizar la materia prima que contiene celulosa con el fin de obtener partículas con un diámetro de

- 1 mm a 2 mm; sumergir las partículas en ácido sulfúrico a una concentración igual a entre el 1 % y el 2 % para acidificar dichas partículas con el fin de aumentar la hidrólisis de la celulosa y regular el pH hasta un valor de $4,5 \pm 0,5$; retirar las partículas acidificadas mediante el ácido sulfúrico y añadir, en secuencia, celulasa y una levadura oleaginosas a las partículas acidificadas y someterlas a fermentación durante 8-9 días a una temperatura de 25 °C a 30 °C y una humedad del 85 % al 90 %; añadir un hidrocarburo alifático, como disolvente, a los productos de fermentación con el fin de extraer las grasas, obtener una mezcla de extracción; retirar las partículas acidificadas que quedan en la mezcla de extracción y separar las grasas del disolvente mediante destilación, obteniendo aceite crudo. La celulasa se obtiene preferentemente a partir de *Trichoderma viride* y la levadura oleaginosas es *Rhodotorula glutinis*. Las grasas obtenidas se pueden convertir en biodiésel, después de la esterificación.
- 5
- 10 Dai *et al.* describen la producción de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas en el artículo: "Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity", publicado en el "African Journal of Biotechnology" (2007), vol. 6 (18), páginas 2130-2134. En este artículo, la biomasa lignocelulósica se tritura y se somete a hidrólisis ácida en presencia de ácido sulfúrico. Los azúcares así obtenidos se usan como fuentes de carbono en un proceso de fermentación en presencia de una cepa de *Rhodotorula glutinis* previamente seleccionada, capaz
- 15 de usar también pentosas, xilosa, en particular, con el fin de obtener aceites que posteriormente se extraen mediante extracción Soxhlet y se someten a transesterificación con el fin de obtener biodiésel.

Sin embargo, los procesos anteriores pueden tener diversos inconvenientes.

- El rendimiento de los azúcares obtenidos a partir del tratamiento de la biomasa lignocelulósica con ácido sulfúrico diluido (es decir, hidrólisis ácida), en particular, glucosa, por ejemplo, es generalmente bajo (por ejemplo, inferior al 50 %). Además, el uso de los azúcares obtenidos a partir de dicho tratamiento como fuentes de carbono en el proceso de fermentación en presencia de levaduras oleaginosas no siempre es capaz de dar buenos rendimientos de lípidos [por ejemplo, rendimientos de lípidos inferiores al 30 % en peso, siendo dicho rendimiento calculado como la cantidad total de lípidos presentes en la biomasa celular oleaginosas (seca) obtenida después de la fermentación].
- 20

- Además, con el fin de obtener un buen rendimiento de los azúcares de la hidrólisis y un buen rendimiento de los lípidos de la fermentación [por ejemplo, un rendimiento de lípidos superior o igual al 40 %, siendo dicho rendimiento calculado como la cantidad total de lípidos presentes en la biomasa celular oleaginosas (seca) obtenida después de la fermentación], dichos procesos requieren el uso de altas concentraciones de biomasa lignocelulósica en la etapa de hidrólisis. El uso de altas concentraciones de biomasa lignocelulósica, además, en particular, en el caso de la hidrólisis ácida de la biomasa lignocelulósica, puede conducir a la formación de altas cantidades de compuestos tóxicos, tales como, por ejemplo, compuestos de furfural, hidroximetilfurfural, fenol, que pueden actuar como inhibidores del crecimiento de los microorganismos normalmente usados en los procesos de fermentación posteriores de los azúcares y, en consecuencia, de la producción de lípidos.
- 25
- 30

- Los métodos de producción de un lípido o una mezcla de lípidos a partir de un material de fuente orgánica que comprende polisacáridos usando hidrólisis ácida para obtener azúcares como fuente de carbono para la fermentación microbiana oleaginosas se han descrito en, por ejemplo, los documentos WO 2010/069516, WO 2010/046051 o WO 2009/063138. Sin embargo, dichas solicitudes de patente no consideraron realizar una etapa de microfiltración y reciclar parte de las fases acuosas obtenidas a partir de la fermentación a la etapa de fermentación.
- 35

- El Solicitante ha hallado actualmente que la producción de lípidos a partir de biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, se puede llevar a cabo ventajosamente por medio de un proceso que comprende someter dicha biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, a hidrólisis ácida, obteniendo una fase sólida y una fase acuosa, someter dicha fase sólida a hidrólisis ácida o a hidrólisis enzimática, obteniendo una fase sólida adicional y una fase acuosa adicional, someter las fases acuosas obtenidas a partir de dicha hidrólisis a fermentación en presencia de al menos una levadura oleaginosas, obteniendo un caldo de fermentación que comprende una biomasa celular oleaginosas y someter una parte de dicho caldo de fermentación a microfiltración.
- 40

- Se pueden obtener numerosas ventajas por medio de dicho proceso. Dicho proceso, por ejemplo, permite que se obtengan azúcares, en particular, pentosas del tratamiento de hidrólisis ácida de la biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, y hexosas que se derivan del tratamiento de hidrólisis ácida o enzimática de la fase sólida obtenida a partir de dicho tratamiento de hidrólisis ácida de la biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, que se pueden usar posteriormente como fuentes de carbono en el proceso de fermentación para la producción de lípidos, en dos fases de fermentación distintas. En particular, las pentosas obtenidas a partir del tratamiento de hidrólisis ácida de la biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, se pueden usar para la obtención de un buen crecimiento de la biomasa celular oleaginosas, mientras que las hexosas obtenidas a partir del tratamiento de hidrólisis ácida o enzimática de la fase sólida obtenida a partir de dicho tratamiento de hidrólisis ácida de la biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, se pueden usar para el aumento del rendimiento de lípidos. Además, la microfiltración de al menos una parte del caldo de fermentación permite que se mantenga constante el volumen de dicho caldo de fermentación en el dispositivo de fermentación y se aumente la concentración de biomasa celular oleaginosas en dicho caldo de fermentación, incluso cuando se alimentan soluciones diluidas de azúcares que se derivan de la hidrólisis ácida de la biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, y/o del tratamiento de hidrólisis ácida o enzimática de la fase sólida
- 45
- 50
- 55

obtenida a partir de dicho tratamiento de hidrólisis ácida de la biomasa, incluyendo al menos un polisacárido. Dicho proceso permite que se obtengan lípidos con un alto rendimiento [por ejemplo, un rendimiento de lípidos superior o igual al 40 %, siendo dicho rendimiento calculado como la cantidad total de lípidos presentes en la biomasa celular oleaginosa (seca) obtenida después de la fermentación]. Dichos lípidos se pueden usar ventajosamente en la producción de biodiésel o diésel verde, que se pueden usar como tales o en una mezcla con otros combustibles para vehículos de motor.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención se refiere a un proceso para la producción de lípidos a partir de biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, que comprende:

- someter dicha biomasa, incluyendo 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 oleaginosa, obteniendo un primer caldo de fermentación que comprende una primera biomasa celular oleaginosa;
- someter dicha primera fase sólida a hidrólisis ácida o a 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 oleaginosa, incluyendo lípidos;
- someter al menos una parte de dicho segundo caldo de fermentación a microfiltración, obteniendo un retenido y un permeado;
- alimentar dicho retenido a dichos dispositivos de fermentación.

Para los fines de la presente descripción y de las siguientes reivindicaciones, la definición de los intervalos numéricos siempre incluye extremos, a menos que se especifique otra cosa.

De conformidad con una realización preferida de la presente invención, dicho polisacárido se puede seleccionar de celulosa, hemicelulosa o mezclas de las mismas. La celulosa o las mezclas de hemicelulosa y celulosa son particularmente preferidas.

De conformidad con una realización preferida adicional de la presente invención, dicha biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, es una biomasa lignocelulósica. Tal como se ha mencionado anteriormente, la biomasa lignocelulósica incluye tres componentes: hemicelulosa, celulosa y lignina.

Dicha biomasa lignocelulósica se selecciona preferentemente de:

- productos de cultivos expresamente cultivados para uso energético (por ejemplo, *Miscanthus*, panizo blanco, caña común), incluyendo productos de desecho, residuos y sobras de dichos cultivos o de su procesamiento;
- productos de cultivaciones agrícolas, forestación y silvicultura, que comprenden madera, plantas, residuos y productos de desecho del procesamiento agrícola, de la forestación y de la silvicultura;
- desechos de productos agroalimentarios destinados para la nutrición humana o la zootecnia;
- residuos, no tratados químicamente, de la industria del papel;
- productos de desecho procedentes de la recogida diferenciada de desechos urbanos sólidos (por ejemplo, desechos urbanos de origen vegetal, papel).

De conformidad con una realización preferida de la presente invención, dicha biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, se puede someter a un proceso de trituración preliminar antes de someterse a dicha hidrólisis ácida. Dicha biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, se puede triturar preferentemente hasta que se obtengan partículas que tengan un diámetro que varíe de 0,1 mm a 10 mm, más preferentemente que varíe de 0,5 mm a 4 mm. Se prefieren particularmente las partículas que tienen un diámetro de menos de 1 mm.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha hidrólisis ácida se puede llevar a cabo en presencia de una solución acuosa de al menos un ácido inorgánico.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, o dicha primera fase sólida puede estar presente en la mezcla de reacción en una cantidad que varíe del 5 % en peso al 20 % en peso, preferentemente del 10 % en peso al 18 % en peso, con respecto al peso total de la mezcla de reacción.

