

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 793**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/42** (2006.01)

**C12P 7/64** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

**D21C 5/00** (2006.01)

**D21H 11/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2010 E 10196494 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 2468857**

54 Título: **Sistema de procesos integrado para la producción de lípidos y reducción a pulpa**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.12.2014**

73 Titular/es:

**NESTE OIL OYJ (100.0%)  
Keilaranta 21  
02150 Espoo, FI**

72 Inventor/es:

**KOSKINEN, PERTTU y  
TANNER, REIJO**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 525 793 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

Sistema de procesos integrado para la producción de lípidos y reducción a pulpa

5 La presente invención se refiere a un sistema de procesos integrado, en el que uno de los procesos es un proceso de la industria de la pulpa o del papel y el otro proceso es un proceso de producción de aceite unicelular (proceso de producción de lípidos microbianos). La invención se refiere también a un proceso de producción de lípidos a partir de residuos industriales de pulpa y/o papel en el sistema integrado y al uso de los lípidos.

10 **Antecedentes**

15 La hemicelulosa representa una fracción relativamente alta en los materiales de madera, siendo normalmente del 20 al 40 % en peso del material de madera en función de la especie maderera. En los procesos de reducción química a pulpa, tales como los procesos de reducción a pulpa Kraft y pulpa disolvente, la madera se deslignifica. Además de la lignina, en el proceso de reducción química a pulpa, se separa la hemicelulosa en gran medida de la celulosa, y el producto de pulpa final solo contiene cantidades bajas o nulas de hemicelulosa dependiendo del proceso. Por lo tanto, aproximadamente la mitad de la madera se disuelve en los procesos químicos de reducción a pulpa. En los procesos de reducción a pulpa, tales como la reducción a pulpa Kraft o pulpa al sulfito (pulpa disolvente), la fracción de hemicelulosa que se separa de la pulpa principalmente se somete a combustión y no se valoriza.

20 En el proceso principal de reducción a pulpa, la reducción a pulpa Kraft (reducción a pulpa al sulfato y cocción), la lignina de la madera y, en parte, la hemicelulosa se disuelven en condiciones severas en un digestor (cocción). Los productos de degradación de la hemicelulosa en el licor resultante (licor negro) son bastante complejos, y su separación y purificación del licor son difíciles, siendo poco idóneos para los procesos microbianos. Por esa razón, el licor negro se quema en la caldera de recuperación para producir electricidad y energía térmica. Sin embargo, la hemicelulosa tiene un valor calórico significativamente más bajo que la lignina, y la combustión de las hemicelulosas disueltas no constituye un uso económico óptimo de este recurso. Por lo tanto, preferentemente, se debería extraer la hemicelulosa, antes de la cocción, para generar productos de mayor valor. Una opción para valorizar la hemicelulosa es convertirla en productos químicos y/o biocombustibles (por ejemplo, etanol, butanol) mediante procesos microbiológicos. Sin embargo, esta extracción previa de la hemicelulosa antes de la reducción a pulpa no debería reducir el rendimiento ni la calidad de la pulpa.

35 La pulpa disolvente (también denominada celulosa disolvente) es una pulpa de madera blanqueada que tiene un alto contenido de celulosa (> 90 %). La pulpa disolvente es una pulpa de calidad química usada como materia prima para una amplia variedad de derivados de celulosa, por ejemplo, rayón (textiles), celofán, acetato de celulosa y metilcelulosa. La pulpa disolvente se fabrica mediante el proceso al sulfito o el proceso Kraft con una etapa de extracción de las hemicelulosas previa al proceso de reducción a pulpa. La hemicelulosa es un subproducto que se está desperdiciando en gran medida en las fábricas de hoy en día, pues se suele quemar en las calderas, perdiéndose la mayor parte de la energía en forma de calor residual.

40 Se pueden aplicar varios métodos diferentes de extracción previa de la hemicelulosa antes de la reducción a pulpa Kraft, tales como la extracción en agua caliente a presión (tratamiento hidrotérmico) y diversos métodos organosolventes usando alcoholes (por ejemplo etanol, metanol) y/o ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido fórmico, ácido málico, ácido láctico o ácido peracético) posiblemente complementados con un catalizador ácido tal como SO<sub>2</sub>. Los métodos pueden facilitar principalmente la eliminación de la hemicelulosa o tanto de la lignina como de la hemicelulosa de la fracción de pulpa. En la mayoría de estos métodos de extracción previa, la hemicelulosa se obtiene, al menos parcialmente, en forma oligomérica. Los oligómeros necesitan ser hidrolizados en monómeros antes de poder ser convertidos en los productos finales por microorganismos. La conversión de los oligómeros de azúcar de la hemicelulosa en monómeros de azúcar puede ser realizada por enzimas específicas tales como xilanasas, arabinasas, galactosidasas y/o mananasas, dependiendo del tipo de hemicelulosa (dependiendo de la especie maderera). Dichas enzimas son producidas por ciertos microorganismos, normalmente, por hongos o bacterias.

55 En la técnica anterior, se ha sugerido un concepto de biorrefinería que incluye la extracción previa de la hemicelulosa antes del proceso de reducción a pulpa y la utilización de la fracción de hemicelulosa en la producción de etanol o productos químicos. En Huang *et al.* (2008), se presenta una revisión de los métodos de extracción previa de la hemicelulosa, y en Marinova *et al.* (2009), una visión general de la biorrefinería de la pulpa Kraft que incluye la extracción previa de la hemicelulosa. La publicación de patente US20090165968 describe un método para extraer previamente la hemicelulosa antes del proceso de reducción a pulpa Kraft, lo que aumenta la susceptibilidad de la hemicelulosa a las fermentaciones biológicas para la obtención de etanol y productos químicos. En Mendes *et al.* (2010), se describe la producción de etanol a partir de la hemicelulosa previamente extraída de un proceso de reducción a pulpa Kraft de eucalipto.

65 Aunque en la técnica anterior se han descrito varios métodos mediante los cuales se puede extraer material de madera y, en particular, hemicelulosa para los procesos de la industria de la pulpa, todavía existe la necesidad de nuevos procesos que faciliten el fraccionamiento y la posterior valorización del material de madera, en particular, de

la hemicelulosa, para los procesos de la industria de la pulpa.

La degradación y la utilización del material lignocelulósico también son importantes en otros campos de la industria además de en los procesos de la industria de la pulpa. Los aceites unicelulares se han usado tradicionalmente como productos especiales, por ejemplo, en alimentos sanos. También se ha descrito un tipo similar de proceso de producción para la generación de lípidos destinados a la producción de biodiesel. Sin embargo, dado que el producto es una sustancia química básica de bajo coste, los costes del proceso no deberían estar en el nivel de los costes de proceso de los productos especiales. Además, la producción de lípidos por parte de los microorganismos heterótrofos normalmente es muy baja, inferior al 20 % por ciento en peso del azúcar suministrado, y en el mejor de los casos, se puede transformar del 22 al 24 % de los azúcares disponibles en aceite. Por estas razones, para la producción de aceite, es necesaria la utilización de materias primas de bajo coste, tales como materia prima lignocelulósica.

En general, los procesos de producción de aceites unicelulares con el uso de microorganismos comprenden el cultivo de microorganismos en biorreactores aireados, permitiendo que las células acumulen lípidos, la cosecha de las células ricas en lípidos y la obtención de aceite de las células.

La utilización de materia prima celulósica para la producción de aceite se ha sugerido en algunas publicaciones recientes de patente. El documento US 2009/0064567 A1 desvela la producción de aceites biológicos por fermentación heterotrófica mediante el cultivo de microorganismos del reino *Stramenopile* usando materia prima que contiene celulosa como principal fuente de carbono. La celulosa es hidrolizada por enzimas o por otros microorganismos capaces de sacarificar la celulosa. El documento US2009/0011480 A1 desvela la producción de aceites biológicos a partir de material celulósico despolimerizado por microalgas y hongos.

