

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 765**

21 Número de solicitud: 201230880

51 Int. Cl.:

C12P 7/06 (2006.01)
A23K 1/06 (2006.01)
A23K 1/14 (2006.01)
A23L 1/337 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

06.06.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.12.2013

71 Solicitantes:

**ABENGOA BIOENERGÍA NUEVAS
TECNOLOGÍAS, S.A. (100.0%)
C/ Energía Solar, 1 Campus Palmas Altas
41014 Sevilla ES**

72 Inventor/es:

**REYES SOSA, Francisco Manuel;
PIERA ALBEROLA, María;
ZAZPE CENOZ, Maite y
IRURETAGOYENA ALDAZ, Javier**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Procedimiento de producción de biocombustibles y co-productos alimentarios empleando extractos de cultivo de microalgas**

57 Resumen:

Procedimiento de producción de biocombustibles y co-productos alimentarios empleando extractos de cultivo de microalgas.

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de biocombustibles y co-productos alimentarios el cual, gracias a la adición de extractos de cultivos de microalgas, consigue optimizar la producción del biocombustible, en términos de tiempo y rendimiento, y mejorar la composición proteica de sus co-productos útiles en la industria alimentaria, en comparación con los métodos similares de producción de biocombustibles y co-productos que no utilizan extractos de cultivos de microalgas.

ES 2 433 765 A1

DESCRIPCIÓN

5 Procedimiento de producción de biocombustibles y co-productos alimentarios empleando extractos de cultivo de microalgas.

La presente invención se encuadra en el campo de los biocombustibles, específicamente se refiere a un procedimiento de producción de biocombustibles, preferiblemente de etanol o bioetanol, y co-productos alimentarios a partir de biomasa vegetal fermentable, en el cual se emplea un extracto de un cultivo de microalgas de manera previa o posterior al proceso fermentativo.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 Convencionalmente, el etanol se produce por un proceso de síntesis química en el que éste es sintetizado a partir de fuentes fósiles, como carbón o petróleo, vía etileno; o bien por un proceso de fermentación a partir de biomasa, como la caña de azúcar, el maíz o el almidón, gracias a la acción de microorganismos tales como las levaduras. En líneas generales, esta última vía de producción de etanol consiste en un proceso biológico de producción de CO₂, etanol y un co-producto rico en proteínas y valorizable como pienso animal (DDGs, del inglés “Dried Distillers Grains with Solubles”).

20 Actualmente, se ha venido desarrollando la tecnología de producción de microalgas para biocombustibles, en menor medida bioetanol (EP0645456, WO2008105618). Así, se han propuesto algunos procesos para la producción de etanol que utilizan almidón procedente de microalgas como material de partida. Algunas de estas microalgas contienen gran cantidad (más del 50% en peso seco) de almidón y glucógeno y, por tanto, son útiles como material de partida para la producción de etanol, por ejemplo, aquellas pertenecientes a los géneros *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* o *Spirulina*.

30 Según la bibliografía, la producción de etanol utilizando el almidón procedente de microalgas como material de partida se lleva a cabo según el siguiente procedimiento: en un primer paso, se cultiva fotoautotróficamente la microalga en presencia de luz de manera que ésta asimila el CO₂ por fotosíntesis, o se cultiva heterotróficamente en oscuridad y en presencia de materiales orgánicos tales como azúcares y ácidos orgánicos. En un segundo paso, ya que la microalga almacena almidón u otros polisacáridos fermentables en el interior de las células durante su crecimiento, este almidón se libera de las mismas con ayuda de medios mecánicos, tales como ultrasonidos o desintegración, o mediante el uso de enzimas para disolver las paredes celulares. Posteriormente, el almidón se separa por extracción con agua o con un solvente orgánico. En un tercer paso, el almidón separado por extracción se hidroliza a glucosa por medio de enzimas amilasas sacarogénicas. Finalmente, esta glucosa es fermentada por la adición de levaduras capaces de llevar a cabo una fermentación alcohólica y así la glucosa se convierte en etanol.

40 No obstante, continúa existiendo la necesidad de desarrollar procesos de producción de etanol útil como biocombustible, y de sus co-productos alimentarios, más eficientes a nivel industrial que, por ejemplo, supongan una mejora, en términos de tiempo y rendimiento, en las fermentaciones etanológicas a partir de cereal y/o en la valorización o enriquecimiento de sus co-productos útiles en alimentación.

45 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un procedimiento de producción de un biocombustible, preferiblemente etanol, y co-productos alimentarios, de ahora en adelante “procedimiento de la invención”, el cual, gracias a la adición de extractos de cultivos de microalgas, consigue optimizar los procesos de producción industrial de biocombustibles, preferiblemente etanol, por fermentación, en términos de tiempo y rendimiento, y mejorar la composición proteica de sus co-productos útiles en la industria alimentaria.

55 Como se verá en los ejemplos, el procedimiento de la invención supone una mejora de los tiempos y rendimientos de la fermentación de biomasa vegetal fermentable para la producción de biocombustibles, como el etanol, en comparación con los procesos que no utilizan extractos de microalgas. Además, los co-productos alimentarios obtenidos en dicho proceso, preferiblemente DDGs, presentan un mayor contenido proteico, lo que les confiere un gran valor en la industria alimentaria.

60 Otras ventajas asociadas a dicho procedimiento son que las microalgas empleadas en el proceso se producen en cultivos fotoautótrofos, donde el CO₂ se acaba asimilando gracias a la energía de la luz, lo cual supone una ventaja puesto que la emisión de CO₂ en una planta de producción de biocombustibles, como por ejemplo etanol, puede reutilizarse introduciéndose de nuevo en el proceso como nutriente en el cultivo de la microalga. Además, integrar un cultivo de microalgas a una planta de biocombustibles reduce costes de instalación y operación del primero, ya que se aprovechan corrientes mayoritariamente compuestas por CO₂ y, por tanto, el caudal de gases a impulsar es menor. Además, uno de los pasos más limitantes para la viabilidad de la producción de microalgas es su cosechado, sin embargo, con esta invención se reduce esta limitación al emplear extractos líquidos. Por

otro lado, en el procedimiento de la presente invención las etapas de fermentación se aceleran alcanzando los mismos o mayores rendimientos que en procesos de producción de biocombustibles que no emplean extractos de microalgas. Esto supone la posibilidad de aumentar la capacidad de producción de las plantas ya en activo, sin modificación del proceso. Por otro lado, la producción de microalgas, al igual que ocurre con el resto de cultivos, es variable a lo largo del año pero en la presente invención, al integrar ambos procesos (producción de biocombustibles y cultivo de microalgas), la planta puede mantener la producción de manera continuada. Además, las microalgas suponen al mismo tiempo una fuente de nitrógeno en las mezclas de reacción, reduciéndose por tanto el consumo de éste (urea) durante el procedimiento de producción del biocombustible. Otra ventaja adicional es que las plantas actuales de producción de biocombustibles, particularmente las de producción de bioetanol, tienen corrientes residuales o de bajo coste con contenidos en nitrógeno y fósforo, las cuales son nutrientes para las microalgas. Por último, los co-productos alimentarios, preferiblemente DDGs, obtenidos en la fermentación, al estar enriquecidos en microalgas, presentan mejores cualidades nutricionales.

Por todo ello, un primer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de producción de un biocombustible, preferiblemente etanol, y co-productos alimentarios a partir de biomasa vegetal fermentable, "procedimiento de la invención", que comprende:

- a) preparar un medio acuoso que comprenda dicha biomasa,
- b) hidrolizar y fermentar, de manera simultánea o secuencial, la biomasa comprendida en el medio acuoso del paso (a), y
- c) destilar los productos obtenidos en el paso (b) para obtener el biocombustible, preferiblemente etanol, y co-productos alimentarios,

caracterizado porque además comprende la adición, en cualquier paso previo o posterior a la etapa de fermentación, de un extracto de un cultivo de microalgas.

Un "biocombustible", "biofuel" o "biocarburante" es un hidrocarburo, o una mezcla de los mismos, que puede ser utilizado como combustible y que se obtiene empleando como material de partida biomasa fermentable. Ejemplos de biocombustibles son, aunque sin limitarnos, etanol o bioetanol, biodiesel o hidrobiodiesel. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el biocombustible es etanol (bioetanol).