Para los fines de la presente descripción y de las siguientes reivindicaciones, la expresión "mezcla de reacción" significa, en el caso de la hidrólisis ácida, la mezcla que comprende dicha biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, o dicha primera fase sólida y dicha solución acuosa de dicho al menos un ácido inorgánico.

Para los fines de la presente descripción y de las siguientes reivindicaciones, la expresión "mezcla de reacción"

significa, en el caso de la hidrólisis enzimática, la mezcla que comprende dicha primera fase sólida y una solución acuosa de al menos una enzima.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho ácido inorgánico se puede seleccionar de ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico o mezclas de los mismos. Se prefiere el ácido sulfúrico.

- 5 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho ácido inorgánico está presente en dicha solución acuosa a una concentración que varía del 0,1 % en peso al 2 % en peso, que varía preferentemente del 0,3 % en peso al 1 % en peso, con respecto al peso total de la solución acuosa.

- 10 Dicho ácido inorgánico actúa como catalizador para la hidrólisis ácida de dicha biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, o de dicha primera fase sólida. En particular, cuando la biomasa, incluyendo al menos un polisacárido de partida, es una biomasa lignocelulósica, dicho ácido inorgánico actúa específicamente como catalizador para la hidrólisis ácida de la hemicelulosa.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha hidrólisis ácida se puede llevar a cabo a una temperatura que varíe de 140 °C a 270 °C, que varíe preferentemente de 170 °C a 250 °C.

- 15 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha hidrólisis ácida se puede llevar a cabo durante un tiempo que varíe de 10 segundos a 30 minutos, preferentemente de 30 segundos a 20 minutos.

Dicha hidrólisis ácida se puede llevar a cabo en reactores conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, autoclaves o extrusoras.

- 20 Dicha hidrólisis enzimática se puede llevar a cabo de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica descritas, por ejemplo, en las patentes estadounidenses US 5.628.830, US 5.916.780 y US 6.090.595, usando enzimas comerciales, tales como, por ejemplo, Celluclast 1.5L (Novozymes), Econase CE (Rohm Enzymes), Spezyme (Genecor), Novozym 188 (Novozymes), usadas individualmente o en mezcla entre sí.

- 25 Si dicha biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, o dicha primera fase sólida se somete a hidrólisis ácida, con el fin de reducir la cantidad de subproductos, tales como, por ejemplo, compuestos de furfural, hidroximetilfurfural, fenol, que pueden actuar como inhibidores del crecimiento de la levadura oleaginosa usada en la fermentación posterior y, en consecuencia, de la producción de lípidos, dicha primera fase acuosa y/o dicha segunda fase acuosa se pueden someter a tratamiento con al menos un material adsorbente.

De acuerdo con una realización preferida adicional de la presente invención, dicha primera fase acuosa y/o dicha segunda fase acuosa se pueden someter a tratamiento con al menos un material adsorbente, obteniendo una tercera fase acuosa y/o una cuarta fase acuosa, respectivamente.

- 30 Dicha primera fase sólida y dicha primera fase acuosa, así como dicha segunda fase sólida y dicha segunda fase acuosa, se puede separar por medio de técnicas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, filtración, centrifugación. Dichas fases se separan preferentemente mediante filtración.

Con el fin de llevar el pH hasta valores aceptables para la fermentación posterior, puede resultar ventajoso someter dicha primera fase acuosa y/o dicha segunda fase acuosa a neutralización.

- 35 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, antes de alimentarse a dicho dispositivo de fermentación o antes de someterse a dicho tratamiento con al menos un material adsorbente, dicha primera fase acuosa y/o dicha segunda fase acuosa se pueden someter a neutralización mediante la adición de al menos un óxido y/o de al menos un hidróxido, tal como, por ejemplo, óxido de calcio, hidróxido de calcio o hidróxido de bario o mezclas de los mismos.

- 40 Las sales que se forman después de dicha adición se pueden separar de dicha primera fase acuosa o de dicha segunda fase acuosa, por medio de técnicas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, filtración, centrifugación. Dichas sales se separan preferentemente mediante filtración.

- 45 Dicha segunda fase sólida, que comprende lignina, se puede mejorar como combustible, por ejemplo, como combustible para la producción de la energía necesaria para el mantenimiento de los procesos de tratamiento de la biomasa, incluyendo al menos un polisacárido.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho tratamiento con al menos un material adsorbente se puede llevar a cabo a una temperatura que varíe de 10 °C a 150 °C, que varíe preferentemente de 20 °C a 100 °C.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho tratamiento con al menos un material adsorbente se puede llevar a cabo a una presión que varíe de 0,05 MPa (0,5 bar) a 1 MPa (10 bar), que varíe preferentemente de 0,08 MPa (0,8 bar) a 0,2 MPa (2 bar).

- 5 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho tratamiento con al menos un material adsorbente se puede llevar a cabo durante un tiempo que varíe de 10 minutos a 6 horas, que varíe preferentemente entre 30 minutos y 5 horas.

Al final de dicho tratamiento con al menos un material adsorbente, dicho material adsorbente se puede separar de dicha tercera fase acuosa o de dicha cuarta fase acuosa, por medio de técnicas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, filtración, centrifugación. Dicho material adsorbente se separa preferentemente mediante filtración.

- 10 Para los fines de la presente descripción y de las siguientes reivindicaciones, la expresión "material adsorbente" significa un material, natural o sintético, capaz de retener sustancias orgánicas sobre su superficie a través de medios físicos o químicos ("sorción química").

- 15 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho material adsorbente se puede seleccionar de silicatos cristalinos microporosos o metalosilicatos del tipo zeolítico que tengan, por ejemplo, estructuras de MFI, MOR, FAU o BEA.

Los ejemplos específicos de silicatos cristalinos microporosos y de metalosilicatos del tipo zeolítico que se pueden usar ventajosamente para los fines de la presente invención son las zeolitas CBV2314 (del tipo MFI con una relación de Si/Al = 12) y CBV 28014 (del tipo MFI con una relación de Si/Al = 140) de Zeolyst International.

- 20 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho material adsorbente se puede añadir a dicha primera fase acuosa y/o a dicha segunda fase acuosa, en una cantidad que varíe del 0,5 % en peso al 50 % en peso, que varíe preferentemente del 3 % en peso al 15 % en peso, con respecto al peso total de dicha primera fase acuosa o de dicha segunda fase acuosa.

Dicho tratamiento con al menos un material adsorbente se puede llevar a cabo en reactores conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, reactores agitados, reactores de lecho fijo, reactores de suspensión.

- 25 Dicho tratamiento con al menos un material adsorbente se puede llevar a cabo de diferentes maneras, tales como, por ejemplo, por lotes o en continuo.

- 30 Cabe señalar que dicho tratamiento con al menos un material adsorbente reduce el contenido de subproductos, en particular, compuestos de furfural, hidroximetil-furfural, fenol, que se pueden formar durante la hidrólisis ácida de dicha biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, y/o de dicha primera fase sólida y que, tal como se ha indicado anteriormente, pueden actuar como inhibidores del crecimiento de la levadura oleaginosa usada en la fermentación anterior y, en consecuencia, de la producción de lípidos. En particular, después de dicho tratamiento con al menos un material adsorbente, dicha tercera fase acuosa y dicha cuarta fase acuosa tienen un contenido de furfural y de hidroximetilfurfural menor o igual a 0,1 g/l.

- 35 También cabe señalar que dicho tratamiento con al menos un material adsorbente no causa una reducción significativa en la fuente de carbono presente en dicha primera fase acuosa o en dicha segunda fase acuosa. Dicha tercera fase acuosa y dicha cuarta fase acuosa tienen, generalmente, un contenido de carbono orgánico total ("carbono orgánico total", COT) igual a aproximadamente el 90 % con respecto al contenido de carbono orgánico total ("carbono orgánico total", COT) de dicha primera fase acuosa o de dicha segunda fase acuosa, respectivamente. Dicho carbono orgánico total ("carbono orgánico total", COT) se determinó mediante la combustión por medio de un analizador de COT capaz
40 de determinar el contenido de carbono total ("carbono total", CT) y el contenido de carbono inorgánico ("carbono inorgánico", CI) a partir de los que se calcula el contenido de carbono orgánico total ("carbono orgánico total", COT), mediante diferencia.

- 45 Por lo tanto, cabe señalar que el contenido de materia orgánica de dicha tercera fase acuosa o de dicha cuarta fase acuosa permanece sustancialmente invariable con respecto al de dicha primera fase acuosa o de dicha segunda fase acuosa, respectivamente.