La publicación de patente US2009/217569 desvela la producción de aceite unicelular a partir de diversos hidrolizados lignocelulósicos e hidrolizados de otros materiales, incluyendo la madera y los residuos de la industria de la pulpa y del papel para la fabricación de biocombustibles. El método comprende tratar el material original con agua, ácido o base y poner en contacto el filtrado o el precipitado con microorganismos productores de lípidos. La técnica anterior también describe la producción de lípidos directamente de azúcares poliméricos de lignocelulosa, tal como xilano según Fall *et al.* (1984), o celulosa según Hui *et al.* (2010) por organismos capaces de producir celulasas o hemicelulasas.

Peng Xiao-Wei *et al.* (2007) desvelan un proceso de producción de aceite microbiano y enzimas celulasas por hongos endofíticos utilizando paja de trigo sometida a explosión de vapor como fuente de carbono.

Bhat (2000) desvela el uso de celulasas y hemicelulasas en aplicaciones biotecnológicas relacionadas con la pulpa y el papel, tales como la reducción biomecánica a pulpa y el bioblanqueamiento de pulpas Kraft.

Por lo general, la hidrólisis enzimática es realizada en una etapa separada del proceso de producción de biocombustibles por enzimas comerciales. Normalmente, las enzimas comerciales se adquieren y producen fuera del propio proceso de producción de biocombustibles. El precio de las enzimas es el principal factor de coste en la conversión de los materiales celulósicos en biocombustibles mediante procesos microbiológicos.

## Sumario

Es un objetivo de la presente invención proporcionar una solución a los problemas encontrados en la técnica anterior. En concreto, la presente invención tiene por objetivo proporcionar una solución técnicamente beneficiosa a los problemas encontrados en los procesos de la industria de la pulpa y/o del papel.

Es otro objetivo proporcionar una solución técnicamente beneficiosa a los problemas encontrados en la producción a gran escala de aceite unicelular.

Es otro objetivo más de la presente invención proporcionar una solución que permita mejorar la economía de la producción de aceite unicelular a gran escala.

Es otro objetivo más de la presente invención proporcionar una solución que permita la reducción de la carga ambiental.

La presente invención tiene por objetivo, en particular, resolver los problemas relacionados con la fabricación de biocombustible para el transporte.

Para conseguir estos objetivos, la invención tiene las características que se enumeran en las reivindicaciones independientes. El resto de reivindicaciones representa las realizaciones preferidas de la invención.

El método de acuerdo con la invención se basa en el hallazgo de que las corrientes secundarias de los procesos de la industria de la pulpa y del papel comprenden una cantidad significativa de nutrientes que puede servir como

fuelle de carbono para los microorganismos, en particular, para los microorganismos productores de lípidos.

Se ha encontrado ahora que el proceso de producción de lípidos genera una cantidad significativa de proteínas, en particular, de enzimas. Más concretamente, en relación con un proceso de producción de aceite unicelular, se puede producir una cantidad significativa de enzimas capaces de degradar el material de madera o materia orgánica de la industria de la pulpa y/o del papel. En la presente invención, se ha encontrado que las enzimas producidas en el proceso de producción de lípidos se pueden volver a utilizar en los procesos de la industria de la pulpa y/o del papel, tales como en los procesos de la industria de la pulpa, por ejemplo, en el blanqueamiento de la pulpa, el destintado de la pulpa, el tratamiento de la lignocelulosa antes de la reducción química a pulpa, la fabricación de pulpa disolvente, el descortezado o los procesos de modificación de las fibras.

En un aspecto, se proporciona un sistema integrado que comprende un primer proceso, que es un proceso de producción de aceite unicelular, y un segundo proceso, que es un proceso de la industria de la pulpa y/o del papel. En el sistema, la materia orgánica procedente de la industria de la pulpa y/o del papel se introduce en el proceso de producción de lípidos, y en el proceso de producción de lípidos, se usa un microorganismo capaz de producir lípidos, o lípidos y enzimas, cuando se cultiva en un medio que comprende materia orgánica procedente de la industria de la pulpa y/o del papel. En una realización, los lípidos o los lípidos y las enzimas son producidos por dichos microorganismos en el proceso de producción de aceite unicelular. En otra realización, las enzimas se producen en un proceso conectado al proceso de producción de aceite unicelular.

Por lo general, el sobrenadante y las células de microorganismos se separan del cultivo de microorganismos, y se recuperan lípidos de las células de los microorganismos. En diversas realizaciones, el sobrenadante o una fracción enriquecida en proteínas del sobrenadante o una dilución del sobrenadante que comprende enzimas catalíticamente activas se recuperan del proceso de producción de lípidos o de un proceso conectado al mismo. En una realización, el sobrenadante o una fracción enriquecida en proteínas del sobrenadante que comprende enzimas del proceso de producción de lípidos se introducen en el proceso de la industria de la pulpa y/o del papel.

En una realización, las enzimas se producen en un proceso separado del proceso de producción de lípidos o por otro microorganismo distinto del microorganismo productor de lípidos.

En una realización preferida, las enzimas y los lípidos son producidos por el mismo microorganismo.

En una realización preferida, el proceso microbiológico de producción de lípidos utiliza fracciones o residuos de la industria de la pulpa y/o del papel, tales como hemicelulosa o lodos primarios tales como los procedentes de los procesos de destintado de la pulpa, y produce sustancias útiles, tales como enzimas, para su uso en los procesos de la industria de la pulpa y/o del papel. Simultáneamente, el proceso microbiológico produce cantidades considerables de lípidos que se pueden usar para diversos fines, por ejemplo, para la producción de biocombustibles. El sistema de procesos integrado proporciona una forma de utilización más completa y de valorización de la biomasa lignocelulósica en los procesos de la industria de la pulpa y/o del papel.

La industria de la pulpa y/o del papel puede producir una mayor variedad de subproductos valiosos mediante la valorización de las corrientes secundarias que los procesos de la técnica anterior, permitiendo ventajas competitivas.

En resumen, cabe concluir que la invención ofrece ventajas en tanto en cuanto:

- la invención descrita en el presente documento puede mejorar la rentabilidad de los procesos de la industria de la pulpa y/o del papel.
- la valorización de la corriente de hemicelulosa mediante la producción de biocombustibles para el transporte genera beneficios económicos. En las fábricas de pulpa Kraft de la técnica anterior, la hemicelulosa termina en el licor negro y es sometida a combustión.
- la conversión de los residuos que contienen celulosa de la industria de la pulpa y/o del papel, tales como los lodos primarios del destintado, descortezado, proceso de reducción química a pulpa, proceso de reducción mecánica a pulpa o proceso de fabricación de papel. La generación de productos de valor, tales como lípidos mediante microorganismos, aporta un valor añadido al actual proceso de tratamiento de aguas residuales aeróbico y/o anaeróbico.
- la producción de las enzimas necesarias en los procesos de la industria de la pulpa y/o del papel *in situ* genera un ahorro de costes. También reduce la necesidad de la estabilización de las enzimas antes de su uso.
- el bioproceso consolidado para la producción de lípidos (digestión enzimática y fermentación en la misma etapa del proceso) reduce el coste y mejora la eficacia en comparación con los procesos que ofrecen una etapa específica para la producción de hemicelulosa y/o de producción de lípidos. Se reducen costes al eliminar o reducir la necesidad de adquirir enzimas del exterior.