Se entiende por "biomasa vegetal fermentable" toda aquella biomasa procedente de plantas o de partes de las mismas que acumula azúcares simples o polisacáridos, es decir, polímeros cuyos monómeros son monosacáridos unidos repetitivamente por enlaces glucosídicos y que pueden descomponerse, por hidrólisis de dichos enlaces glucosídicos entre residuos, en polisacáridos más pequeños, así como en disacáridos o monosacáridos. Ejemplos de este tipo de biomasa son, aunque sin limitarnos, troncos, ramas, tallos, frutos, restos y residuos vegetales, etc. Dicha biomasa puede proceder de, por ejemplo aunque sin limitarnos, recolección agrícola (como cañas, pastos, paja o granos, etc.), trabajos silvícolas e industrias madereras (como ramas, cortezas, hojas, tocones, raíces, serrín, etc.), o de restos agrícolas como el hueso de aceituna, cáscara de almendra, piñas, etc. En una realización preferida, la biomasa vegetal fermentable a la que se refiere la invención se selecciona de la lista que consiste en: biomasa rica en azúcares fermentables, como por ejemplo aunque sin limitarnos la caña de azúcar, biomasa amilácea, como por ejemplo aunque sin limitarnos el grano de trigo, o material lignocelulósico, como por ejemplo aunque sin limitarnos la paja de maíz. En una realización más preferida, la biomasa vegetal fermentable es el grano de cereales. En una realización aun más preferida, el cereal es maíz, trigo, cebada o cualquiera de sus mezclas.

El medio acuoso al que se refiere el paso (a) del procedimiento de la invención puede consistir en, por ejemplo, aunque sin limitarnos, una mezcla de agua, enzimas para llevar a cabo una primera hidrólisis y tratamiento de la biomasa, correctores ácido-base, de viscosidad, nutrientes, antiespumantes y/o sales para la fermentación, y la biomasa vegetal fermentable molida y limpia de arenas u otras impurezas. Preferiblemente, dicho medio acuoso comprende las enzimas que se detallarán seguidamente (celulasas, amilasas, glucosidasas, etc.), ácido fosfórico, ácido sulfúrico, hidróxido sódico, hidróxido amónico, cloruro cálcico, urea, etc. y biomasa fermentable, más preferiblemente a un pH final de entre 4 y 6 y a temperaturas de entre 50 y 95 °C.

El término "hidrólisis" tal y como se utiliza en el paso (b) del procedimiento de la invención se refiere al proceso que a su vez comprende los pasos de licuefacción y sacarificación de la biomasa vegetal fermentable mediante el uso de enzimas hidrolíticas. El procedimiento de la invención se puede aplicar a procesos de producción de biocombustibles, preferiblemente etanol, y co-productos alimentarios tanto de primera como de segunda generación. Por tanto, estos dos pasos de licuefacción y sacarificación se pueden llevar a cabo de manera secuencial, por ejemplo aunque sin limitarnos, en un proceso de producción de biocombustibles, preferiblemente etanol, y co-productos alimentarios de primera generación, o simultánea, por ejemplo aunque sin limitarnos, en un proceso de producción de biocombustibles, preferiblemente etanol, y co-productos alimentarios de segunda generación. La hidrólisis de la biomasa comprendida en dicho medio acuoso se puede llevar a cabo mediante procesos de hidrólisis enzimática (licuefacción y sacarificación) conocidos por los expertos en la materia y ampliamente utilizados en los procesos de degradación de polisacáridos a glucosa. Estas enzimas hidrolasas son específicas para determinados polisacáridos y, sobre todo, para determinados tipos de enlace glucosídico. Así, por ejemplo, las enzimas que hidrolizan el almidón, cuyos enlaces son $\alpha(1\rightarrow4)$, no pueden descomponer la celulosa, cuyos enlaces son $\beta(1\rightarrow4)$, por tanto, las enzimas hidrolíticas utilizadas en el proceso de hidrólisis del

- paso (b) del procedimiento de la invención son, preferiblemente, amilasas, celulasas, alfa- y/o beta-glucosidasas, endoglucanasas, xilanasas, celobiohidrolasas, celobiosas deshidrogenasas, o cualquiera de sus mezclas. En el caso de que los pasos de licuefacción y sacarificación se lleven a cabo de manera secuencial, se añade al medio acuoso del paso (a) una primera mezcla enzimática que lleve a cabo el proceso de licuefacción y posteriormente
- 5 una segunda mezcla enzimática que lleve a cabo el proceso de sacarificación. En el caso de que los pasos de licuefacción y sacarificación se lleven a cabo de manera simultánea, se añade al medio acuoso del paso (a) una única mezcla enzimática que lleve a cabo los procesos de licuefacción y sacarificación. Dicho proceso de hidrólisis se lleva a cabo, preferiblemente, a una Tª de entre 50 y 95°C y a un pH de entre 4 y 6.
- 10 La fermentación del paso (b) del procedimiento de la invención se lleva a cabo, preferiblemente, mediante levaduras capaces de realizar una fermentación alcohólica de los azúcares obtenidos en el proceso de hidrólisis explicado en el párrafo anterior. Dicha levadura es, más preferiblemente, *Saccharomyces cerevisiae*. Este proceso de fermentación se lleva a cabo, por ejemplo aunque sin limitarnos, a una Tª de entre 28 y 38 °C y a un pH de entre 3 y 5.
- 15 La hidrólisis y fermentación del paso (b) del procedimiento de la invención se pueden llevar a cabo de manera simultánea, adicionando simultáneamente al medio acuoso comprendiendo la biomasa del paso (a) enzimas hidrolasas y la levadura encargada de llevar a cabo la fermentación, o bien de manera secuencial, adicionando a dicho medio las enzimas hidrolasas y, una vez finalizada la hidrólisis, adicionando la levadura encargada de
- 20 llevar a cabo la fermentación. Preferiblemente, en el procedimiento de la invención la hidrólisis y fermentación del paso (b) se llevan a cabo de manera simultánea, más preferiblemente son la sacarificación y la fermentación los pasos que se llevan a cabo de manera simultánea en el paso (b), aun más preferiblemente en las siguientes condiciones: Tª de entre 28 y 38 °C y pH de entre 3 y 5.
- 25 Posteriormente, en el paso (c) del procedimiento de la invención, se lleva a cabo una destilación del biocombustible, preferiblemente del etanol, obtenido en el paso (b) con una posterior rectificación, deshidratación y purificación final del mismo. Por su parte los co-productos para alimentación se concentran a partir del caldo de fermentación, preferiblemente por decantación y evaporación seguida de un secado y peletización.
- 30 El extracto del cultivo de microalgas empleado en el procedimiento de la invención puede proceder de un proceso de cultivo de microalgas que se esté llevando a cabo de manera paralela al procedimiento de la invención o bien puede ser de cualquier otra procedencia. Dicho extracto comprende tanto las microalgas como el medio de cultivo en el que éstas han sido cultivadas, el cual comprende agua. Preferiblemente, dicho medio de cultivo tiene como base agua dulce o salobre, más preferiblemente agua dulce. Además, dicho extracto puede
- 35 encontrarse en diversas formas, como por ejemplo aunque sin limitarnos, en formato líquido, seco, concentrado, etc. Sin embargo, ya que uno de los pasos más limitantes para la viabilidad de la producción de microalgas es su cosechado, es interesante reducir esta limitación empleando extractos líquidos. Por ello, en otra realización preferida, el extracto del cultivo de microalgas empleado en el procedimiento de la invención se encuentra en formato líquido.
- 40 La biomasa vegetal fermentable puede ser, opcionalmente, pre-tratada antes de su hidrólisis y/o fermentación en el paso (b), de manera que su posterior procesamiento enzimático, en hidrólisis, o fermentativo se vea optimizado. Por ello, en otra realización preferida, el extracto del cultivo de microalgas se añade al medio acuoso del paso (a), previamente al paso (b), para humedecer la biomasa vegetal fermentable y que los azúcares
- 45 simples o polisacáridos comprendidos en ella sean más accesibles a las enzimas hidrolíticas que los degradarán durante los pasos de licuefacción y sacarificación para dar lugar a azúcares fermentables.
- Alternativamente, el extracto de microalgas se puede añadir en otros puntos del procedimiento de la invención en lugar de en el explicado en el párrafo anterior. Así, en otra realización preferida, el procedimiento de la invención además comprende un paso de concentración de los co-productos alimentarios destilados en el paso (c) y el extracto del cultivo de microalgas se añade durante dicho paso de concentración, o inmediatamente después del mismo, de manera que así aumenta el valor proteico de dichos co-productos. Este paso de concentración de los co-productos alimentarios se puede realizar, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante centrifugación, evaporación, secado, etc.
- 50
- 55 En otra realización preferida, el procedimiento de la invención además comprende un paso de cultivo de microalgas del cual procede el extracto del cultivo de microalgas empleado de manera previa o posterior a la etapa de fermentación. Los nutrientes, CO₂ y agua utilizados en dicho cultivo pueden proceder de cualquier fuente de nutrientes, CO₂ y agua, pero en una realización más preferida, dicho cultivo de microalgas utiliza el CO₂, agua y otros nutrientes liberados en la etapa de fermentación del paso (b) o en la separación del/los
- 60 producto/s en el paso (c) del procedimiento de la invención. En una realización aun más preferida, dicho cultivo de microalgas utiliza como nutriente el nitrógeno liberado en la etapa de destilación del paso (c). De esta manera, los productos de deshecho liberados en estas etapas del procedimiento de la invención pueden aprovecharse introduciéndose de nuevo en dicho procedimiento. En una realización aun más preferida, el extracto del cultivo
- 65 de microalgas se obtiene a partir del procesado del cultivo de microalgas, y dicho procesado se selecciona de la lista que comprende: concentración, homogeneización y/o secado.