- 50 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha primera fase sólida comprende lignina y celulosa y dicha primera fase acuosa comprende al menos un azúcar que tiene de 5 a 6 átomos de carbono, preferentemente un azúcar que tiene 5 átomos de carbono, más preferentemente xilosa, y dicho ácido inorgánico. Dicha xilosa se deriva preferentemente de la hidrólisis ácida de hemicelulosa. Dicho azúcar que tiene 5 átomos de carbono se encuentra presente preferentemente en dicha primera fase acuosa en una cantidad superior o igual al 60 % en peso con respecto al peso total de azúcares contenidos en dicha primera fase acuosa.

- De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha segunda fase sólida comprende lignina y dicha segunda fase acuosa comprende al menos un azúcar que tiene de 5 a 6 átomos de carbono, preferentemente un azúcar que tiene 6 átomos de carbono, más preferentemente glucosa, y dicho ácido inorgánico o dicha enzima. Dicha glucosa se deriva preferentemente de la hidrólisis ácida o de la hidrólisis enzimática de celulosa. Dicho azúcar que tiene 6 átomos de carbono se encuentra preferentemente presente en dicha segunda fase acuosa en una cantidad mayor de o igual al 80 % en peso con respecto al peso total de azúcares contenidos en dicha segunda fase acuosa.
- La cantidad de azúcares obtenidos después de la hidrólisis ácida o la hidrólisis enzimática se puede determinar por medio de técnicas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC en inglés) o cromatografía de intercambio iónico: en los ejemplos proporcionados en lo sucesivo en el presente documento, se pueden hallar detalles adicionales sobre la determinación de la cantidad de azúcares.
- De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha fermentación se puede llevar a cabo a una temperatura que varíe de 20 °C a 40 °C, que varíe preferentemente de 25 °C a 35 °C.
- De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha fermentación se puede llevar a cabo durante un tiempo que varíe de 2 días a 10 días, que varíe preferentemente de 3 días a 8 días.
- De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha fermentación se puede llevar a cabo a un pH que varíe de 4,5 a 7, que varíe preferentemente de 5 a 6,7. Con el fin de mantener el pH dentro de los intervalos deseados, una solución acuosa de al menos una base inorgánica, tal como, por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio o mezclas de los mismos, se puede añadir al medio de cultivo usado para la fermentación, en una cantidad que sea tal que se obtenga el pH deseado.
- De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha levadura oleaginosa se puede seleccionar de:
Rhodotorula glutinis, *Rhodotorula gracilis*, *Rhodotorula graminis*, *Lypomices starkeyi*, *Lypomices lipofer*, *Trigonopsis variabilis*, *Candida kefir*, *Candida curvata*, *Candida lipolytica*, *Torulopsis sp.*, *Pichia stipitis*.
- De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha fermentación es una fermentación por lotes de alimentación o una fermentación continua, preferentemente continua. En el caso de una fermentación continua, existe una recirculación de la biomasa, incluyendo al menos un polisacárido.
- Antes de usarse en dicha fermentación, dicha levadura oleaginosa se cultiva preferentemente en un medio de cultivo que contiene xilosa, celobiosa, glucosa o mezclas de las mismas, a una concentración que varía preferentemente del 1 % en peso al 2 % en peso con respecto al peso total de dicho medio de cultivo.
- Dicha fermentación se puede llevar a cabo ventajosamente en fermentadores conocidos en la técnica, en presencia de medios de cultivo normalmente usados para el fin que comprenden diversos nutrientes, tales como, por ejemplo, nitrógeno, fosfato de potasio, magnesio, sales, vitaminas.
- Con el fin de obtener una mayor producción de biomasa celular oleaginosa, dicha primera fase acuosa o dicha tercera fase acuosa se puede alimentar a dicho dispositivo de fermentación en dos fases.
- De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho proceso puede comprender alimentar una parte de dicha primera fase acuosa o de dicha tercera fase acuosa a dicho dispositivo de fermentación, operando a la temperatura, la presión y el pH indicados anteriormente; alimentar la parte restante de dicha primera fase acuosa o de dicha tercera fase acuosa, a una velocidad de alimentación creciente, operando a la temperatura, la presión y el pH indicados anteriormente. Cabe señalar que dicha velocidad de alimentación depende de las dimensiones del dispositivo de fermentación: en el caso de un dispositivo de fermentación de 20 litros, por ejemplo, dicha velocidad de alimentación puede variar de 0,5 l/h (velocidad de alimentación de partida) a 5 l/h (velocidad de alimentación final), variando preferentemente de 0,8 l/h (velocidad de alimentación de partida) a 3,5 l/h (velocidad de alimentación final).
- De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha segunda fase acuosa o dicha cuarta fase acuosa se puede alimentar a dicho dispositivo de fermentación, a una velocidad de alimentación creciente, operando a la temperatura, la presión y el pH indicados anteriormente. Cabe señalar que dicha velocidad de alimentación depende de las dimensiones del dispositivo de fermentación: en el caso de un dispositivo de fermentación de 20 litros, por ejemplo, dicha velocidad de alimentación creciente puede variar de 0,1 l/h (velocidad de alimentación de partida) a 0,4 l/h (velocidad de alimentación final), variando preferentemente de 0,15 l/h (velocidad de alimentación de partida) a 0,35 l/h (velocidad de alimentación final).
- De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha microfiltración se puede llevar a cabo por medio de membranas basadas en celulosa regenerada (por ejemplo, las membranas conocidas con el nombre comercial de "Hydrosart® Microfiltration Cassettes" de Sartorius) o por medio de membranas cerámicas (por ejemplo,

las membranas conocidas con el nombre comercial de "Ceram inside®" de Tami).

Tal como se ha indicado anteriormente, después de alimentar dicha segunda fase acuosa o dicha cuarta fase acuosa a dicho dispositivo de fermentación, la microfiltración de al menos una parte de dicho segundo caldo de fermentación permite que se mantenga constante el volumen de dicho segundo caldo de fermentación en el dispositivo de fermentación y se aumente la concentración de dicha segunda biomasa celular oleaginosa en dicho segundo caldo de fermentación, permitiendo, por tanto, que menores cantidades de la biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, y/o de la primera fase sólida se sometan a hidrólisis con respecto a aquellas normalmente usadas.

Cabe señalar que dicha microfiltración se llevará a cabo en tiempos y con velocidades de filtración que dependen de diversos parámetros, tales como, por ejemplo, las dimensiones del dispositivo de fermentación, la velocidad de alimentación de dicha segunda fase acuosa o de dicha cuarta fase acuosa a dicho dispositivo de fermentación, la velocidad de crecimiento de la biomasa celular oleaginosa. En el caso de un dispositivo de fermentación de 20 litros, por ejemplo, dicha microfiltración se puede llevar a cabo entre cada 30 segundos y 5 horas, preferentemente entre cada 40 segundos y 4 horas, durante un tiempo que varíe de 1 minuto a 10 minutos, que varíe preferentemente de 2 minutos a 8 minutos, por cada ciclo de 24 horas, a una velocidad de filtración que varíe de 50 ml/min a 200 ml/min, que varíe preferentemente de 100 ml/min a 180 ml/min.

Para los fines de la presente descripción y de las siguientes reivindicaciones, el término "retenido" significa la segunda biomasa celular oleaginosa concentrada.

Para los fines de la presente descripción y de las siguientes reivindicaciones, el término "permeado" significa el medio de cultivo agotado.

Cabe señalar que el retenido se alimenta al dispositivo de fermentación a la misma velocidad de alimentación que dicha segunda fase acuosa o dicha cuarta fase acuosa a dicho dispositivo de fermentación.

Con el fin de aumentar el rendimiento de los lípidos, se puede añadir licor de maíz macerado a dicho segundo dispositivo de fermentación.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho proceso comprende, adicionalmente, añadir licor de maíz macerado a dicho dispositivo de fermentación en una cantidad que varía de 2 g/l a 20 g/l, que varía preferentemente de 4 g/l a 18 g/l. Dicho licor de maíz macerado se puede añadir antes de la alimentación de dicha segunda fase acuosa o antes de la alimentación de dicha cuarta fase acuosa.

Con el fin de recuperar los lípidos, dicha segunda biomasa celular oleaginosa se puede someter a un tratamiento térmico.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho proceso también comprende someter dicha segunda biomasa celular oleaginosa que comprende lípidos a tratamiento térmico.

Dicho tratamiento térmico se puede llevar a cabo usando equipos y técnicas conocidas en la técnica. Dicho tratamiento térmico, por ejemplo, se puede llevar a cabo ventajosamente usando autoclaves presurizados (por ejemplo, el autoclave Brignole, mod. AU-2).

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho tratamiento térmico se puede llevar a cabo a una presión que varíe de 0,2 MPa (2 bar) a 0,65 MPa (6,5 bar), que varíe preferentemente de 0,3 MPa (3 bar) a 0,55 MPa (5,5 bar).

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho tratamiento térmico se puede llevar a cabo a una temperatura que varíe de 100 °C a 160 °C, que varíe preferentemente de 110 °C a 150 °C.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho tratamiento térmico se puede llevar a cabo durante un tiempo que varíe de 1 hora a 8 horas, que varíe preferentemente entre 2 horas y 5 horas.