- los procesos químicos de reducción a pulpa producen grandes cantidades de excedentes energéticos, sobre todo en forma de calor. La utilización del exceso de calor procedente del proceso de reducción a pulpa mejora la eficacia energética. Por ejemplo, el calor del proceso de reducción a pulpa (combustión de la lignina) para concentrar azúcares en hidrolizado de hemicelulosa (jarabe), para purificar el hidrolizado, o en la recuperación de disolventes en la recuperación de aceite del proceso de producción de lípidos.
- el coste energético del tratamiento de los materiales lignocelulósicos o materiales que comprenden otra biomasa de carbohidratos poliméricos se reduce mediante el uso de enzimas del propio proceso de producción de aceite unicelular en lugar de o además de las enzimas comerciales, y los tratamientos termomecánicos y químicos.
- la eliminación de proteínas enzimáticas del resto de los licores de la fermentación de la producción de aceite unicelular reduce la carga de consumo de oxígeno biológico del licor de fermentación liberado de la producción de aceite unicelular.
- el balance de carbono del proceso de producción de aceite unicelular se mejora cuando las proteínas enzimáticas, en lugar de causar carga biológica en las corrientes del proceso, se reducen o eliminan de las aguas residuales de la fermentación, se reutilizan con fines catalíticos o se usan como un nutriente en el proceso de producción de aceite unicelular u otros procesos biotecnológicos.

## 20 Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1 y 2 muestran esquemas de proceso.

La Figura 3 muestra la xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

La Figura 4 muestra la xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

La Figura 5 muestra la xilosa y la xilobiosa liberadas en el ensayo de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

La Figura 6 muestra la xilosa y la xilobiosa liberadas en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

La Figura 7 muestra el azúcar liberado (xilosa y glucosa) como el % del sustrato (500 mg de celulosa nativa o biomasa residual de cultivo) durante el ensayo de hidrólisis con 1 ml de solución de xilanasa comercial.

La Figura 8 muestra la xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

La Figura 9 muestra la xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

La Figura 10 muestra la glucosa liberada en los ensayos de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usó 1 g de celulosa. Parte de la xilosa se liberó de la hemicelulosa procedente del caldo de cultivo usado.

La Figura 11 muestra la glucosa liberada en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usó 1 g de celulosa. Parte de la xilosa se liberó de la hemicelulosa procedente del caldo de cultivo usado.

## Descripción detallada

En el presente documento, "un proceso de producción de aceite unicelular" se refiere a un proceso que comprende las etapas de formar o permitir la formación de un microorganismo sintetizador de lípidos y permitir que la masa del organismo así obtenida produzca y/o almacene (acumule) lípidos, recuperar las células de la fase líquida, y extraer o recuperar los lípidos de las células y/o del medio de cultivo o líquido. Como se describe más adelante en el presente documento, en los diversos grupos de microorganismos, tales como entre bacterias, arqueobacterias, hongos (hongos filamentosos), levaduras y algas, hay microorganismos productores de aceite unicelular.

Como se describe en el presente documento, la presente invención usa microorganismos capaces de producir tanto lípidos como enzimas. "Un microorganismo" se refiere, en algunas realizaciones de la invención, a dos o más microorganismos. En algunas realizaciones, las enzimas son producidas por un microorganismo y el aceite unicelular (lípidos) por otro microorganismo.

- La expresión "aceite unicelular" se refiere a una sustancia grasa, cuya molécula generalmente contiene, como una parte de la misma, una cadena de hidrocarburo alifático que se disuelve en disolventes orgánicos no polares, pero que es poco hidrosoluble. Los aceites unicelulares son un grupo esencial de grandes moléculas de las células vivas. Los aceites unicelulares son, por ejemplo, lípidos, grasas, ceras, ésteres de ceras, esteroides, terpenos, isoprenoides, carotenoides, polihidroxicanoatos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, alcoholes grasos, aldehídos grasos, ésteres de ácidos grasos, fosfolípidos, glucolípidos, esfingolípidos y acilglicerol, tales como triacilglicerol, diacilglicerol o monoacilglicerol.
- Los aceites unicelulares preferidos son los lípidos, las grasas, las ceras, los acilglicerol, y los ácidos grasos y sus derivados, en particular, los triglicéridos y los ésteres de cera.
- En relación con la presente invención, "lípidos" se usa como sinónimo de aceite unicelular, y "proceso de producción de lípidos", como sinónimo de proceso de producción de aceite unicelular.
- En el presente documento, "proceso de la industria de la pulpa" se refiere a un proceso destinado a la producción de pulpa a partir de materiales lignocelulósicos o fibras recicladas, así como materiales de fibra necesarios para la producción de pulpa.
- En el presente documento, "industria de la pulpa y/o del papel" se refiere a la rama de la industria que produce diversos tipos de papel, cartón, papel, papel de periódico, papel higiénico y artículos de cartón, pulpa, y paneles de aislamiento y tableros duros. La industria de la pulpa y/o del papel usa materiales lignocelulósicos o fibras recicladas como materias primas. La industria de la pulpa y/o del papel incluye procesos tales como la reducción química a pulpa, la reducción mecánica a pulpa, la reducción semiquímica a pulpa, la reducción quimiotermomecánica a pulpa, procesos de reciclaje de fibras y la fabricación de papel.
- "Reducción química a pulpa" se refiere a un proceso donde el material lignocelulósico tal como madera o virutas de madera se trata con productos químicos y calor, lo que resulta en la eliminación de la mayor parte de la lignina y, de ese modo, en la liberación de fibras sin dañar seriamente las fibras de celulosa. Por lo general, la mayoría de la lignina y la hemicelulosa se vuelve hidrosoluble en la reducción química a pulpa, retirándose así de las fibras de pulpa. Aproximadamente la mitad del material de madera se disuelve en la reducción química a pulpa. Los principales métodos de reducción química a pulpa son la reducción a pulpa Kraft y el proceso de producción de pulpa disolvente (proceso al sulfito). La cocción en soda es una modificación de un proceso de cocción de Kraft, en el que no se usa sulfito de sodio.
- "Proceso de producción de pulpa Kraft" o "reducción a pulpa Kraft" o "cocción de Kraft" se refieren a un proceso de reducción química a pulpa en el que el material lignocelulósico se trata con una mezcla de hidróxido de sodio y sulfuro de sodio que rompe los enlaces que unen la lignina a la celulosa. La cocción en soda es una modificación del proceso de cocción de Kraft, en el que no se usa sulfito de sodio. Se pueden usar disolventes orgánicos tales como etanol, metanol y ácido peracético como producto químico de refuerzo en el proceso de producción de pulpa Kraft.
- "Proceso de producción de pulpa disolvente" o "proceso al sulfito" se refiere a un proceso de reducción química a pulpa en el que el ácido sulfuroso ( $H_2SO_3$ ) y los iones bisulfito actúan en la degradación y la disolución de la lignina. La reducción a pulpa al sulfito ácido se realiza a un pH bajo, de 1 a 2, mientras que la reducción a pulpa al sulfito neutro se realiza a valores de pH 7 a 9. Se pueden usar disolventes orgánicos, tales como etanol, metanol y ácido peracético como un producto químico de refuerzo en el proceso de producción de pulpa disolvente.
- "Proceso organosolv" se refiere a un proceso de reducción química a pulpa en el que se usan productos químicos orgánicos para lograr la eliminación de la lignina y la liberación de las fibras. Los productos químicos orgánicos típicos usados en el proceso organosolv incluyen, pero sin limitación, metanol, etanol, ácido fórmico, ácido acético, ácido peracético, acetato de etilo y acetona. La eliminación de la lignina en el proceso organosolv se puede reforzar por la adición de catalizador ácido tal como ácido sulfúrico o dióxido de azufre ( $SO_2$ ).
- "Reducción mecánica a pulpa" se refiere a un proceso en el que las fibras del material lignocelulósico tal como madera o virutas de madera se liberan mecánicamente tal como mediante molienda. Los principales tipos de pulpas mecánicas incluyen pulpa mecánica de muela de piedra y la pulpa de refinador. La pulpa mecánica de muela de piedra se fabrica triturando los troncos y, si la madera se vaporiza antes de la molienda, se conoce como pulpa de madera triturada a presión. La pulpa de refinador se fabrica suministrando virutas de madera hacia el centro de los discos giratorios (refinado), si la pulpa se trata con vapor de agua antes del refinado, la pulpa se denomina pulpa termomecánica. En la fabricación de pulpa quimiotermomecánica, la madera se trata previamente con productos químicos tales como sulfito de sodio, y con vapor para refinar las virutas. En todos los casos, el rendimiento de la pulpa es alto, normalmente del 95 al 98 %, lo que significa que todos los componentes de madera quedan retenidos en la fibra con pérdidas solo menores de sustancias fácilmente hidrosolubles, lo que difiere de los procesos de reducción química a pulpa, donde el rendimiento de la pulpa es significativamente inferior.
- "Proceso de fibras recicladas" o "proceso de reciclaje de fibras" se refiere al proceso que usa los productos de pulpa usados tales como el papel, y los vuelve a convertir en nuevos productos de pulpa o de papel. El proceso permite el reciclaje y la reutilización de los productos de pulpa y de papel. El proceso de reciclaje de fibras consiste, en general,