En otra realización preferida del procedimiento de la invención, las microalgas se seleccionan de entre los géneros: *Botryococcus*, *Neochloris*, *Nannochloropsis*, *Phorphyridium*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Spirulina*, o cualquiera de sus mezclas.

5

El procedimiento de la invención puede comprender otros pasos adicionales relacionados por ejemplo, aunque sin limitarnos, con el pre-tratamiento del material de partida (biomasa vegetal fermentable) o con el tratamiento de los productos destilados en el paso (c). Por ello, en otra realización preferida, la biomasa vegetal fermentable se limpia de tierra, polvo y arenas y es pre-tratada mediante molienda antes del paso (a), para que sus azúcares simples y/o polisacáridos sean más accesibles a las enzimas hidrolíticas que los degradarán para dar lugar a azúcares fermentables. En una realización más preferida, el procedimiento de la invención además comprende:

10

d) centrifugar los co-productos alimentarios destilados en el paso (c),

e) evaporar el producto obtenido en la centrifugación del paso (d),

f) secar el producto obtenido en el paso (e), y

15

g) peletizar el producto obtenido en el paso (f).

Otro aspecto de la invención se refiere a un co-producto alimentario obtenible mediante el procedimiento de la invención, de ahora en adelante "co-producto de la invención".

20

En la presente invención se entiende por "co-productos alimentarios" aquellos co-productos que se producen, junto con el biocombustible, preferiblemente etanol, en los procedimientos de producción de biocombustibles, preferiblemente etanol, mediante fermentación de biomasa vegetal fermentable. Dichos co-productos tienen un apreciado contenido proteico para alimentación animal, fruto de las proteínas residuales de levaduras y de la biomasa fermentable de partida, energía, minerales y/o vitaminas. Este tipo de co-productos pueden ser, aunque sin limitarnos, los conocidos como DDGs formados por la mezcla seca de insolubles y solubles del caldo tras la fermentación. Preferiblemente, el co-producto de la invención es un DDGs. Estos co-productos tienen una composición variable en función de diferentes parámetros del procedimiento de producción de biocombustibles, preferiblemente etanol, por el cual se obtienen, como pueden ser el material de partida, los pasos que se lleven a cabo, las condiciones físico-químicas en que transcurra dicho proceso, etc. Por ello, el co-producto de la invención presenta una composición específica que es consecuencia de las condiciones en que se lleve a cabo el procedimiento de la invención.

25

30

Como se verá en los ejemplos, el co-producto de la invención presenta un alto contenido proteico fundamentalmente debido al extracto del cultivo de microalgas empleado en el procedimiento de la invención, por ello es de aplicación en la industria alimentaria. Así, otro aspecto de la invención se refiere al uso del co-producto de la invención para alimentación humana y/o animal. Otro aspecto de la invención se refiere a un producto alimentario que comprende el co-producto de la invención. El producto alimentario al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o animal, aunque preferiblemente es de uso animal, más preferiblemente dicho producto alimentario es un pienso para alimentación animal.

35

40

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

45

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Esquema representativo del procedimiento de la invención. En gris claro se representan los bloques de proceso de la producción industrial de etanol. En gris oscuro se representan los bloques de proceso de la producción de microalgas. Con dobles líneas se marcan los posibles pasos de integración de los dos procesos según el procedimiento de la invención. Se detallan los pasos donde se producen corrientes que pueden ser aprovechables de uno a otro proceso.

50

Fig. 2. Esquema representativo de la simulación experimental del procedimiento de la invención modificando cada una de las concentraciones o condiciones para estudiar su efecto. Sombreadas en gris aparecen las principales técnicas empleadas para el seguimiento de los procesos. SFS: sacarificación y fermentación simultáneas.

55

Fig. 3. Seguimiento de la fermentación según el procedimiento de la invención. Resultados del análisis de azúcares fermentables por HPLC (líneas discontinuas) y del análisis gravimétrico del contenido en etanol (líneas continuas) durante las fermentaciones de trigo (círculos), mezclas (10:1) trigo-*Nannochloropsis gaditana* (triángulos) y mezclas (10:1) de trigo-posible *Chlorella* (cuadrados) todas con (símbolos rellenos) y sin la adición de urea (símbolos vacíos) a los caldos de fermentación.

60

65

Fig. 4. Seguimiento de la fermentación de diferentes biomásas de microalgas según el procedimiento de la invención. Resultados del análisis de azúcares fermentables por HPLC (líneas discontinuas) y del análisis gravimétrico del contenido en etanol (líneas continuas) que muestran la producción de etanol durante la fermentación de trigo (círculos), mezclas trigo-*B. braunii* (rombos), mezclas trigo-*N. oleoabundans* (triángulos) y mezclas trigo-*N. gaditana* (cuadrados).

Fig. 5. Seguimiento de la fermentación a diferentes proporciones de biomasa de microalgas según el procedimiento de la invención. Resultados del análisis de azúcares fermentables por HPLC (líneas discontinuas) y del análisis gravimétrico del contenido en etanol (líneas continuas) que muestran la producción de etanol durante la fermentación de trigo (círculos), mezclas trigo-*Chlorella* 10:1 (cuadrados) y mezclas trigo-*Chlorella* 8:1 (triángulos).

Fig. 6. Resultados del análisis de la fracción proteica. Aminograma y proteína bruta de la biomasa de partida y obtenida tras la fermentación y sacarificación simultáneas. A) DDGs de maíz; B) DDGs de la mezcla maíz-*Nannochloropsis*; C) DDGs de trigo; D) DDGs de la mezcla trigo-*Nannochloropsis*.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la eficiencia del procedimiento de la invención para producir biocombustibles, preferiblemente etanol, y co-productos alimentarios.

Materiales y Métodos

El esquema general de la mayoría de los ensayos se muestra en las figuras 1 y 2, modificando cada una de las concentraciones o condiciones para estudiar su efecto, como por ejemplo, dosificación de enzimas, ácidos, antiespumantes, concentración de microalgas, materia seca de la mezcla, programa de temperaturas, etc.

La biomasa de algas se cultivó en diferentes medios de laboratorio, con base de agua dulce o salada (Arnon, BE, F/2, etc.) o en medios de cultivo compuestos por fertilizantes agrícolas. Los cultivos fueron aireados con aire y/o aire enriquecido en CO₂.

La determinación del peso seco de los cultivos de algas se realizó lavando con formiato amónico según el procedimiento descrito por C. J. Zhu & Y. K. Lee (1997). Se concentró la biomasa de algas hasta un valor del 20% en extracto seco por centrifugación a 10000 x G durante 10 minutos. La mezcla se realizó en matraces enlenmeyer de 100 ml. Se añadió biomasa fermentable y biomasa de algas en una proporción 10:1 (peso seco). El volumen necesario hasta alcanzar un 30% de masa seca en las mezclas se completó con agua destilada y el pH se corrigió con H₂SO₄ hasta un valor comprendido entre 5.0 y 5.5. La dosificación de enzimas se realizó acorde a las especificaciones de los fabricantes en un porcentaje relativo a la cantidad de biomasa a hidrolizar (p/p).