Al final de dicho tratamiento térmico, la segunda biomasa celular oleaginosa se puede recuperar mediante extracción usando, por ejemplo, un extractor de reflujo.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha extracción se puede llevar a cabo en presencia de al menos un disolvente orgánico, preferentemente acetato de etilo.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha extracción se puede llevar a cabo a una temperatura que varíe de 20 °C a 60 °C, que varíe preferentemente de 30 °C a 50 °C.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha extracción se puede llevar a cabo en presencia de una cantidad de disolvente que varíe de 2 veces a 6 veces, que varíe preferentemente de 3 veces a 5 veces, la cantidad de biomasa celular oleaginosa obtenida a partir de dicho tratamiento térmico.

- 5 La biomasa celular oleaginosa obtenida después de dicho tratamiento térmico se puede someter a extracción una o varias veces. Preferentemente, dicha biomasa celular oleaginosa se somete a extracción de una a 5 veces, más preferentemente de una vez a 3 veces.

- 10 Con el fin de concentrar adicionalmente dicha segunda biomasa celular oleaginosa que comprende lípidos, dicha segunda biomasa celular oleaginosa, antes de someterse a un tratamiento térmico, se puede someter a centrifugación. Dicha centrifugación se puede llevar a cabo durante un tiempo que varíe de 5 minutos a 30 minutos, que varíe preferentemente de 15 minutos a 25 minutos, a una velocidad de rotación que varíe de 3.000 rpm a 9.000 rpm, preferentemente de 4.000 a 8.000 rpm.

Al final de la extracción anterior, se obtienen las siguientes dos fases:

- (i) una fase de disolvente que comprende lípidos;
- (ii) una fase sólida húmeda que comprende restos celulares y trazas de lípidos no separados.

- 15 Con el fin de recuperar los lípidos, dicha fase de disolvente (i) se somete a evaporación, obteniendo una fase sólida que comprende lípidos.

El proceso, objeto de la presente invención, permite que se recuperen los lípidos con un rendimiento que varíe del 40 % al 98 %, preferentemente del 45 % al 95 %, siendo dicho rendimiento calculado con respecto a la cantidad total de lípidos presentes en la biomasa celular oleaginosa (seca) obtenida después de la fermentación.

- 20 Los lípidos incluidos en dicha fase de disolvente (i) son preferentemente triglicéridos, más preferentemente ésteres de glicerol con ácidos grasos que tienen de 14 a 20 átomos de carbono, tales como, por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido α -linoleico, en una cantidad superior o igual al 80 % en peso, preferentemente superior o igual al 90 % en peso, con respecto al peso total de los lípidos. Otros lípidos que pueden estar presentes en dicha fase oleosa son: fosfolípidos, monoglicéridos, diglicéridos o mezclas de los mismos.

- 25 La cantidad de lípidos contenidos en la biomasa celular oleaginosa obtenida después de la fermentación, tal como también la cantidad de lípidos contenidos en dicha fase oleosa, se puede determinar por medio de técnicas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, el método colorimétrico que se basa en la reacción de lípidos con ácido fosfórico y fosfo-vanillina: se pueden hallar detalles adicionales relacionados con este método, por ejemplo, en el siguiente artículo: "Chemical Basis of the Sulpho-phospho-vanillin Reaction for Estimating Total Serum Lipids", J. A. Knight *et al.*, publicado en "Clinical Chemistry" (1972), vol. 18, n.º 3, páginas 199-202.

- 30 Dicha fase sólida húmeda (ii) que comprende restos celulares, en particular, proteínas y polisacáridos contenidos en la membrana celular de la levadura oleaginosa usada, se puede recuperar y usar en el proceso, objeto de la presente invención, en particular, se puede enviar a la hidrólisis ácida. Las proteínas y los polisacáridos de la membrana se hidrolizan, a continuación, a aminoácidos y azúcares simples (por ejemplo, glucosa, manosa), que se pueden usar, a continuación, como fuente de nitrógeno y carbono en la fermentación posterior. Cabe señalar que la recuperación y el uso de dicha fase sólida húmeda (ii) permite suministrar nitrógeno al medio de cultivo usado para la fermentación y, en consecuencia, reducir la cantidad de nitrógeno que normalmente se añade al medio de cultivo en el que tiene lugar la fermentación y proporcionar azúcares adicionales para la fermentación.

- 40 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho proceso también comprende enviar dicha fase sólida húmeda (ii) a la hidrólisis ácida. En este caso, dicha primera fase acuosa o dicha segunda fase acuosa, además de dicho al menos un azúcar que tiene de 5 a 6 átomos de carbono y de dicho al menos un ácido orgánico o de dicha al menos una enzima, comprende aminoácidos y azúcares simples (por ejemplo, glucosa, manosa) que se derivan de la hidrólisis ácida de las proteínas y de los polisacáridos de membrana; mientras que dicha primera fase sólida o dicha segunda fase sólida comprende, además de celulosa y/o lignina, restos celulares no hidrolizados.

- 45 Con el fin de obtener un mayor rendimiento de lípidos (por ejemplo, un rendimiento superior al 98 %), dicha fase sólida húmeda (ii) se puede someter a extracción con un disolvente o con una mezcla de alcohol/disolvente.

- 50 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho proceso también comprende someter dicha fase acuosa (ii) a extracción con al menos un disolvente que se puede seleccionar de hidrocarburos alifáticos que tienen de 3 a 10 átomos de carbono, tales como, por ejemplo, pentano, n-hexano, octano o mezclas de los mismos; o con una mezcla que comprende al menos un alcohol alifático que tiene de 3 a 5 átomos de carbono que se puede seleccionar, por ejemplo, de isopropanol, n-butanol o mezclas de los mismos y al menos un hidrocarburo alifático que tiene de 3 a 10 átomos de carbono seleccionado de aquellos descritos anteriormente. Dicho disolvente orgánico y/o

dicha mezcla se evaporan posteriormente, obteniendo una fase oleosa adicional que comprende lípidos y una fase sólida húmeda adicional que comprende restos celulares.

Tal como se ha descrito anteriormente para la fase sólida húmeda (ii), dicha fase sólida húmeda adicional obtenida después de dicha extracción también se puede recuperar y enviar a la hidrólisis ácida.

5 Los lípidos obtenidos de acuerdo con el proceso de la presente invención se pueden someter a esterificación en presencia de al menos un alcohol que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, preferentemente metanol, etanol, y al menos un catalizador ácido o básico, con el fin de producir glicerol y ésteres de alquilo, en particular, ésteres de metilo o ésteres de etilo (biodiésel).

10 Como alternativa, dichos lípidos se pueden someter a hidrogenación/desoxigenación en presencia de hidrógeno y al menos un catalizador con el fin de producir diésel verde. Los procesos de hidrogenación/desoxigenación se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente europea EP 1.728.844.

La presente invención se ilustrará, a continuación, con mayor detalle a través de dos realizaciones con referencia a las Figuras 1-2 proporcionadas en lo sucesivo en el presente documento.

15 La Figura 1 esquematiza una primera realización del proceso objeto de la presente invención. Para este fin, la biomasa, incluyendo al menos un polisacárido (por ejemplo, la biomasa lignocelulósica previamente triturada), se somete a hidrólisis ácida en presencia de una solución acuosa de un ácido inorgánico (por ejemplo, una solución acuosa de ácido sulfúrico al 0,5 %), obteniendo una primera mezcla que comprende una primera fase acuosa que incluye xilosa que se deriva de la hidrólisis de hemicelulosa y dicho ácido inorgánico y una primera fase sólida que comprende lignina y celulosa.

20 Dicha mezcla se somete a filtración o centrifugación (no representada en la Figura 1), obteniendo una primera fase sólida y una primera fase acuosa.

25 Dicha primera fase acuosa, después de la neutralización (por ejemplo, mediante la adición de hidróxido de calcio) y la posterior filtración (no representada en la Figura 1), se alimenta a un dispositivo de fermentación en presencia de una levadura oleaginosa (por ejemplo, *Rhodotorula graminis*), obteniendo un primer caldo de fermentación que comprende una primera biomasa celular oleaginosa (no representada en la Figura 1).

Dicha primera fase sólida se somete a hidrólisis (por ejemplo, en presencia de una solución acuosa de un ácido inorgánico o de una solución acuosa de una enzima), obteniendo una segunda mezcla que comprende una segunda fase acuosa que incluye glucosa que se deriva de la hidrólisis de celulosa y dicho ácido inorgánico o dicha enzima y una segunda fase sólida que incluye lignina.

30 Dicha mezcla se somete a filtración (no representada en la Figura 1), obteniendo una segunda fase sólida y una segunda fase acuosa.

35 Dicha segunda fase acuosa, después de la neutralización (por ejemplo, mediante la adición de hidróxido de calcio) y la posterior filtración (no representada en la Figura 1), se alimenta al dispositivo de fermentación anterior en presencia de dicho primer caldo de fermentación que comprende una primera biomasa celular oleaginosa, obteniendo un segundo caldo de fermentación que comprende una segunda biomasa celular oleaginosa, incluyendo lípidos (no representada en la Figura 1). Parte de dicho segundo caldo de fermentación se somete a microfiltración (por ejemplo, mediante muestreo, a través de una bomba peristáltica que se activa cada hora, durante 4 minutos, por cada ciclo de 24 horas, operando a una velocidad de filtración de 150 ml/min), obteniendo un retenido (es decir, una segunda biomasa celular oleaginosa concentrada), que se alimenta a dicho dispositivo de fermentación, y un permeado (es decir, un medio de cultivo agotado), que se elimina.