en tres etapas: volver a reducir a pulpa el papel, eliminar los contaminantes tales como la tinta (destintado) y blanquear las fibras.

5 De acuerdo con una realización preferida, la hidrólisis y la producción de biocombustibles se llevan a cabo utilizando microorganismos que son capaces tanto de producir enzimas capaces de hidrolizar los azúcares oligoméricos como de producir biocombustibles. Normalmente, esto se lleva a cabo en una sola etapa.

10 De acuerdo con una realización preferida, al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, preferentemente al menos un 50 %, más preferentemente al menos un 60 %, más preferentemente al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 80 %, todavía más preferentemente al menos un 90 % de determinadas enzimas, que se usan en el proceso de la industria de la pulpa y/o del papel, es producido por un microorganismo también productor de lípidos. En el proceso de la industria de la pulpa y/o del papel, se pueden usar varias enzimas de las cuales, normalmente, algunas enzimas o grupos de enzimas se producen en el proceso de producción de aceite unicelular integrado o en un proceso conectado al mismo, y algunas enzimas o  
15 grupos de enzimas se obtienen de otras fuentes, por ejemplo, enzimas comerciales.

En el presente documento, la expresión "un microorganismo productor de lípidos" significa uno o más microorganismos productores de lípidos, preferentemente un microorganismo productor de lípidos.

20 De acuerdo con otra realización, las enzimas son producidas por uno o más microorganismos distintos del microorganismo productor de lípidos en el mismo proceso de producción de lípidos o en un proceso conectado al mismo. El/los microorganismo/s puede/n ser (a) microorganismo/s productor/es de enzimas específicas de manera eficaz, tales como enzimas hidrolíticas, por ejemplo, *Trichoderma* o *Bacillus*. "Un proceso conectado al proceso de producción de lípidos" significa, por ejemplo, un proceso donde se trata la materia prima para el proceso de  
25 producción de lípidos, por ejemplo, con enzimas.

De acuerdo con una realización adicional, las enzimas se producen en un proceso separado del proceso de producción de los lípidos. Las enzimas se producen, por ejemplo, en un proceso separado por parte de un microorganismo eficaz en la producción de enzimas específicas, tales como enzimas hidrolíticas. Como alternativa,  
30 las enzimas son enzimas comerciales.

De acuerdo con una realización adicional, la hidrólisis y la producción de biocombustibles se llevan a cabo de una manera similar utilizando microorganismos que son capaces de producir enzimas capaces de hidrolizar los azúcares oligoméricos y de producir biocombustibles, pero las enzimas producidas se usan por separado para hidrolizar la materia prima, tal como celulosa (o hemicelulosa). Los productos de la hidrólisis se usan después en la fermentación.  
35

De acuerdo con otra realización más, el proceso de producción de lípidos a base de microorganismos heterótrofos está integrado en un proceso de la industria de la pulpa y/o del papel. Los microorganismos heterótrofos usan residuos o fracciones de la industria de la pulpa y/o del papel como materias primas para la producción de lípidos.  
40

En una realización, la materia orgánica usada para la producción de lípidos comprende al menos un 30 %, preferentemente al menos un 50 %, preferentemente un 60 % de lignocelulosas, preferentemente al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 80 %, todavía más preferentemente al menos un 90 % de lignocelulosas, o materiales derivados de la lignocelulosa de la industria de la pulpa y/o del papel.  
45

En una realización, la materia orgánica de la industria de la pulpa y/o del papel usada en un proceso de producción de lípidos comprende al menos un 60 %, preferentemente al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 80 %, todavía más preferentemente al menos un 90 % de una fracción de lignocelulosa, o materiales derivados de la lignocelulosa tales como hemicelulosas o de celulosa.  
50

En una realización, la materia orgánica de la industria de la pulpa y/o del papel usada en un proceso de producción de lípidos comprende al menos un 5 %, al menos un 10 %; al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 %, preferentemente al menos un 50 %, preferentemente al menos un 60 %, preferentemente al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 80 %, todavía más preferentemente al menos un 90 % de azúcares poliméricos.  
55

El grado de polimerización y la cantidad de monosacáridos del producto hidrolizado de la deslignificación dependen en gran medida de la cocción de la lignocelulosa o del método de pretratamiento. Por lo general, la extracción en agua caliente a presión de los materiales lignocelulósicos genera una fracción de hemicelulosa que consiste principalmente en hemicelulosa oligomérica. Por otro lado, el proceso de producción de pulpa disolvente normalmente genera un producto hidrolizado, es decir, un licor de sulfito agotado, donde los azúcares de la hemicelulosa están principalmente en forma monomérica.  
60

En una realización, la materia orgánica de la industria de la pulpa y/o del papel, con al menos la eliminación parcial de la lignina, usada en un proceso de producción de lípidos comprende al menos un 20 %, al menos un 30 %, al  
65

menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, preferentemente al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 80 %, todavía más preferentemente al menos un 90 % de hemicelulosa o materiales derivados de la hemicelulosa.

5 En una realización, la materia orgánica de la industria de la pulpa y/o del papel, con al menos la eliminación parcial de la lignina, usada en un proceso de producción de lípidos comprende al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, preferentemente al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 80 %, todavía más preferentemente al menos un 90 % de celulosa.

10 Más concretamente, las fracciones adecuadas para la producción de lípidos microbianos incluyen materiales de hemicelulosa que se separan antes del proceso de reducción a pulpa en sí. Este proceso integrado se puede utilizar en diferentes tipos de procesos de reducción a pulpa incluyendo los procesos de producción de pulpa Kraft y de pulpa disolvente.

15 En una realización, la producción de la celulasa y/o hemicelulasa, la hidrólisis de la celulosa y/o la hemicelulosa y la fermentación se llevan a cabo en una sola etapa. Esto ofrece la posibilidad de reducir costes y aumentar la eficacia en comparación con los procesos específicos de producción de celulosa y/o hemicelulosa. Esto se traduce en un ahorro de los costes del capital, de sustrato y de otras materias primas, y de las herramientas asociadas con la producción de la celulosa y/o hemicelulosa. Además, ofrece la posibilidad de obtener mayores velocidades de hidrólisis y, por tanto, de reducir el volumen del reactor y la inversión de capital. El proceso de una sola etapa reduce significativamente los costes mediante la eliminación o al menos la disminución de la necesidad de enzima producida en un bioproceso independiente.