La mezcla así preparada se mantuvo en agitación durante 30 minutos a una temperatura constante de 61 °C. Seguidamente a esta fase se elevó la temperatura a 85 °C en el proceso de licuefacción, manteniendo la mezcla en agitación constante durante 3,5 h. Transcurrido este tiempo se sometió al caldo a una sacarificación y fermentación simultánea (SFS) en anaerobiosis a 30°C, previo ajuste con ácido sulfúrico del pH a 3.8. Para ello se añadieron enzimas y antiespumante a las concentraciones recomendadas por los fabricantes. Como fuente de nitrógeno se añadió urea a una concentración final de 0,053%. Una vez compuesto este medio de fermentación se añadió el inóculo de levadura comercial etanológica a una concentración final de 10⁷ ufc/ml.

La producción de etanol se monitorizó por gravimetría y por cromatografía gases con detector de llama ionizada (GC-FID). El contenido en azúcares fermentables se cuantificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y empleando patrones de calibrado externo.

El contenido en masa seca se determinó por desecación en estufa a 103°C hasta peso constante (normalmente 8h), las cenizas por incineración en horno-mufla a 550 °C, la proteína bruta (Kjedahl), fibra bruta (ankom), el de grasa bruta por Soxhlet, todos ellos según procedimientos descritos en AOAC, 2000.

El contenido de carbohidratos se estimó siguiendo el procedimiento de la Antrona. La determinación de macronutrientes (calcio, magnesio, sodio y potasio) y micronutrientes (cobre, zinc, hierro y manganeso) se realizó mediante espectroscopia de absorción atómica.

Ejemplo 1. Sacarificación y fermentación simultánea de trigo, mezclas (10:1) trigo-*Nannochloropsis gaditana* y mezclas (10:1) trigo-*Chlorella*. Todas con y sin adición de urea como fuente de nitrógeno para la fermentación.

5 Siguiendo el procedimiento general descrito anteriormente se sacarificaron y fermentaron simultáneamente trigo y mezclas trigo-microalgas con una relación 10:1. Los caldos de fermentación alcanzaron un 30% en masa seca. Las enzimas se dosificaron a las concentraciones recomendadas por el fabricante tal y como ocurre en una planta de producción industrial de etanol a partir de cereal. Los resultados pueden verse en la figura 3. Como
10 puede verse en esta figura todas las mezclas con extracto de cultivo de algas ensayadas aceleran la producción de etanol al mismo tiempo que la asimilación de azúcares por las levaduras. Además puede verse que la adición del extracto de cultivo de microalgas mantiene la productividad de etanol y la asimilación de azúcares en niveles superiores a los obtenidos sin añadir fuente de nitrógeno (urea) al medio de fermentación.

Ejemplo 2. Sacarificación y fermentación de varias especies de microalgas y trigo.

15 En este ejemplo se muestran los valores obtenidos con varias muestras de algas (*Botryococcus braunii*, *Neochloris oleabundans* y *Nannochloropsis gaditana*).

20 Siguiendo el procedimiento general descrito anteriormente se sacarificó primero y posteriormente se fermentó trigo y mezclas trigo-microalgas con una relación 4:1. La sacarificación se realizó con enzimas dosificadas al 1%. Los caldos de fermentación alcanzaron un 25% en masa seca y no se suplementaron con urea como fuente de nitrógeno.

25 Los resultados pueden verse en la figura 4. Como puede verse en esta figura todas las mezclas ensayadas aceleran la producción de etanol al mismo tiempo que la asimilación de azúcares por las levaduras. Los rendimientos obtenidos varían entre las diferentes mezclas, alcanzando diferente productividad de etanol según también la contribución inicial en carbohidratos de cada especie de microalga.

Ejemplo 3. Sacarificación y fermentación simultáneas a varias proporciones trigo-*Chlorella* sp.

30 En este ejemplo se muestran los resultados obtenidos tras la sacarificación y fermentación simultáneas de trigo (control) y dos mezclas (10:1 y 8:1) de trigo y biomasa de *Chlorella* sp. Se dosificaron las enzimas de sacarificación en exceso (1%) frente a la masa seca del caldo de fermentación (en este ejemplo 20%).

35 Como puede verse en la figura 5, a estas proporciones y teniendo en cuenta la pequeña cantidad de carbohidratos fermentables que aporta, en este caso, la biomasa de microalgas (6,3% según el método de la Antrona), los valores finales de etanol coinciden con la muestra control de trigo y únicamente puede verse una aceleración de la reacción.

Ejemplo 4. Caracterización nutricional de los co-productos del etanol obtenidos empleando como materia prima trigo, maíz y mezclas de trigo y microalgas y maíz y microalgas.

45 Los co-productos de la sacarificación y fermentación simultánea de cereal y biomasa de *Nannochloropsis gaditana* en proporción 10:1 se analizaron nutricionalmente. Como puede verse en la figura 6, los porcentajes de proteína bruta, en base a la masa seca, aumentan del orden de un 3% como cabe esperar por la proporción empleada. Los aminogramas resultantes muestran que los co-productos del etanol obtenidos por la mezcla con *Nannochloropsis* mejoran además del contenido en proteína, el porcentaje de aminoácidos deficitarios en la mayoría de dietas basadas en cereal (ej. lisina, triptófano) y, por tanto, son valiosos para la formulación de piensos compuestos.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de un biocombustible y co-productos alimentarios a partir de biomasa vegetal fermentable, que comprende:
 - a. preparar un medio acuoso que comprenda dicha biomasa,
 - b. hidrolizar y fermentar, de manera simultánea o secuencial, la biomasa comprendida en el medio acuoso del paso (a), y
 - c. destilar los productos obtenidos en el paso (b) para obtener el biocombustible y co-productos alimentarios,
 caracterizado porque además comprende la adición, en cualquier paso previo o posterior a la etapa de fermentación, de un extracto de un cultivo de microalgas.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, donde la biomasa vegetal fermentable se selecciona de la lista que consiste en: biomasa rica en azúcares fermentables, biomasa amilácea o material lignocelulósico.
3. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde el extracto del cultivo de microalgas es líquido.
4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el extracto del cultivo de microalgas se añade al medio acuoso del paso (a).
5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende un paso de concentración de los co-productos alimentarios destilados en el paso (c) y donde el extracto del cultivo de microalgas se añade durante dicho paso de concentración o inmediatamente después del mismo.
6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende un paso de cultivo de microalgas del cual procede el extracto del cultivo de microalgas.
7. El procedimiento según la reivindicación 6, donde el cultivo de microalgas utiliza el CO₂, agua y otros nutrientes liberados en la etapa de fermentación del paso (b).
8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, donde el cultivo de microalgas utiliza como nutriente el nitrógeno liberado en la etapa de destilación del paso (c).
9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde el extracto del cultivo de microalgas se obtiene a partir del procesado del cultivo de microalgas, y donde dicho procesado se selecciona de la lista que comprende: concentración, homogeneización o secado.
10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde las microalgas se seleccionan de entre los géneros: *Botryococcus*, *Neochloris*, *Nannochloropsis*, *Phorphyridium*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Tetraselmis* o *Spirulina*.
11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la biomasa vegetal fermentable es pretratada mediante molienda antes del paso (a).
12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que además comprende:
 - d. centrifugar los co-productos alimentarios destilados en el paso (c),
 - e. evaporar el producto obtenido en la centrifugación del paso (d),
 - f. secar el producto obtenido en el paso (e), y
 - g. peletizar el producto obtenido en el paso (f).
13. Co-producto alimentario obtenible mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Producto alimentario que comprende el co-producto de la reivindicación 13.
15. Uso del co-producto de la reivindicación 13 para alimentación humana y/o animal.