40 La Figura 2 esquematiza una segunda realización del proceso, objeto de la presente invención. Para este fin, la biomasa, incluyendo al menos un polisacárido (por ejemplo, la biomasa lignocelulósica previamente triturada), se somete a hidrólisis ácida en presencia de una solución acuosa de un ácido inorgánico (por ejemplo, una solución acuosa de ácido sulfúrico al 0,5 %), obteniendo una primera mezcla que comprende una primera fase acuosa que incluye xilosa que se deriva de la hidrólisis de hemicelulosa y dicho ácido inorgánico y una primera fase sólida que comprende lignina y celulosa.

Dicha mezcla se somete a filtración o centrifugación (no representada en la Figura 2), obteniendo una primera fase sólida y una primera fase acuosa.

50 Dicha primera fase acuosa, después de la neutralización (por ejemplo, mediante la adición de hidróxido de calcio) y la posterior filtración (no representada en la Figura 2), se somete a un tratamiento con al menos un material adsorbente (por ejemplo, zeolita CBV28014, Zeolyst), obteniendo una tercera fase acuosa.

Dicha tercera fase acuosa se alimenta a un dispositivo de fermentación en presencia de una levadura oleaginosa (por ejemplo, *Rhodotorula graminis*), obteniendo un primer caldo de fermentación que comprende una primera biomasa celular oleaginosa (no representada en la Figura 2).

- 5 Dicha primera fase sólida se somete a hidrólisis (por ejemplo, en presencia de una solución acuosa de un ácido inorgánico o de una solución acuosa de una enzima), obteniendo una segunda mezcla que comprende una segunda fase acuosa que incluye glucosa que se deriva de la hidrólisis de celulosa y dicho ácido inorgánico o dicha enzima y una segunda fase sólida que incluye lignina.

Dicha mezcla se somete a filtración (no representada en la Figura 2), obteniendo una segunda fase sólida y una segunda fase acuosa.

- 10 Dicha segunda fase acuosa, después de la neutralización (por ejemplo, mediante la adición de hidróxido de calcio) y la posterior filtración (no representada en la Figura 2), se somete a un tratamiento con al menos un material adsorbente (por ejemplo, zeolita CBV28014, Zeolyst), obteniendo una cuarta fase acuosa.

- 15 Dicha cuarta fase acuosa se alimenta al dispositivo de fermentación anterior en presencia de dicho primer caldo de fermentación que comprende una primera biomasa celular oleaginosa, obteniendo un segundo caldo de fermentación que comprende una segunda biomasa celular oleaginosa, incluyendo lípidos (no representada en la Figura 2). Parte de dicho segundo caldo de fermentación se somete a microfiltración (por ejemplo, mediante muestreo, a través de una bomba peristáltica que se activa cada hora, durante 4 minutos, por cada ciclo de 24 horas, operando a una velocidad de filtración de 150 ml/min), obteniendo un retenido (es decir, una segunda biomasa celular oleaginosa concentrada), que se alimenta a dicho dispositivo de fermentación, y un permeado (es decir, un medio de cultivo agotado), que se elimina.

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

EJEMPLO 1

Hidrólisis ácida

- 25 Se añadieron 4 kg de aserrín de álamo (diámetro de partícula < 1 mm) a 22,8 litros de una solución acuosa de ácido sulfúrico al 0,5 %.

La composición de la biomasa lignocelulósica de partida fue la siguiente: el 50 % en peso de celulosa, el 25 % en peso de hemicelulosa, el 25 % en peso de lignina, con respecto al peso total de la biomasa lignocelulósica de partida.

- 30 La mezcla de reacción así obtenida se mantuvo en agitación en un reactor, a 180 °C, durante 10 minutos, obteniendo una primera mezcla que comprendía una primera fase sólida (que incluía celulosa y lignina) y una primera fase acuosa (que incluía azúcares y ácido sulfúrico).

- 35 Dicha primera mezcla de reacción se descargó del reactor y se sometió a filtración y se obtuvieron los siguientes productos: 2,7 kg (peso seco) de una primera fase sólida (que comprendía celulosa y lignina) y 22 litros de una primera fase acuosa (que comprendía 51 g/l de azúcares, de los que 33 g/l eran de xilosa que se derivaba de la hidrólisis ácida de hemicelulosa y 9 g/l eran de glucosa derivada de la hidrólisis ácida de celulosa y ácido sulfúrico).

- 40 Dicha primera fase acuosa se sometió a neutralización, en un reactor agitado, mediante la adición de hidróxido de calcio, hasta que se alcanzó un pH igual a 6,5 y, posteriormente, se sometió a filtración, con el fin de eliminar la sal (es decir, el sulfato de calcio) que se había formado. A continuación, se añadieron 1,1 kg de zeolita CBV28014 (tipo MFI con una relación de Si/Al = 140) de Zeolyst International a dicha primera fase acuosa, en un reactor agitado. Se dejó la suspensión obtenida, en agitación, a 25 °C, a presión atmosférica (0,1 MPa (1 bar)), durante 4 horas y, posteriormente, se filtró para separar la zeolita, obteniendo 22 litros de una tercera fase acuosa que tenía un contenido de furfural y de hidroximetilfurfural inferior a 0,1 g/l y un contenido de azúcares igual a 46,41 g/l, de los que 30 g/l eran de xilosa y 8,3 g/l eran de glucosa.

- 45 El contenido de furfural y de hidroximetilfurfural se determinó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) usando una columna Zorbax Bonus RP (100 mm x 2,1 mm, 3,5 µm) de Agilent, con una fase móvil 0,01 mM de ácido acético en una solución acuosa de ácido fórmico al 0,2 %.

El contenido de azúcar se determinó mediante cromatografía de intercambio iónico (HPAE-PAD), usando un cromatógrafo Dionex, equipado con una columna Carbowac PA100, con un gradiente de hidróxido de sodio y acetato de sodio como contraión.

A los anteriores 2,7 kg de dicha primera fase sólida, se añadieron 18,4 litros de una solución acuosa de ácido sulfúrico al 0,5 %.

La mezcla de reacción así obtenida se mantuvo, en agitación, en un reactor, a 230 °C, durante 1 minuto, obteniendo una segunda mezcla que comprendía una segunda fase sólida (que comprendía lignina) y una segunda fase acuosa (que comprendía azúcares y ácido sulfúrico).

Dicha segunda mezcla de reacción se descargó del reactor y se sometió a filtración y se obtuvieron los siguientes productos: 1,2 kg (peso seco) de una segunda fase sólida (que comprendía lignina) y 18 litros de una segunda fase acuosa (que comprendía 53 g/l de azúcares, de los que 52 g/l eran de glucosa que se derivaba de la hidrólisis ácida de celulosa y ácido sulfúrico).

Dicha segunda fase acuosa se sometió a neutralización, en un reactor agitado, mediante la adición de hidróxido de calcio, hasta que se alcanzó un pH igual a 6,5 y, posteriormente, se sometió a filtración, con el fin de eliminar la sal (es decir, el sulfato de calcio) que se había formado. A continuación, se añadieron 1,1 kg de zeolita CBV28014 (tipo MFI con una relación de Si/Al = 140) de Zeolyst International a dicha segunda fase acuosa, en un reactor agitado. Se dejó la suspensión obtenida, en agitación, a 25 °C, a presión atmosférica (0,1 MPa (1 bar)), durante 4 horas y, posteriormente, se filtró para separar la zeolita, obteniendo 18 litros de una cuarta fase acuosa que tenía un contenido de furfural y de hidroximetilfurfural inferior a 0,1 g/l (dicho contenido se midió tal como se ha descrito anteriormente) y un contenido de azúcares igual a 48,23 g/l, de los que 47 g/l eran de glucosa y trazas de otros azúcares (dicho contenido se determinó tal como se ha descrito anteriormente).

Fermentación

La fermentación se llevó a cabo en un fermentador de 20 litros.

Para este fin, la cepa de *Rhodotorula graminis* DBVPG 4620 se cultivó en un medio YEPG para levaduras que contenían el 2 % en peso de glucosa, en un matraz de 0,5 litros, durante una noche, en agitación (170 rpm), a 30 °C, alcanzando una concentración igual a 0,1 g/l (peso seco). Dicho cultivo se usó como inóculo.

El inóculo obtenido tal como se ha descrito anteriormente se alimentó al fermentador anterior junto con 8 litros de dicha tercera fase acuosa obtenida tal se ha descrito anteriormente.

Las células de *Rhodotorula graminis* DBVPG 4620 se cultivaron, en agitación, a 500 rpm, a 30 °C, 1 l/min de aireación por litro de cultivo de aire estéril, a pH igual a 5,5, durante 36 horas, obteniendo 124 g de una primera biomasa celular oleaginosa (una concentración igual a 15 g/l, en peso seco).