25 En otra realización más, los microorganismos heterótrofos usan lodo/s primario/s procedentes de la industria de la pulpa y/o del papel, tales como lodo/s primario/s procedente/s del destintado, del descortezado, de la reducción química a pulpa, de la reducción mecánica a pulpa o de la fabricación de papel. Los lodos primarios se pueden combinar con otras fracciones o residuos de la industria de la pulpa y/o del papel, tales como la hemicelulosa o la celulosa.

30 Los microorganismos usados en la producción de lípidos son preferentemente aquellos capaces de utilizar la hemicelulosa polimérica por poseer exoenzimas, tales como hemicelulasas capaces de degradar la hemicelulosa. Las hemicelulasas tales como las xilanasas, arabinasas, mananasas, galactosidasas se pueden recuperar del medio de cultivo agotado (usado) procedente del proceso de producción de lípidos y reutilizarlas en el proceso de reducción a pulpa, por ejemplo, para el blanqueamiento de la pulpa, el destintado de la pulpa, la fabricación de pulpa disolvente o la modificación de las fibras. Dichas enzimas pueden ser producidas, por ejemplo, por hongos o bacterias, hongos preferentemente pertenecientes al género *Aspergillus*, *A. oryzae*, *Humicola*, *Rhizopus* o *Trichoderma*, o bacterias, preferentemente *Streptomyces*.

40 En otra realización, los microorganismos productores de lípidos que se usan son capaces de utilizar los azúcares poliméricos de la hemicelulosa y la celulosa. Las hemicelulasas y/o las celulasas se pueden recuperar del medio de cultivo del proceso de producción de lípidos y reutilizarlas en el proceso de reducción a pulpa, por ejemplo, en la modificación de las fibras, el procesamiento de fibras recicladas o el destintado. Dichas enzimas pueden ser producidas, por ejemplo, por hongos o bacterias, preferentemente pertenecientes al género *Aspergillus*, tales como *A. terreus*, o bacterias pertenecientes a *Streptomyces*.

45 De acuerdo con una realización preferida, las enzimas generadas en la producción de lípidos de la industria de la pulpa y/o del papel, tales como las procedentes de las corrientes secundarias y de los residuos de las fábricas de pulpa y/o papel, tales como corriente o lodo primario de hemicelulosa, se recuperan del proceso microbiológico y se utilizan en la industria de la pulpa y/o del papel, tal como en una fábrica de pulpa y/o papel. Preferentemente, las enzimas hemicelulasas para una aplicación en el blanqueamiento previo de la pulpa o la eliminación del xilano residual del proceso de producción de pulpa disolvente poseen una actividad baja o nula de degradación de la celulosa, con el fin de no afectar ni degradar las fibras de celulosa de la pulpa. Dichas enzimas que pueden ser producidas, por ejemplo, por hongos preferentemente pertenecientes al género *Aspergillus*, tales como *A. oryzae*, también son oleaginosas y capaces de acumular lípidos procedentes de la hemicelulosa. Una aplicación de reutilización alternativa de las enzimas hemicelulasas consiste en reciclarlas de nuevo hacia el proceso de producción de lípidos.

60 Las enzimas también se pueden usar en la industria de la pulpa y/o del papel para reducir los costes de fabricación del papel o para mejorar el producto. Los principales usos de las enzimas incluyen el blanqueamiento de la pulpa, donde se usan enzimas de la hemicelulosa (por ejemplo, xilanasas y mananasas), y posiblemente lacasas, con el fin de facilitar la eliminación de la hemicelulosa y/o de la lignina. La utilización de enzimas en el blanqueamiento de la pulpa reduce el consumo de productos químicos de blanqueamiento, lo que se traduce en beneficios tanto económicos como medioambientales. Las enzimas usadas en el proceso de reducción a pulpa son enzimas comerciales producidas en fábricas de enzimas independientes. La producción de enzimas *in situ* puede ahorrar costes debido a la disminución de la necesidad del procesamiento de las enzimas, tal como la estabilización previa a su uso.



También existen muchas otras aplicaciones para las enzimas en la industria de la pulpa y/o del papel, tales como ayudar en el destintado, mejorar la reducción a pulpa Kraft, reducir la recogida de recipientes, facilitar el enriamiento, eliminar selectivamente componentes de las fibras, modificar las propiedades de las fibras, aumentar la flexibilidad de las fibras y unir covalentemente las cadenas laterales o los grupos funcionales, descortezar, limpiar las máquinas de papel, y eliminar la brea y el limo.

El blanqueamiento de la pulpa, es decir, la eliminación de la lignina de las pulpas químicas, se necesita por razones estéticas y para mejorar las propiedades del papel, porque la lignina residual que queda tras la reducción a pulpa al sulfito confiere un color marrón no deseado al papel. Los objetivos del tratamiento enzimático dependen de las condiciones reales de la fábrica y pueden estar relacionados con las exigencias medioambientales, la reducción de los costes químicos, o el mantenimiento o la mejora de la calidad del producto.

La aplicación más importante de las enzimas xilanasas se encuentra en el blanqueamiento previo de la pulpa Kraft, y las xilanasas han ganado importancia como alternativa a los productos químicos tóxicos que contienen cloro. El tratamiento de las pulpas químicas con xilanasas supone un ahorro en el consumo de productos químicos de blanqueamiento, una disminución de las cargas medioambientales y/o aumentos en la blancura final de la pulpa. El impulsor principal han sido las ventajas económicas y medioambientales que la enzima aporta a la planta de blanqueamiento. Las xilanasas también se pueden usar en la eliminación de haces de fibras, fibras que no se han separado en fibras individuales en la reducción a pulpa.

Las xilanasas se pueden usar en el procesamiento de las pulpas de celulosa para eliminar el xilano residual en el proceso de producción de pulpa disolvente. Las enzimas son capaces de degradar selectivamente la fracción de hemicelulosa sin afectar a la celulosa. Una vez que la hemicelulosa es eliminada por las hemicelulasas, la lignina puede ser más fácilmente retirada y degradada por enzimas tales como la lacasa. La principal enzima necesaria para mejorar la deslignificación de la pulpa Kraft es la endo- $\beta$ -xilanasas, pero se ha demostrado que el enriquecimiento de otras enzimas tales como la mananasa, lipasa y  $\alpha$ -galactosidasa mejora el efecto del tratamiento enzimático de la pulpa Kraft. La enzima xilanasas puede reducir la necesidad de productos químicos oxidantes hasta en un 20 %-40 %. (BEG *et al.*, 2001). El preparado de enzima resultante debe estar completamente exento de cualquier actividad celulosa. Además, se desean las xilanasas que sean activas y estables a alta temperatura y pH alcalino (Beg *et al.* 2001). Se prefieren las enzimas tolerantes a pH alcalinos, ya que pueden funcionar sin ajuste del pH en el blanqueamiento de la pulpa (Bajpai, 2004).

Los microorganismos preferidos para la producción de xilanasas, en particular, para el blanqueamiento de la pulpa son xilanasas fúngicas de las especies *Aspergillus* y *Trichoderma*, y xilanasas bacterianas de la especie *Bacillus*, especie *Streptomyces* y especie *Clostridium*. De estos géneros, especialmente *Aspergillus* y *Streptomyces* contienen especies oleaginosas, es decir, capaces de acumular cantidades considerables de lípidos (> 15 % de su peso seco celular) cuando se cultivan en condiciones adecuadas u óptimas.

Los microorganismos, cuando se cultivan en materias primas de la industria de la pulpa y/o del papel, son capaces de producir y acumular al menos un 3 % (p/p) de lípidos de su peso seco celular, preferentemente al menos un 5 %, más preferentemente al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %.