FIG. 1

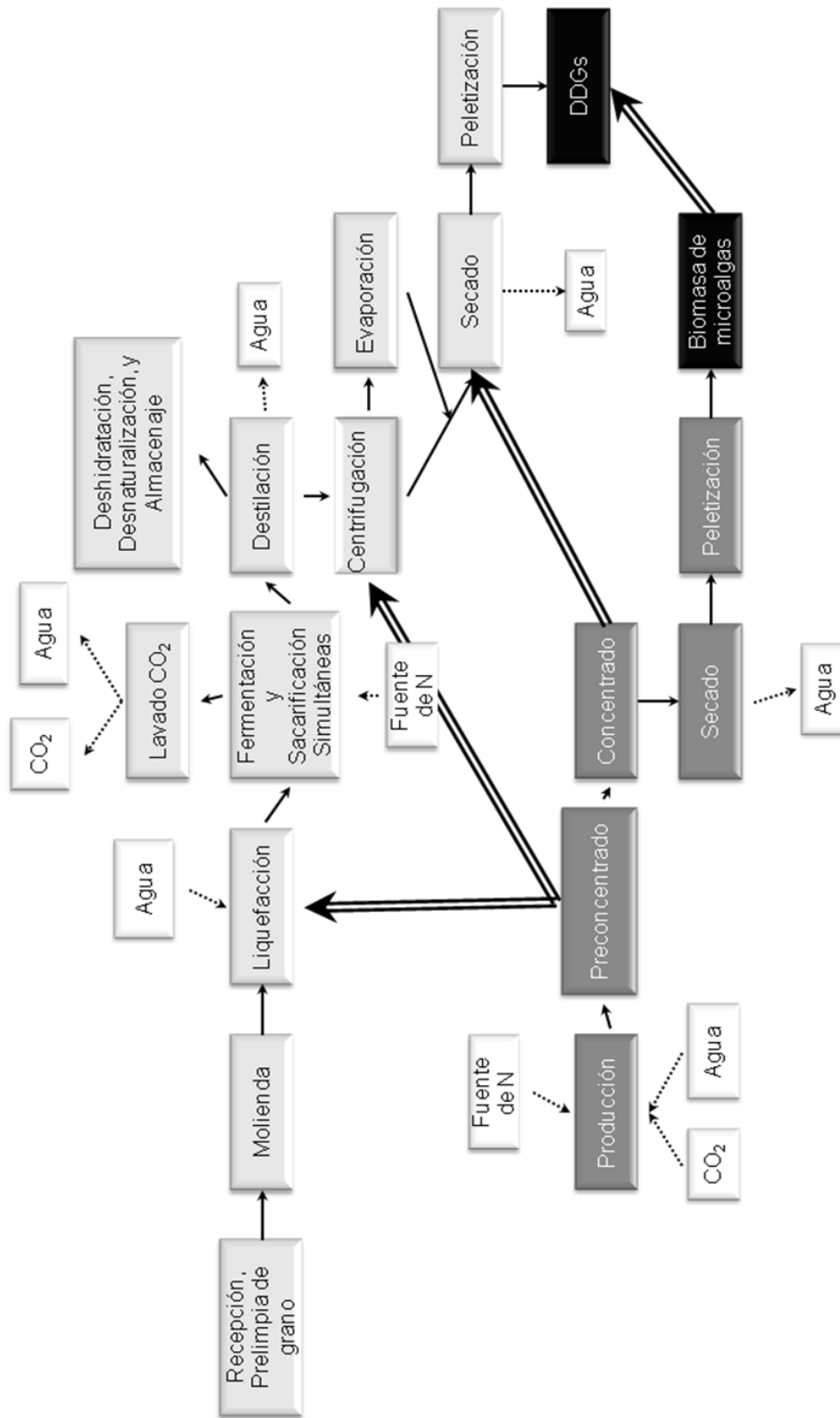


FIG. 2

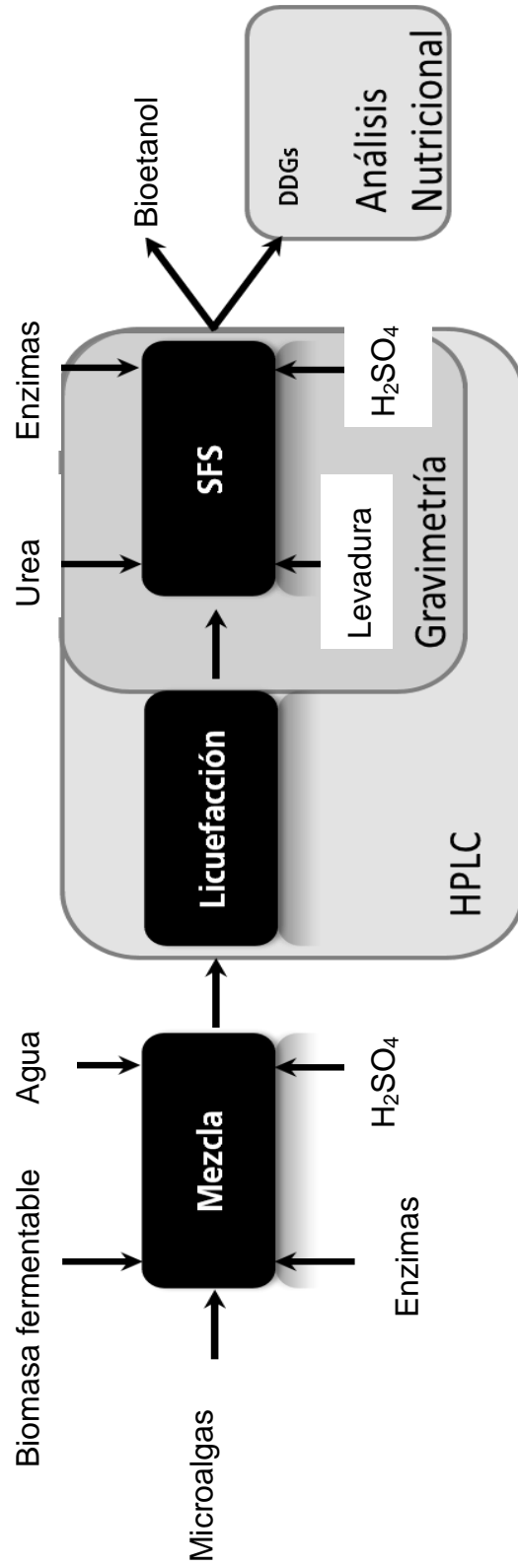


FIG. 3

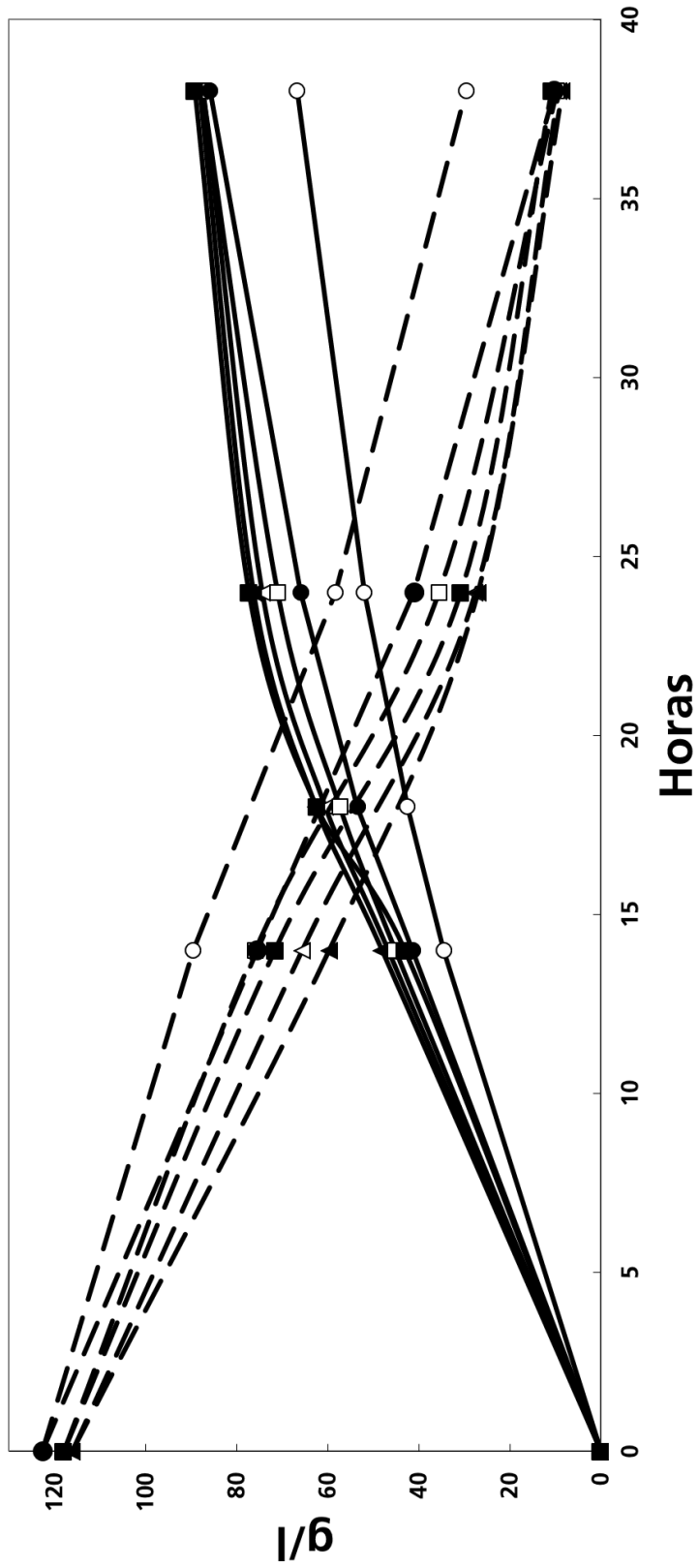


FIG. 4