Los 14 litros restantes de dicha tercera fase acuosa se alimentaron (alimentación por lotes de alimentación), a continuación, a dicho fermentador que contenía dicho primer caldo de cultivo que comprendía una primera biomasa celular oleaginosa, a una velocidad de alimentación creciente que variaba de 0,9 l/h (velocidad de alimentación de partida) a 2,5 l/h (velocidad de alimentación final), obteniendo un volumen de cultivo, después de 44 horas, en las mismas condiciones operativas indicadas anteriormente, igual a 20 litros. Al final, se obtuvieron 413 g de una primera biomasa celular oleaginosa [concentración igual a 20,2 g/l (peso seco)].

Se alimentaron 18 litros de dicha cuarta fase acuosa obtenida tal como se ha descrito anteriormente, en continuo, a dicho fermentador, manteniendo el volumen del caldo de fermentación constantemente en 20 litros, con una velocidad de alimentación creciente que variaba de 0,19 l/h (velocidad de alimentación de partida) a 0,31 l/h (velocidad de alimentación final). Toda la mezcla se mantuvo en agitación a 500 rpm, a 30 °C, 1 l/min de aireación por litro de cultivo de aire estéril, a pH igual a 5,5, durante 76 horas.

Se conectó un aparato de microfiltración al fermentador, por medio de una bomba peristáltica, equipado con una membrana de microfiltración "Hydrosart® Microfiltration Cassettes" de Sartorius, con el fin de eliminar el medio de cultivo agotado (permeado) y concentrar la segunda biomasa celular oleaginosa (retenido) producida en dicho segundo caldo de cultivo. Para este fin, dicha bomba peristáltica se activaba cada hora, durante 4 minutos, por cada ciclo de 24 horas, retirando parte de dicho segundo caldo de cultivo que comprendía dicha segunda biomasa celular oleaginosa, operando a una velocidad de filtración igual a 150 ml/min. Por tanto, se concentró 5 veces dicha segunda biomasa celular oleaginosa, obteniendo un retenido (es decir, una segunda biomasa celular oleaginosa concentrada), que se alimentó al fermentador con una velocidad de alimentación igual a 0,31 l/h, y un permeado (es decir, un medio de cultivo agotado), que se eliminó.

Al final de la fermentación, las células de levadura se recogieron y centrifugaron a 7.000 rpm, durante 20 minutos, obteniendo 1.500 g de dicha segunda biomasa celular oleaginosa [760 g (peso seco), concentración igual a 38 g/l (peso seco)].

Recuperación de los lípidos

La recuperación de los lípidos se llevó a cabo en un autoclave Brignole de 2 litros mod. AU-2.

Para este fin, se alimentaron 1.500 g [760 g (peso seco)] de la biomasa celular oleaginosa obtenida tal como se ha descrito anteriormente al autoclave anterior mantenido a una presión igual a 0,49 MPa (4,9 bar) y a una temperatura igual a 140 °C, durante 4 horas.

Después de 4 horas en las condiciones anteriores, se descargaron del autoclave 1.410 g [714 g (peso seco)] de biomasa celular oleaginosa. Dicha biomasa celular oleaginosa se sometió a dos ciclos de extracción, 2 horas por cada ciclo, en un extractor de reflujo equipado con un termostato, a una temperatura igual a 45 °C, en presencia de acetato de etilo (volumen de acetato de etilo igual a 4 veces el peso de dicha biomasa celular oleaginosa), obteniendo: (i) una fase de disolvente que comprendía lípidos y (ii) una fase sólida húmeda que comprendía restos celulares y trazas de lípidos no separados.

Dicha fase de disolvente (i) y dicha fase sólida húmeda (ii) se separaron mediante filtración.

Dicha fase de disolvente (i) se sometió a determinación del contenido de lípidos. Se demostró que el contenido total de lípidos obtenido era igual a 342 g [rendimiento de recuperación igual al 92 %, calculado con respecto a la cantidad total de lípidos presentes en dicha segunda biomasa celular oleaginosa (seca) obtenida después de la fermentación].

El contenido de lípidos se determinó usando el método colorimétrico, que se basa en la reacción de los lípidos con ácido fosfórico y fosfo-vanillina.

Se demostró que dicha fase sólida húmeda (ii) comprendía agua y restos celulares, incluyendo el 42 % en peso (peso seco) de polisacáridos y el 45 % en peso de proteínas (peso seco).

El contenido de polisacáridos se determinó mediante lectura espectrofotométrica usando el método de Fehling; el contenido de proteína se determinó por medio del método de Bradford.

EJEMPLO 2Hidrólisis ácida

Se añadieron 4 kg de aserrín de álamo (diámetro de partícula < 1 mm) a 22,8 litros de una solución acuosa de ácido sulfúrico al 0,5 %.

La composición de la biomasa lignocelulósica de partida fue la siguiente: el 50 % en peso de celulosa, el 25 % en peso de hemicelulosa, el 25 % en peso de lignina, con respecto al peso total de la biomasa lignocelulósica de partida.

La mezcla de reacción así obtenida se mantuvo en agitación en un reactor, a 180 °C, durante 10 minutos, obteniendo una primera mezcla que comprendía una primera fase sólida (que incluía celulosa y lignina) y una primera fase acuosa (que incluía azúcares y ácido sulfúrico).

Dicha primera mezcla de reacción se descargó del reactor y se sometió a filtración y se obtuvieron los siguientes productos: 2,7 kg (peso seco) de una primera fase sólida (que comprendía celulosa y lignina) y 22 litros de una primera fase acuosa (que comprendía 51 g/l de azúcares, de los que 33 g/l eran de xilosa que se derivaba de la hidrólisis ácida de hemicelulosa y 9 g/l eran de glucosa derivada de la hidrólisis ácida de celulosa y ácido sulfúrico).

Dicha primera fase acuosa se sometió a neutralización, en un reactor agitado, mediante la adición de hidróxido de calcio, hasta que se alcanzó un pH igual a 6,5 y, posteriormente, se sometió a filtración, con el fin de eliminar la sal (es decir, el sulfato de calcio) que se había formado. A continuación, se añadieron 1,1 kg de zeolita CBV28014 (tipo MFI con una relación de Si/Al = 140) de Zeolyst International a dicha primera fase acuosa, en un reactor agitado. Se dejó la suspensión obtenida, en agitación, a 25 °C, a presión atmosférica (0,1 MPa (1 bar)), durante 4 horas y, posteriormente, se filtró para separar la zeolita, obteniendo 22 litros de una tercera fase acuosa que tenía un contenido de furfural y de hidroximetilfurfural inferior a 0,1 g/l y un contenido de azúcares igual a 46,41 g/l, de los que 30 g/l eran de xilosa y 8,3 g/l eran de glucosa.

El contenido de furfural y de hidroximetilfurfural se determinó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) usando una columna Zorbax Bonus RP (100 mm x 2,1 mm, 3,5 µm) de Agilent, con una fase móvil 0,01 mM de ácido acético en una solución acuosa de ácido fórmico al 0,2 %.

El contenido de azúcar se determinó mediante cromatografía de intercambio iónico (HPAE-PAD), usando un

cromatógrafo Dionex, equipado con una columna Carbowac PA100, con un gradiente de hidróxido de sodio y acetato de sodio como contraión.

A los anteriores 2,7 kg de dicha primera fase sólida, se añadieron 18,4 litros de una solución acuosa de ácido sulfúrico al 0,5 %.

- 5 La mezcla de reacción así obtenida se mantuvo, en agitación, en un reactor, a 230 °C, durante 1 minuto, obteniendo una segunda mezcla que comprendía una segunda fase sólida (que comprendía lignina) y una segunda fase acuosa (que comprendía azúcares y ácido sulfúrico).

- 10 Dicha segunda mezcla de reacción se descargó del reactor y se sometió a filtración y se obtuvieron los siguientes productos: 1,2 kg (peso seco) de una segunda fase sólida (que comprendía lignina) y 18 litros de una segunda fase acuosa (que comprendía 53 g/l de azúcares, de los que 52 g/l eran de glucosa que se derivaba de la hidrólisis ácida de celulosa y ácido sulfúrico).

- 15 Dicha segunda fase acuosa se sometió a neutralización, en un reactor agitado, mediante la adición de hidróxido de calcio, hasta que se alcanzó un pH igual a 6,5 y, posteriormente, se sometió a filtración, con el fin de eliminar la sal (es decir, el sulfato de calcio) que se había formado. A continuación, se añadieron 1,1 kg de zeolita CBV28014 (tipo MFI con una relación de Si/Al = 140) de Zeolyst International a dicha segunda fase acuosa, en un reactor agitado. Se dejó la suspensión obtenida, en agitación, a 25 °C, a presión atmosférica (0,1 MPa (1 bar)), durante 4 horas y, posteriormente, se filtró para separar la zeolita, obteniendo 18 litros de una cuarta fase acuosa que tenía un contenido de furfural y de hidroximetilfurfural inferior a 0,1 g/l (dicho contenido se midió tal como se ha descrito anteriormente) y un contenido de azúcares igual a 48,23 g/l, de los que 47 g/l eran de glucosa y trazas de otros azúcares (dicho contenido se determinó tal como se ha descrito anteriormente).
- 20

Fermentación

La fermentación se llevó a cabo en un fermentador de 20 litros.