Las enzimas también se pueden usar en la modificación de las fibras de la pulpa, especialmente en el refinado de la pulpa del proceso de reducción mecánica a pulpa. La modificación enzimática de las fibras tiene por objeto reducir el consumo energético en la producción de pulpas termomecánicas y aumentar la batibilidad de las pulpas químicas o mejorar las propiedades de las fibras.

Las enzimas xilanasas y pectinasas se pueden usar para ayudar en el descortezado, pudiendo generar un consumo energético importante en el proceso de descortezado.

Se ha encontrado que la mezcla de enzimas xilanasas y celulasas a bajas concentraciones aumenta notablemente el grado de refinado de las fibras recicladas sin reducir sustancialmente el rendimiento.

Las pulpas disolventes se pueden usar para producir materiales celulósicos tales como acetatos, celofanes y rayones. Su fabricación se caracteriza por la derivatización y, por lo tanto, la solubilización de celulosa altamente purificada. La eliminación de la hemicelulosa de las pulpas requiere el uso de altas cargas cáusticas y condiciones apropiadas de reducción a pulpa tales como la reducción a pulpa al sulfito y la reducción a pulpa Kraft previamente tratada con ácido. El tratamiento con xilanasas en el proceso de producción de pulpa disolvente puede reducir la carga química requerida durante la extracción cáustica o facilitar la extracción de la hemicelulosa de las pulpas Kraft.

Las enzimas se pueden usar en el destintado de la pulpa para convertir las fibras secundarias en productos de alta calidad. Las enzimas utilizadas en el destintado pueden ser, por ejemplo, celulasas, hemicelulasas, lacasas, esterases, lipasas y pectinasas.

Las lipasas se pueden usar en la eliminación de la brea en la reducción a pulpa, que genera problemas de funcionamiento en las máquinas de papel. También se pueden usar enzimas específicas tales como las hidrolasas,

amilasas y proteasas para limpiar y reducir el limo de las máquinas de papel.

La hemicelulosa representa una fracción relativamente alta de los materiales de madera, siendo normalmente del 20 al 40 % en peso del material de madera dependiendo de la especie maderera. La hemicelulosa se separa de la celulosa en el proceso de reducción a pulpa, y el producto final de pulpa solo contiene cantidades pequeñas o nulas de hemicelulosa dependiendo del proceso. Para integrar el proceso de producción de lípidos en un proceso tradicional de reducción a pulpa Kraft, se requiere un proceso unitario de separación de hemicelulosa adicional previo al proceso de reducción a pulpa en sí. Dicho proceso unitario puede ser cualquier proceso que separe la hemicelulosa del material lignocelulósico tal como, pero sin limitación, la extracción en agua caliente a presión (tratamiento hidrotérmico), tratamientos ácidos o tratamientos organosolv.

En el caso del proceso de producción de pulpa disolvente, los procesos de la técnica anterior tales como el proceso de producción de pulpa disolvente o proceso de Kraft con extracción de hemicelulosa (tal como un tratamiento con ácido), los procesos generan una corriente de hemicelulosa y lignina que contiene azúcares fermentables, y el proceso de producción de lípidos se puede integrar más fácilmente en el proceso de reducción a pulpa.

El método de extracción o separación de la hemicelulosa de la lignocelulosa previo a la reducción a pulpa se puede realizar mediante cualquier método conocido. Preferentemente, la separación de la hemicelulosa se realiza con un método que produce, tras la posible purificación y concentración, productos hidrolizados que no presentan el crecimiento de microorganismos productores de lípidos. Preferentemente, el método proporciona una fracción de hemicelulosa que contiene al menos una parte de los azúcares en forma oligomérica. Una realización de la invención es el uso de la extracción en agua caliente a presión para extraer la hemicelulosa. Además de la hemicelulosa, la extracción en agua caliente a presión retira los minerales de los materiales lignocelulósicos que pueden ser preferibles en la fermentación y reducir la necesidad de añadir minerales al medio de cultivo.

En ciertas aplicaciones del pretratamiento, tales como en algunos tratamientos organosolv o en el licor de sulfito agotado, se pueden disolver cantidades significativas tanto de hemicelulosa como de lignina de la fracción de pulpa que permanece sólida. En estos casos, se prefiere la separación de los azúcares de la hemicelulosa y la lignina antes del proceso de producción de lípidos microbiológico aeróbico. La separación de la fracción de lignina de los azúcares de la hemicelulosa se puede realizar con cualquier método conocido. En los tratamientos organosolv, la eliminación de la lignina es potenciada por la acción directa de un disolvente orgánico (etanol, metanol, acetona, ácido acético, ácido fórmico, acetato de etilo, etc.) para disolver la lignina e hidrolizar la fracción de hemicelulosa. Un método general para separar la lignina de la hemicelulosa hidrolizada consiste en añadir agua que genere la precipitación de la lignina.

Puede ser necesario tratar la hemicelulosa hidrolizada con diferentes operaciones unitarias antes de suministrar los microorganismos. Puede ser necesaria la separación de la lignina de los residuos de lignina. Puede ser necesario concentrar los azúcares de la hemicelulosa hidrolizada, por ejemplo, por evaporación del agua. Además, puede ser necesario deshacerse de los compuestos orgánicos tales como los ácidos (ácidos orgánicos) liberados en el pretratamiento, o los disolventes tales como alcoholes o ácidos, u otros compuestos tales como SO<sub>2</sub>, usados en la hidrólisis. Se pueden usar métodos tales como, pero sin limitación, separación por corriente, evaporación o destilación. Dichos procesos de evaporación, destilación o separación pueden utilizar calor del proceso y corriente del proceso de reducción a pulpa (combustión de la lignina). La utilización del calor de proceso es ventajosa, ya que normalmente las fábricas de pulpa producen un exceso de calor que no se puede utilizar. Además, puede ser necesario concentrar los azúcares mediante filtración, o tecnologías o aplicación de membranas. Por ejemplo, los azúcares oligoméricos de la hemicelulosa se pueden concentrar por filtración a través de membrana. Puede ser necesario purificar adicionalmente la hemicelulosa hidrolizada antes de suministrar los microorganismos. Los métodos de acondicionamiento de los productos hidrolizados para eliminar los compuestos inhibidores pueden contener, pero sin limitación, precipitación, filtración, separación o adsorción, o tratamiento enzimático.

La invención descrita se puede aplicar a procesos de reducción a pulpa usando cualquier material o mezcla de los mismos, incluyendo, pero sin limitación, madera blanda (tal como de pino, abeto), madera dura (tal como de eucalipto, abedul, álamo, chopo, roble), bambú, paja de arroz, paja de cebada, paja de trigo, caña de maíz, racimos vacíos de palma aceitera y bagazo. Preferentemente, la fracción de hemicelulosa del material lignocelulósico se usa como materia prima para la producción de lípidos. Además de la utilización de la corriente de hemicelulosa, o cualquier fracción de la misma, como materia prima para la producción de lípidos, se pueden usar las corrientes que contienen celulosa, o cualquier fracción de la misma, y/u otros compuestos adecuados para la producción de lípidos. El proceso de producción de lípidos también puede utilizar otras corrientes de la industria de la pulpa y/o del papel, tales como los residuos de fibras o el lodo primario de la industria de la pulpa y/o del papel. Por ejemplo, el suministro de hemicelulosa se puede complementar con otras corrientes de la industria de la pulpa y/o del papel. Además, el proceso de producción de lípidos se puede complementar con otras materias primas distintas de las de la industria de la pulpa y/o del papel, tales como materiales lignocelulósicos como residuos agrícolas, cultivos energéticos, residuos de papel, biomasa de algas, residuos de la industria alimentaria, residuos sólidos orgánicos municipales, residuos biológicos de las cocinas institucionales, almidón (tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de patata, almidón de yuca, etc.) o azúcares, tales como melazas de caña de azúcar o de la remolacha azucarera. La materia prima para la producción de lípidos también puede incluir materias primas de

aditivos, tales como almidón o sus residuos, que se usan en un proceso de fabricación del papel.