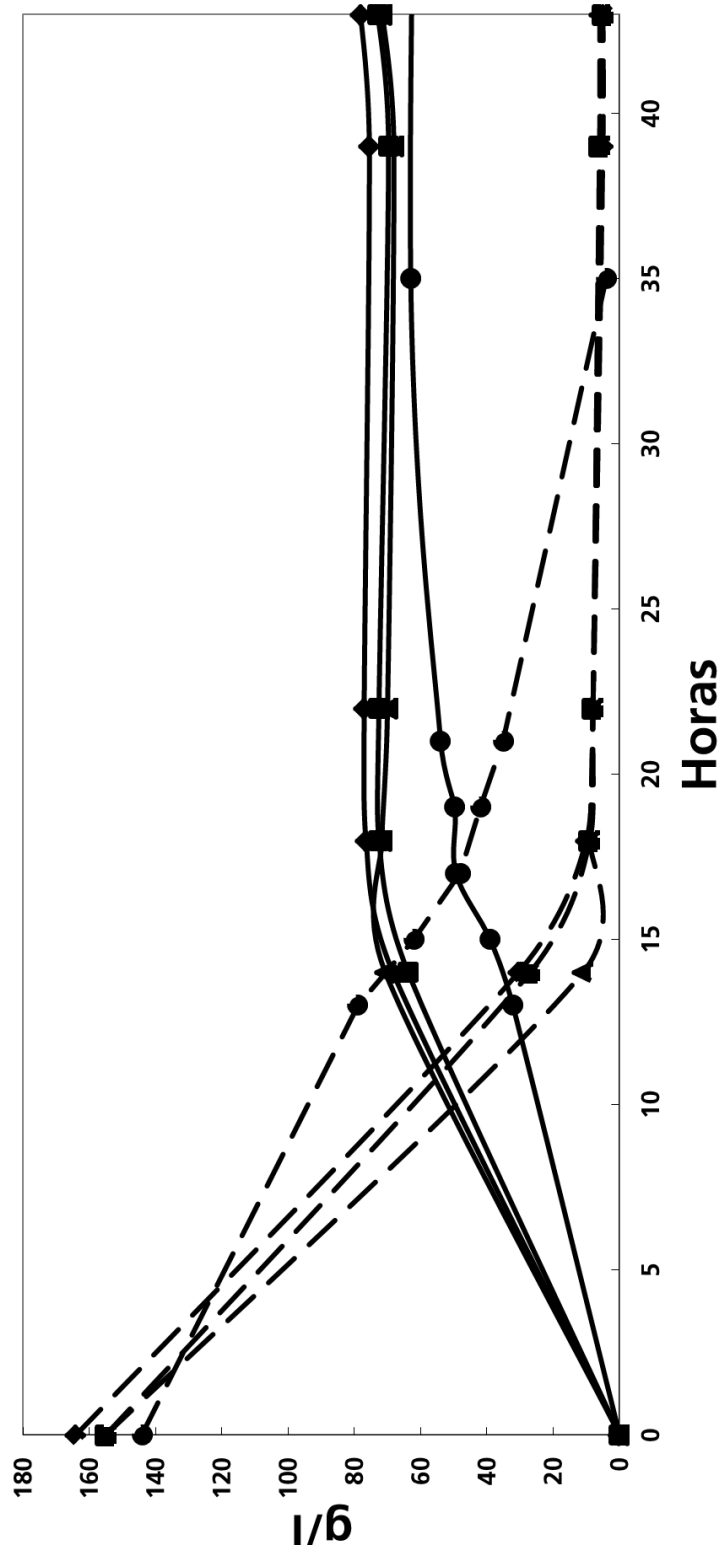


FIG. 5

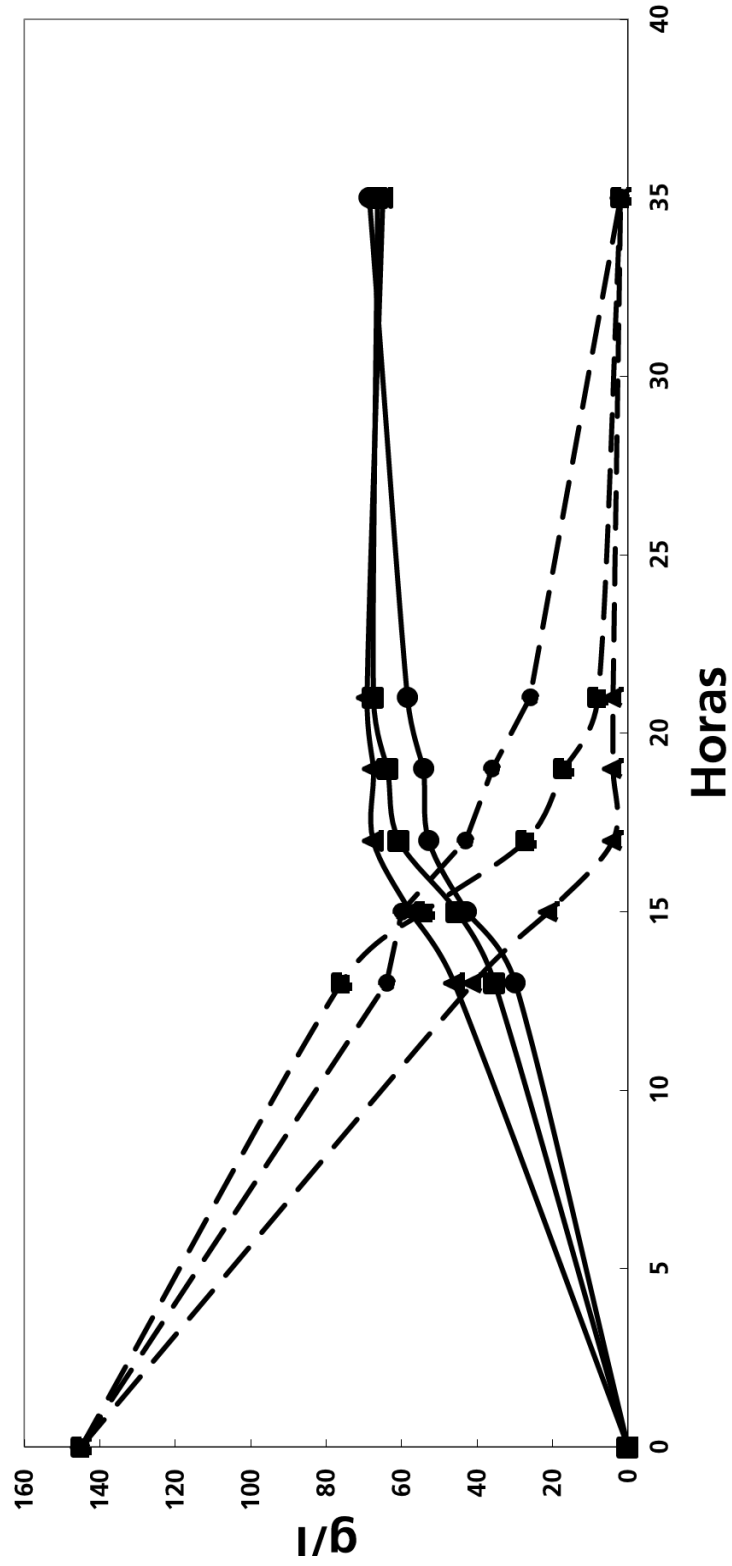


FIG. 6

A

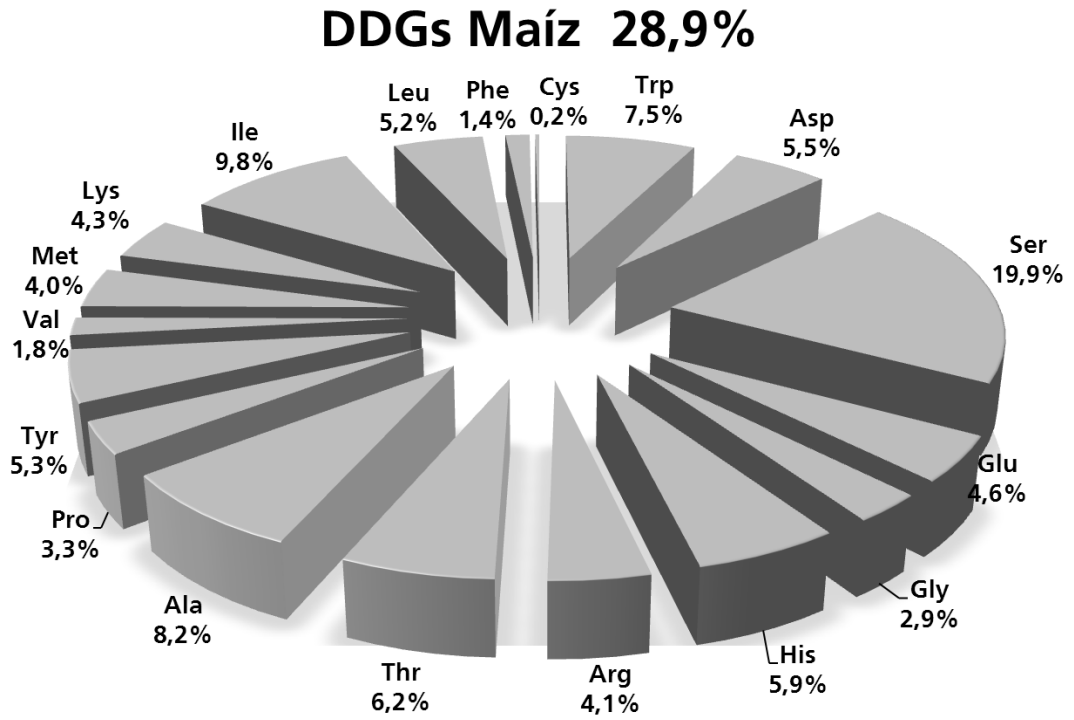


FIG. 6 (cont.)

B