- 25 Para este fin, la cepa de *Rhodotorula graminis* DBVPG 4620 se cultivó en un medio YEPG para levaduras que contenían el 2 % en peso de glucosa, en un matraz de 0,5 litros, durante una noche, en agitación (170 rpm), a 30 °C, alcanzando una concentración igual a 0,1 g/l (peso seco). Dicho cultivo se usó como inóculo.

Se añadieron 15 g/l de licor de maíz macerado a dichos 22 litros de la tercera fase acuosa obtenida tal como se ha descrito anteriormente.

El inóculo obtenido tal como se ha descrito anteriormente se alimentó al fermentador anterior junto con 8 litros de dicha tercera fase acuosa que contenía licor de maíz macerado.

- 30 Las células de *Rhodotorula graminis* DBVPG 4620 se cultivaron, en agitación, a 500 rpm, a 30 °C, 1 l/min de aireación por litro de cultivo de aire estéril, a pH igual a 5,5, durante 36 horas, obteniendo 124 g de una primera biomasa celular oleaginosa (una concentración igual a 15 g/l, en peso seco).

- 35 Los 14 litros restantes de dicha tercera fase acuosa que contenía licor de maíz macerado se alimentaron (alimentación por lotes de alimentación), a continuación, a dicho fermentador que contenía dicho primer caldo de cultivo que comprendía una primera biomasa celular oleaginosa, a una velocidad de alimentación creciente que variaba de 0,9 l/h (velocidad de alimentación de partida) a 2,5 l/h (velocidad de alimentación final), obteniendo un volumen de cultivo, después de 44 horas, en las mismas condiciones operativas indicadas anteriormente, igual a 20 litros. Al final, se obtuvieron 429 g de una primera biomasa celular oleaginosa [concentración igual a 23,55 g/l (peso seco)].

- 40 Se alimentaron 18 litros de dicha cuarta fase acuosa obtenida tal como se ha descrito anteriormente, en continuo, a dicho fermentador, manteniendo el volumen del caldo de fermentación constantemente en 20 litros, con una velocidad de alimentación creciente que variaba de 0,19 l/h (velocidad de alimentación de partida) a 0,31 l/h (velocidad de alimentación final). Toda la mezcla se mantuvo en agitación a 500 rpm, a 30 °C, 1 l/min de aireación por litro de cultivo de aire estéril, a pH igual a 5,5, durante 76 horas.

- 45 Se conectó un aparato de microfiltración al fermentador, por medio de una bomba peristáltica, equipado con una membrana de microfiltración "Hydrosart® Microfiltration Cassettes" de Sartorius, con el fin de eliminar el medio de cultivo agotado (permeado) y concentrar la segunda biomasa celular oleaginosa (retenido) producida en dicho segundo caldo de cultivo. Para este fin, dicha bomba peristáltica se activaba cada hora, durante 4 minutos, por cada ciclo de 24 horas, retirando parte de dicho segundo caldo de cultivo que comprendía dicha segunda biomasa celular oleaginosa, operando a una velocidad de filtración igual a 150 ml/min. Por tanto, se concentró 5 veces dicha segunda biomasa celular oleaginosa, obteniendo un retenido (es decir, una segunda biomasa celular oleaginosa concentrada), que se alimentó al fermentador con una velocidad de alimentación igual a 0,31 l/h, y un permeado (es decir, un medio
- 50

de cultivo agotado), que se eliminó.

Al final de la fermentación, las células de levadura se recogieron y centrifugaron a 7.000 rpm, durante 20 minutos, obteniendo 1.560 g de dicha segunda biomasa celular oleaginosa [790 g (peso seco), concentración igual a 39,5 g/l (peso seco)].

5 Recuperación de los lípidos

La recuperación de los lípidos se llevó a cabo en un autoclave Brignole de 2 litros mod. AU-2.

Para este fin, se alimentaron 1.560 g [790 g (peso seco)] de la biomasa celular oleaginosa obtenida tal como se ha descrito anteriormente al autoclave anterior mantenido a una presión igual a 0,49 MPa (4,9 bar) y a una temperatura igual a 140 °C, durante 4 horas.

- 10 Después de 4 horas en las condiciones anteriores, se descargaron del autoclave 1.466 g [742 g (peso seco)] de biomasa celular oleaginosa. Dicha biomasa celular oleaginosa se sometió a dos ciclos de extracción, 2 horas por cada ciclo, en un extractor de reflujo equipado con un termostato, a una temperatura igual a 45 °C, en presencia de acetato de etilo (volumen de acetato de etilo igual a 4 veces el peso de dicha biomasa celular oleaginosa), obteniendo: (i) una fase de disolvente que comprendía lípidos y (ii) una fase sólida húmeda que comprendía restos celulares y trazas de lípidos no separados.
- 15

Dicha fase de disolvente (i) y dicha fase sólida húmeda (ii) se separaron mediante filtración.

Dicha fase de disolvente (i) se sometió a determinación del contenido de lípidos. Se demostró que el contenido total de lípidos obtenido era igual a 418 g [rendimiento de recuperación igual al 94 %, calculado con respecto a la cantidad total de lípidos presentes en dicha segunda biomasa celular oleaginosa (seca) obtenida después de la fermentación].

- 20 El contenido de lípidos se determinó usando el método colorimétrico, que se basa en la reacción de los lípidos con ácido fosfórico y fosfo-vanillina.

Se demostró que dicha fase sólida húmeda (ii) comprendía agua y restos celulares, incluyendo el 42 % en peso (peso seco) de polisacáridos y el 45 % en peso de proteínas (peso seco).

- 25 El contenido de polisacáridos se determinó mediante lectura espectrofotométrica usando el método de Fehling; el contenido de proteína se determinó por medio del método de Bradford.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la producción de lípidos a partir de biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, que comprende:
 - someter dicha biomasa, incluyendo 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 oleaginosa, obteniendo un primer caldo de fermentación que comprende una primera biomasa celular oleaginosa;
 - someter dicha primera fase sólida a hidrólisis ácida o a 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 oleaginosa, incluyendo 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.
2. El proceso para la producción de lípidos a partir de biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, es
 - (i) una biomasa lignocelulósica, y/o
 - (ii) se somete a un proceso de trituración preliminar antes de someterse a dicha hidrólisis ácida.
3. El proceso para la producción de lípidos a partir de biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha hidrólisis ácida se lleva a cabo en presencia de al menos un ácido inorgánico, estando dicho ácido inorgánico:
 - (i) seleccionado de: ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico o mezclas de los mismos, y/o
 - (ii) presente en dicha solución acuosa a una concentración que varía del 0,1 % en peso al 2 % en peso con respecto al peso total de la solución acuosa.
4. El proceso para la producción de lípidos a partir de biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, o dicha primera fase sólida está presente en la mezcla de reacción en una cantidad que varía del 5 % en peso al 20 % en peso con respecto al peso total de la mezcla de reacción.
5. El proceso para la producción de lípidos a partir de biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se lleva a cabo dicha hidrólisis ácida
 - (i) a una temperatura que varía de 140 °C a 270 °C, y/o
 - (ii) durante un tiempo que varía de 10 segundos a 30 minutos.
6. El proceso para la producción de lípidos a partir de biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha primera fase acuosa y/o dicha segunda fase acuosa se
 - (i) someten a un tratamiento con al menos un material adsorbente, obteniendo una tercera fase acuosa y/o una cuarta fase acuosa, respectivamente, y/o
 - (ii) someten a neutralización mediante la adición de al menos un óxido y/o de al menos un hidróxido, tal como óxido de calcio, hidróxido de calcio o hidróxido de bario o mezclas de los mismos, antes de someterse a dicho tratamiento con al menos un material adsorbente.
7. El proceso para la producción de lípidos a partir de biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, de acuerdo con la reivindicación 6, en donde se lleva a cabo dicho tratamiento con al menos un material adsorbente
 - (i) a una temperatura que varía de 10 °C a 150 °C, y/o
 - (ii) a una presión que varía de 0,05 MPa (0,5 bar) a 1 MPa (10 bar) y/o
 - (iii) durante un tiempo que varía de 10 minutos a 6 horas.
8. El proceso para la producción de lípidos a partir de biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en donde dicho material adsorbente se
 - (i) selecciona de silicatos microporosos cristalinos o silicatos de metal del tipo zeolita que tienen estructuras MFI, MOR, FAU o BEA, y/o

(ii) añade a dicha primera fase acuosa y/o dicha segunda fase acuosa en una cantidad que varía del 0,5 % en peso al 50 % en peso con respecto al peso total de dicha primera fase acuosa o de dicha segunda fase acuosa.

9. El proceso para la producción de lípidos a partir de biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se lleva a cabo dicha fermentación

- 5 (i) a una temperatura que varía de 20 °C a 40 °C, y/o
(ii) durante un tiempo que varía de 2 días a 10 días y/o
(iii) a un pH que varía de 4,5 a 7.