De acuerdo con una realización preferida, la corriente de hemicelulosa procedente del proceso de reducción a pulpa, o separada antes del proceso de reducción a pulpa, es utilizada para la producción de lípidos mediante microorganismos. También se puede utilizar la fracción fermentable de la hemicelulosa producida en el proceso de reducción a pulpa. Para la producción de lípidos, se utilizan microorganismos capaces de utilizar los azúcares derivados de la hemicelulosa. Los microorganismos pueden ser cualquier organismo que sea capaz de acumular y/o de producir lípidos (microorganismos oleaginosos). Dichos microorganismos son bacterias, levaduras, hongos filamentosos (mohos) o algas que pueden crecer heterótrofa o mixotróficamente.

El microorganismo puede ser capaz de utilizar otros compuestos además de los azúcares incluidos en la hemicelulosa hidrolizada, tales como ácidos orgánicos derivados de la biomasa lignocelulósica para el crecimiento y la producción de lípidos. Los microorganismos también pueden utilizar compuestos, tales como ácidos orgánicos o alcoholes, añadidos como reactivos en la extracción de la hemicelulosa para el crecimiento y la producción de lípidos. Bajas cantidades de dichos compuestos, normalmente del 0,01 al 10 %, pueden permanecer en el producto hidrolizado tras la eliminación de la mayoría de dichos reactivos. La presencia de dichos compuestos puede ser ventajosa para el proceso microbiológico de producción de lípidos.

Los azúcares de la hemicelulosa pueden estar en forma monomérica y/o en forma oligomérica para la producción de lípidos. En una realización más preferida, los azúcares están principalmente en forma oligomérica. Por lo general, al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 %, preferentemente al menos un 50 %, preferentemente al menos un 60 %, preferentemente al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 90 % de la cantidad de los azúcares está en forma oligomérica y/o polimérica.

En una realización más preferida, el proceso de producción de lípidos utiliza microorganismos que son capaces de utilizar los azúcares poliméricos mediante exoenzimas tales como hemicelulasas, xilanasas, arabinasas, mananasas o galactosidasas. Los microorganismos que se usan poseen enzimas o son capaces de producir enzimas que son capaces de degradar y utilizar los azúcares oligoméricos de la hemicelulosa de diferentes materiales tales como materiales de madera incluyendo los galactoglucomanos de la madera dura y el xilano de la madera blanda, y los (arabino)xilanos de materiales herbáceos tales como la paja. Los exoenzimas degradantes de azúcares poliméricos producidas por microorganismos se pueden concentrar o recuperar del medio de cultivo agotado y reutilizar en el proceso de reducción a pulpa como dilución o agua del proceso. Las hemicelulasas se usan ampliamente en los procesos de reducción a pulpa, por ejemplo, en el blanqueamiento de la pulpa y en la modificación de las fibras. Cuando se usan para blanquear la pulpa, se prefiere que las hemicelulasas sean termoestables y tolerantes al pH alcalino. Esto disminuirá la necesidad de enfriar y ajustar el pH de la corriente de pulpa antes del tratamiento enzimático, lo que puede simplificar el proceso y ahorrar costes de capital y operativos.

La industria de la pulpa y/o del papel produce diversas corrientes residuales que contienen azúcares poliméricos tales como celulosa y/o hemicelulosa, dependiendo del proceso. El principal proceso de tratamiento de aguas residuales usado en las plantas de pulpa y papel es la sedimentación primaria (clarificación, sedimentación), donde se extrae la materia sólida. Esto se considera un tratamiento primario de las aguas residuales, y los sólidos producidos se conocen como lodo primario. Los lodos primarios normalmente contienen celulosa oligomérica, hemicelulosa y lignina y/o compuestos inorgánicos. El lodo primario es una materia prima adecuada para la producción de lípidos por microorganismos. El/los lodo/s primario/s de la industria de la pulpa y/o del papel se usan para la producción de lípidos por parte de microorganismos. Los lodos primarios se pueden pretratar para mejorar la biodegradabilidad de los azúcares, o se pueden tratar para reducir la cantidad de lignina o los residuos de lignina, los compuestos inorgánicos o los compuestos inhibidores antes de suministrarlos al bioproceso.

En una realización preferida, se usan microorganismos que son capaces de producir lípidos y enzimas capaces de hidrolizar los azúcares poliméricos. Dichas enzimas enriquecidas y/o recuperadas del medio de cultivo usado se pueden volver a usar en el proceso de la industria de la pulpa y del papel.

Los lodos primarios de la industria de la pulpa y/o del papel incluyen, por ejemplo, lodos procedentes del destintado, del descortezado, de la reducción química a pulpa, mecánica, de la reducción semiquímica o mecánica a pulpa y de la fabricación de papel. El lodo primario de la reducción química a pulpa incluye lodo primario del proceso de reducción a pulpa Kraft y lodos primarios del proceso de reducción a pulpa disolvente. Los lodos primarios de la reducción mecánica y semiquímica a pulpa incluyen los de los procesos de reducción mecánica a pulpa de muela de piedra (SGW), reducción mecánica a pulpa presurizada (PGW), reducción mecánica pulpa de refinador (RMP) y reducción termomecánica a pulpa (TMP). El lodo primario del proceso de destintado procede de la fábrica de papel que usa fibra reciclada, y dicho lodo puede contener tinte, colorante, goma de pegar, agente de cohesión, así como cargas de papel y otros aditivos inorgánicos, además de la fibra de celulosa. Por lo general, el lodo requiere la separación al menos parcial de los componentes inorgánicos de la fibra antes de suministrarlo en el proceso microbiano de producción de lípidos. El lodo primario de las fábricas de papel contiene cargas de fabricación del papel tales como arcilla, carbonato de calcio, talco y dióxido de titanio, además de fibras de celulosa. Por lo general, se requiere la separación al menos parcial de dichos compuestos inorgánicos que se suministran en el proceso de

producción de lípidos microbianos.

En una realización, el proceso de producción de lípidos microbianos está integrado en un proceso de reciclaje de fibra (proceso de reciclaje de pulpa). El lodo primario del proceso de la industria de la pulpa y del papel, tal como los lodos del destintado, se usa como materia prima para la producción de lípidos por parte de microorganismos. Los lodos del destintado se pueden tratar para reducir el contenido de compuestos inorgánicos, o compuestos inhibidores orgánicos o inorgánicos antes de suministrarlos al bioproceso. El lodo del destintado se puede complementar con otras materias primas procedentes de la industria de la pulpa y/o del papel o de otros lugares, tales como residuos lignocelulósicos agrícolas, cultivos energéticos, microalgas, cultivos de azúcar, almidón, sacarosa o melaza. El proceso microbiológico que usa al menos parte del lodo primario u otros residuos orgánicos del proceso de reciclaje de fibras, tales como del destintado, produce lípidos que se pueden recuperar y transformar en biocombustibles, y enzimas que son, por ejemplo, capaces de hidrolizar los azúcares poliméricos. Las enzimas se pueden recuperar y/o enriquecer del medio de cultivo agotado y reutilizar en un proceso de la industria de la pulpa y/o del papel, tal como en el proceso del reciclaje de fibra, en el destintado del papel. Las enzimas recuperadas también se pueden usar en otras partes del proceso de producción de pulpa y papel, o venderse y utilizarse en cualquier otro proceso.