DDGs Maíz-*Nannochloropsis* 33,1%

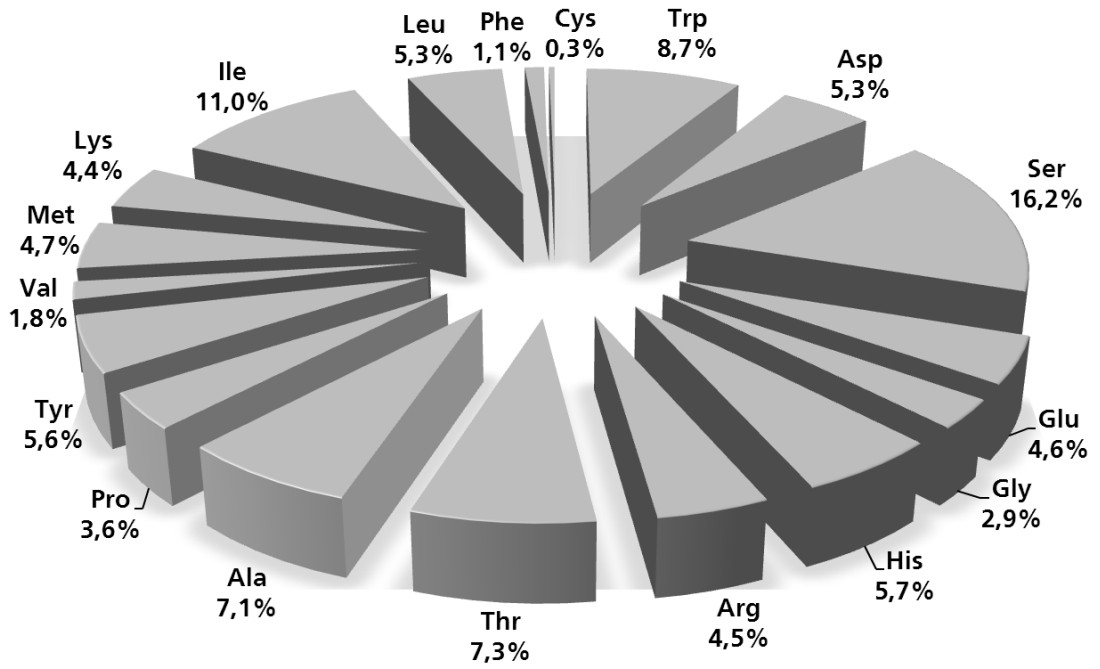


FIG. 6 (cont.)

C

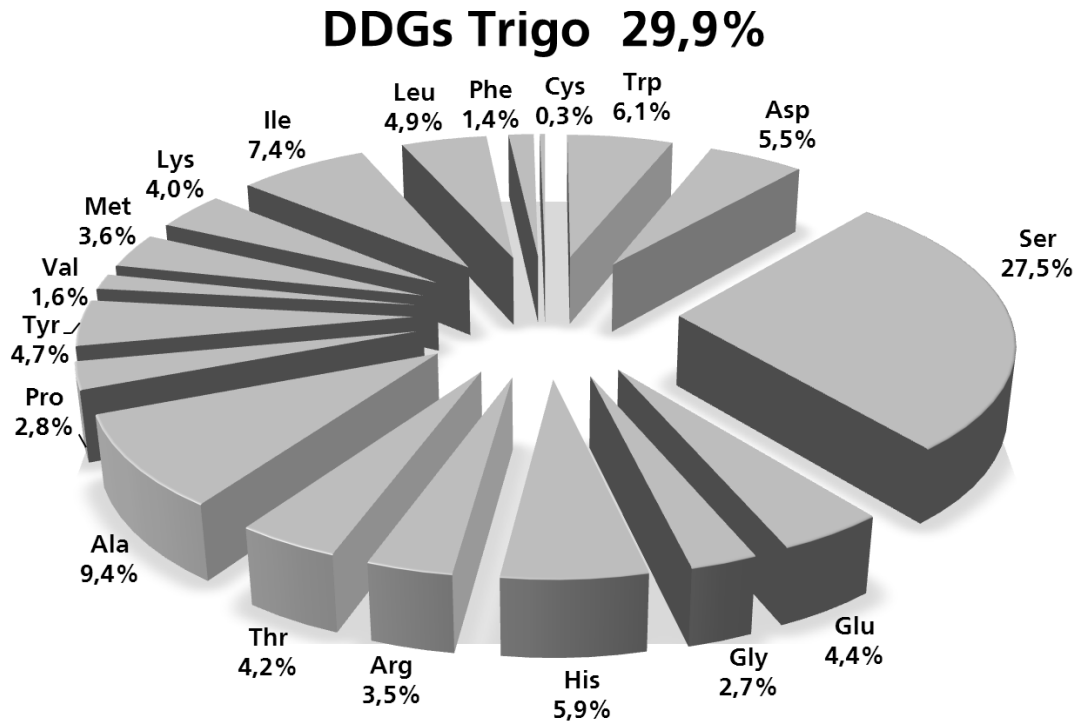
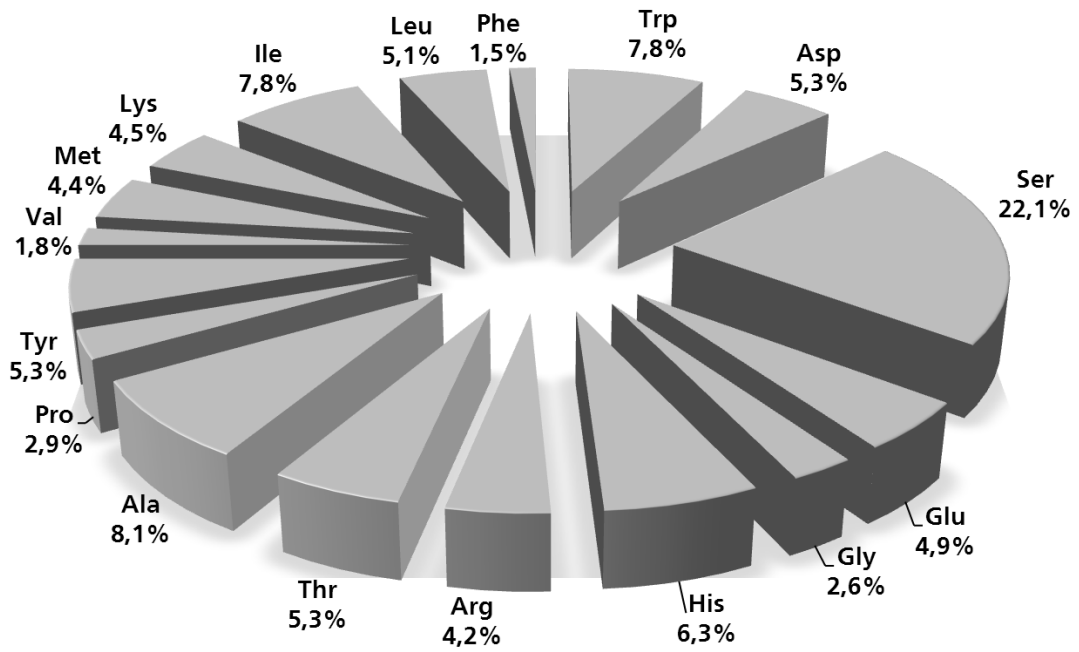