10. El proceso para la producción de lípidos a partir de biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha levadura oleaginosa se puede seleccionar de:
10 *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula gracilis*, *Rhodotorula graminis*, *Lypomices starkeyi*, *Lypomices lipofer*, *Trigonopsis variabilis*, *Candida kefir*, *Candida curvata*, *Candida lipolytica*, *Torulopsis sp.*, *Pichia stipitis*.

11. El proceso para la producción de lípidos a partir de biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha microfiltración se lleva a cabo por medio de membranas basadas en celulosa regenerada o por medio de membranas cerámicas.

15 12. El proceso para la producción de lípidos a partir de biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho proceso comprende añadir licor de maíz macerado a dicho dispositivo de fermentación en una cantidad que varía de 2 g/l a 20 g/l.

20 13. El proceso para la producción de lípidos a partir de biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho proceso comprende someter dicha segunda biomasa celular oleaginosa, incluyendo lípidos, a tratamiento térmico, en donde se lleva a cabo dicho tratamiento térmico

- (i) a una presión que varía de 0,2 MPa (2 bar) a 0,65 MPa (6,5 bar), y/o
(ii) a una temperatura que varía de 100 °C a 160 °C, y/o
(iii) durante un tiempo que varía de 1 hora a 8 horas.

25 14. El proceso para la producción de lípidos a partir de biomasa, incluyendo al menos un polisacárido, de acuerdo con la reivindicación 13, en donde, al final de dicho tratamiento térmico, la biomasa celular oleaginosa se somete a extracción, en presencia de al menos un disolvente orgánico, tal como acetato de etilo.

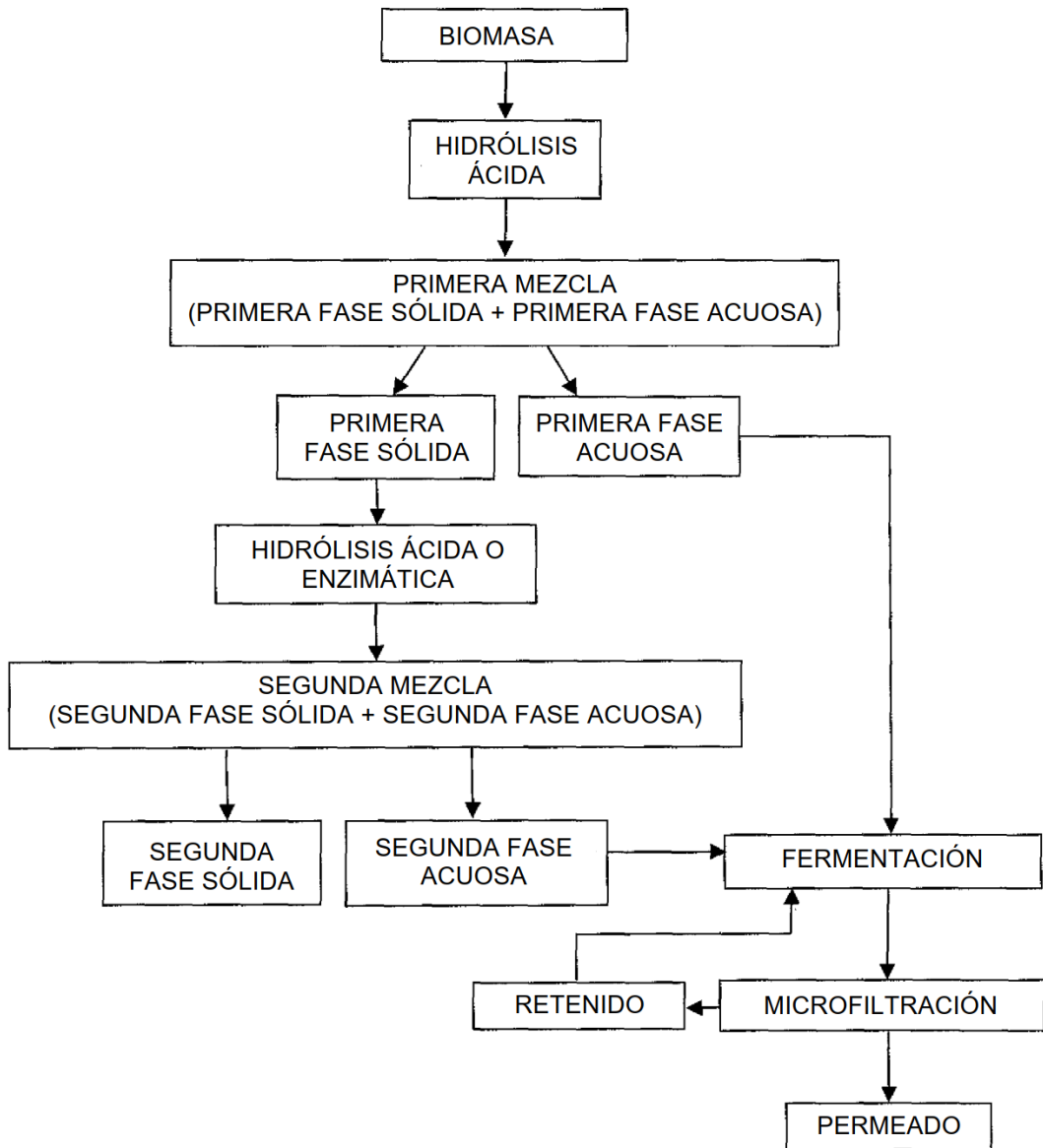


Fig. 1

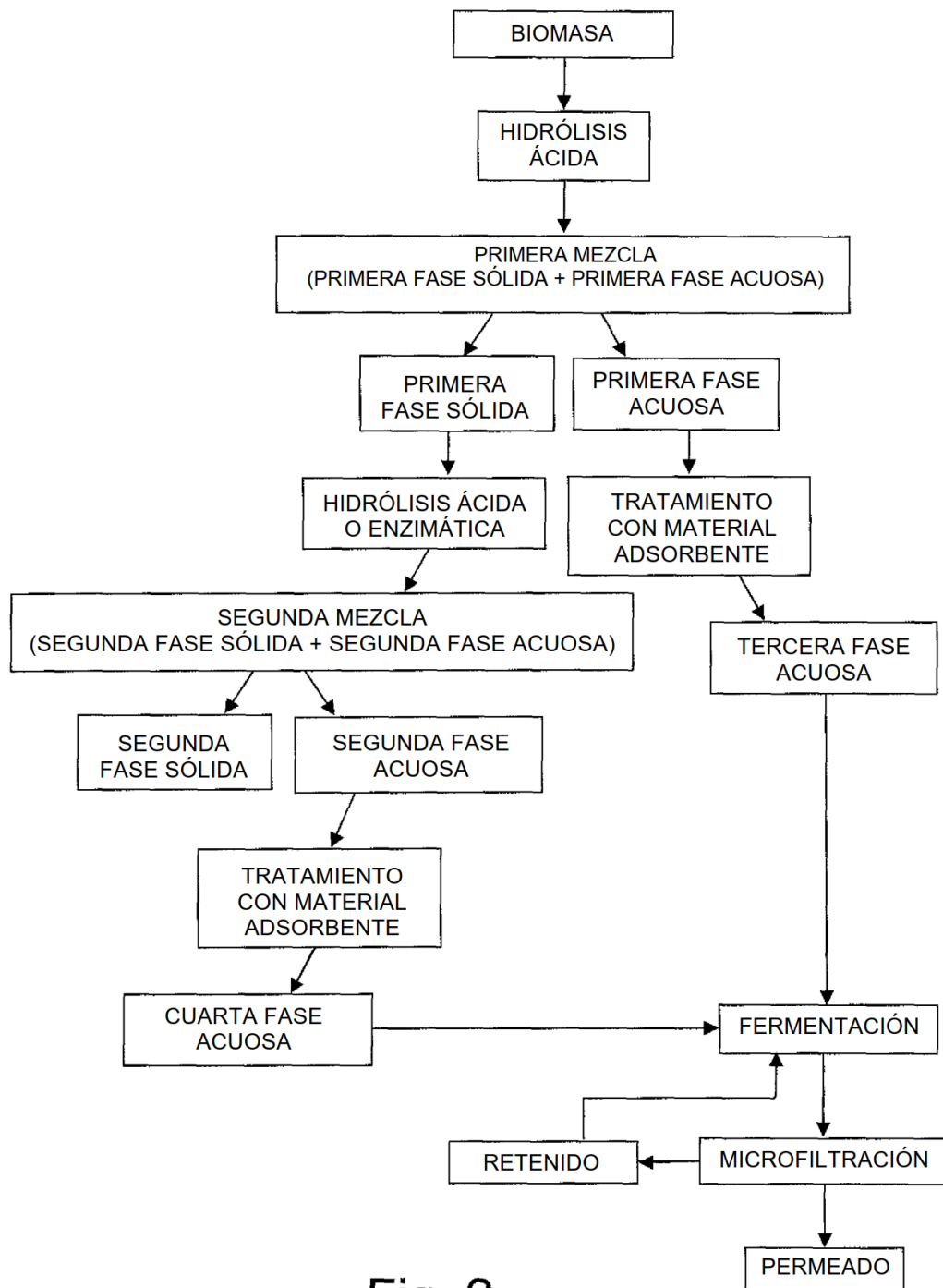


Fig. 2