FIG. 6 (cont.)

D

DDGs Trigo-*Nannochloropsis* 32,8%





- ②① N.º solicitud: 201230880
②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.06.2012
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2007196892 A1 (WINSNESS DAVID J et al.) 23.08.2007, párrafos 10-19,29-31,40; figuras 1,2.	1-4,6,7,9-11,13-15
Y		12
Y	ROSENTRATER K. A. et al. Modeling the effects of pelleting on the logistics of distillers grains shipping. BIORESOURCE TECHNOLOGY, ELSEVIER BV, GB, 2009 vol: 100 (24), Págs: 6550-6558. ISSN 0960-8524 Doi: doi:10.1016/j.biortech.2009.07.051.	12
X	DREWERY M. L. y WICKERSHAM A. Cattle: a potential market for post-extraction algal residue. Biomassmagazine.com.09.03.2012.[en línea] Recuperado de Internet [recuperado el 12.07.2013] http://biomassmagazine.com/articles/7673/cattle-a-potential-market-for-post-extraction-algal-residue	1,5,13-15
A	WO 2006127512 A1 (CARGILL INC et al.) 30.11.2006, página 3, línea 23 – página 5, línea 19; figuras 2,3.	1-4,6,7,9,11
A	US 7662617 B2 (RUSH S. L.) 16.02.2010, figura 1; column 4, línea 9 – column 8, línea 63.	1-4,6,7,11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 12.07.2013</p>	<p>Examinador A. I. Polo Díez</p>	<p>Página 1/5</p>
---	--	------------------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12P7/06 (2006.01)

A23K1/06 (2006.01)

A23K1/14 (2006.01)

A23L1/337 (2006.01)

C12N1/12 (2006.01)

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

C12P, A23L, C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.07.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 5,8,9,12	SI
	Reivindicaciones 1-4, 6-7, 10-11, 13-15	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 8	SI
	Reivindicaciones 1-7, 9-15	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2007196892 A1 (WINSNESS DAVID J et al.)	23.08.2007
D02	DREWERY M.L y WICKERSHAM A.	09.03.2012
D03	ROSENTRATER K A et al.	2009
D04	WO 2006127512 A1 (CARGILL INC et al.)	30.11.2006
D05	US 7662617 B2 (RUSH STEPHEN L)	16.02.2010

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

La invención se refiere, según la primera reivindicación, a un procedimiento de producción de biocombustible a partir de biomasa vegetal que comprende:

- Preparar un medio acuoso con dicha biomasa vegetal
- Hidrolizar y fermentar la biomasa anterior.
- Destilar los productos obtenidos en b. para obtener un biocombustible y co-productos alimentarios.

que se caracteriza por la adición de un extracto de cultivo de microalgas antes o después de la fermentación de la biomasa.

Las reivindicaciones dependientes 2, 3, 10 y 11 mencionan el origen de la biomasa vegetal, que el extracto de las microalgas sea líquido, los géneros de microalgas adecuados para el procedimiento y la posibilidad de moler la biomasa vegetal antes de la etapa a.

La reivindicación 4 se refiere a una de las alternativas posibles en la que el extracto de microalgas se añade al medio acuoso en la etapa a.

La reivindicación 5 es otra alternativa en el que el extracto de algas se añade a los co-productos alimentarios obtenidos en la etapa c. después de una etapa de concentración de los mismos.

Las reivindicaciones 6 a 9 se refieren al cultivo de las microalgas para obtener el extracto utilizando el CO₂ obtenido en la fermentación y el nitrógeno obtenido en destilación.

La reivindicación 12 menciona las etapas que se llevan a cabo con los co-productos alimentarios obtenidos en la etapa c. hasta la peletización.

Por último, también es objeto de la invención el co-producto obtenido por el procedimiento y el producto alimentario que contiene este co-producto (reivindicaciones 13 y 14), así como el uso del co-producto para la alimentación humana o animal (reivindicación 15).

Novedad (art. 6 de la L.P.)

El documento D1 se refiere a un procedimiento para producir un biocombustible (etanol) a partir de una biomasa vegetal (el maíz). El maíz se muele, se hierve, se fermenta y luego se destila el etanol. El CO₂ que se desprende en este proceso se usa para el cultivo de algas en un biorreactor. A su vez, las algas producidas en el biorreactor se pueden fermentar junto con el maíz, es decir, se añaden antes de la fermentación del maíz y, por tanto, se refieren a la alternativa de la reivindicación 4 de la solicitud. Una vez obtenido el etanol, los co-productos obtenidos en este procedimiento se utilizan para obtener aceites o como alimento (párrafos 10 a 19, 29 a 31, 40; figuras 1 y 2)

El procedimiento descrito en este documento es el mismo que el de la reivindicación 1 de la solicitud. Además, dicho documento afecta también a la novedad de las reivindicaciones 2-4, 6, 7, 10, 11, 13- 15.

En el documento D2 se prueba a suplementar el alimento de los rumiantes con un extracto de un cultivo de algas. Una de los alimentos que se mezclan con las algas son los granos de destilería secos (DDG) que son co-productos obtenidos en el proceso de fermentación y destilación de biomasa vegetal para la obtención de etanol. Este documento contempla pues la alternativa que protege la reivindicación 5 de la solicitud, es decir, añadir un extracto de microalgas al co-producto obtenido en el procedimiento de producción de biocombustibles a partir de una biomasa vegetal.

Por ello, a la vista de este documento, las reivindicaciones 1, 5, 13-15 carecen de novedad.

Las reivindicaciones dependientes 8, 9 y 12 se refieren a características que no se encuentran divulgadas en el documento anterior por lo que se considera que cumplen el requisito de novedad.

Actividad inventiva (art. 8 de la L.P.)

La reivindicación 12 menciona unas etapas para transformar los co-productos obtenidos en la etapa c. de la reivindicación 1 en pellets. El documento D3, detalla estas mismas etapas para elaborar pellets con los co-productos alimentarios obtenidos en la producción de bioetanol. Aplicar estas mismas etapas en los co-productos obtenidos según cualquier el procedimiento en el que se obtenga etanol y co-productos sería obvio para un experto en la materia y, por tanto, la reivindicación 12 carece de actividad inventiva a la vista de los documentos D1 y D3.

En cuanto, a la reivindicación 9 también carece de actividad inventiva, ya que la concentración, homogenización o secado son etapas utilizadas con frecuencia para procesar las microalgas después de su cultivo (ver documento D4).

Por último, la reivindicación 8 cumple el requisito de novedad y de actividad inventiva ya que ningún documento de los citados en el informe del estado de la técnica divulga o sugiere la utilización del nitrógeno que se produce en la destilación del etanol para el cultivo de las microalgas.