Las enzimas del medio de cultivo agotado, capaces de hidrolizar los azúcares poliméricos, incluyen, por ejemplo celulasas y/o hemicelulasas dependiendo del microorganismo usado. Preferentemente, se incluyen tanto celulasas como hemicelulasas en el medio de cultivo agotado. El proceso de producción de lípidos a partir de lodo primario se puede complementar con otros residuos de la industria de la pulpa y/o del papel, o de materias primas procedentes de otros lugares, tales como residuos agrícolas, residuos de la industria alimentaria o biomasa lignocelulósica, o almidón o melaza.

Los exoenzimas se producen *in situ* suministrando a los microorganismos hemicelulosa que se ha extraído del mismo material que se usa para la producción de celulosa. Por lo tanto, los exoenzimas producidas *in situ* son muy adecuadas para el blanqueamiento de la pulpa *in situ*.

En una realización, un sobrenadante resultante del tratamiento de la pulpa o de una corriente de la industria de la pulpa y/o del papel con enzimas en un proceso de la industria de la pulpa y/o del papel se vuelve a reciclar al proceso de producción de lípidos microbianos. El sobrenadante puede contener compuestos que son ventajosos para el crecimiento y la producción de lípidos de microorganismos productores de lípidos. Por ejemplo, el sobrenadante puede contener azúcares adecuados para el crecimiento microbiano y la producción de lípidos, minerales para el crecimiento microbiano y/o enzimas que hidrolizan los azúcares poliméricos. En una realización, el sobrenadante resultante del preblanqueamiento enzimático de la pulpa, tal como el tratamiento con hemicelulasas, se recicla de nuevo al proceso de producción de lípidos microbianos. En otra realización, el sobrenadante del tratamiento enzimático de la pulpa disolvente para la eliminación de la hemicelulosa en la pulpa se recicla hacia el proceso de producción de lípidos. El sobrenadante se puede concentrar y/o recogerse la fracción de proteína, antes de suministrarlo al proceso de producción de los lípidos microbianos.

De acuerdo con una realización, también se pueden usar microorganismos que no son capaces de utilizar oligómeros o polímeros de azúcar para la producción de lípidos. En este caso, las materias primas procedentes de la industria de la pulpa y/o del papel, tales como de la hemicelulosa, lodo primario o residuos de fibra, se suministran como monómeros de azúcar al proceso de producción de lípidos. La hidrólisis de los polímeros de hemicelulosa en monómeros puede ocurrir debido al procedimiento de extracción de hemicelulosa o debido a la adición de enzimas capaces de hidrolizar polímeros de azúcar. La hidrólisis enzimática de la hemicelulosa y/o de la celulosa de las materias primas puede realizarse en una etapa del proceso independiente de la acumulación de aceite, o simultáneamente durante la acumulación del aceite, de acuerdo con la denominada metodología de sacarificación simultánea y fermentación.

Además, en una realización, se usan diferentes organismos (dos o más) para la hidrólisis de los azúcares poliméricos y la producción de lípidos a partir de monómeros de azúcar. Dicho proceso se caracteriza por que el proceso comprende un primer microorganismo, por ejemplo, una cepa de hongo filamentoso, levadura o bacteria, que es capaz de hidrolizar (despolimerizar) compuestos orgánicos poliméricos, tales como hemicelulosa o celulosa, y un segundo microorganismo, tal como una cepa de levadura, bacteria, algas u hongo filamentoso, que es capaz de usar los productos resultantes de la hidrólisis para su crecimiento y la producción de grasa unicelular. Dichas etapas de proceso se pueden implantar bien como procesos secuenciales o simultáneos. Una cepa de microorganismo capaz de hidrolizar compuestos orgánicos poliméricos se puede reemplazar por el uso de enzimas con una capacidad de hidrolizar dichos compuestos. El tratamiento enzimático puede realizarse antes de o simultáneamente a la producción microbiana de la grasa unicelular. La operación de bioproceso con dos o más especies se puede realizar mediante cualquier método, incluyendo, pero sin limitación, la operación en el mismo biorreactor al mismo tiempo en forma de cocultivos, o separando las fases del proceso de hidrólisis de la hemicelulosa y producción de lípidos en el tiempo o el espacio. En cualquiera de los casos, las enzimas implicadas en la hidrólisis de los polímeros de azúcar se pueden recuperar del medio de cultivo y reutilizarse en el proceso de reducción a pulpa.

El proceso de producción de lípidos también puede estar integrado en el proceso de reducción mecánica a pulpa. La producción de lípidos puede usar residuos tales como sustancias hidrosolubles creadas en la reducción a pulpa, como materias primas. Los residuos hidrosolubles en general contienen componentes de hemicelulosa tales como galactoglucomanano acetilado. El proceso de producción de lípidos se puede complementar con otros residuos de los procesos de la industria de la pulpa y/o del papel, o de otros lugares, tales como residuos agrícolas, residuos de la industria alimentaria o biomasa lignocelulósica, o almidón o melaza. Las enzimas producidas en la producción de lípidos se pueden reutilizar en la reducción mecánica a pulpa, por ejemplo, pero sin limitación, un tratamiento previo de las virutas de madera, o modificaciones o blanqueamiento de las fibras. Las enzimas producidas en la producción de lípidos usando residuos del proceso de reducción mecánica a pulpa también se pueden recuperar y reutilizar en otros procesos de reducción a pulpa, tales como la reducción química a pulpa o en el tratamiento de los productos del proceso de reducción química a pulpa.

Algunos microorganismos oleaginosos son capaces de utilizar monómeros de azúcar de la hemicelulosa, tales como la xilosa del xilano y la arabinosa del arabinoxilano, o la manosa, galactosa o glucosa del galactoglucomanano. Los organismos productores de lípidos pueden utilizar uno o varios de los compuestos mencionados anteriormente. Los organismos productores de lípidos se seleccionan del grupo de bacterias, cianobacterias, hongos tales como levaduras y mohos (hongos filamentosos), arqueobacterias o microalgas. Los microorganismos pueden acumular fácilmente lípidos o se han modificado mediante ingeniería genética para acumular lípidos o para mejorar la acumulación de lípidos. Los organismos productores de lípidos incluyen, pero sin limitación, los siguientes organismos:

especies de microalgas pertenecientes a los géneros que comprenden *Dunaliella*, *Chlorella*, *Botryococcus*, *Brachiomonas*, *Chlorococcum*, *Cryptocodinium*, *Euglena*, *Haematococcus*, *Chlamydomonas*, *Isochrysis*, *Pleurochrysis*, *Pavlova*, *Prototheca*, *Phaeodactylum*, *Pseudochlorella*, *Parachlorella*, *Bracteococcus*, *Scenedesmus*, *Skeletonema*, *Chaetoceros*, *Nitzschia*, *Nannochloropsis*, *Navicula*, *Nannochloris*, *Scihizochytrium*, *Skeletonema*, *Thraustochytrium*, *Ulkenia*, *Tetraselmis* y *Synechocystis*.

Especies de hongos filamentosos que pertenecen a los siguientes géneros: *Aspergillus*, *Mortierella*, *Chaetomium*, *Claviceps*, *Cladosporidium*, *Cunninghamella*, *Emericella*, *Fusarium*, *Glomus*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pythium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Zygorhynchus*, *Humicola*, *Cladosporium*, *Malbranchea*, *Ustilago*.

Levaduras pertenecientes a los siguientes géneros: *Clavispora*, *Deparyomyces*, *Pachysolen*, *Kluyveromyces*, *Galactomyces*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Waltomyces*, *Endomycopsis*, *Cryptococcus*, tales como *Cryptococcus curvatus*, *Rhodospiridium*, tales como *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula*, tales como *Rhodotorula glutinis*, *Yarrowia*, tales como *Yarrowia lipolytica*, *Pichia*, tales como *Pichia stipitis*, *Candida* tales como *Candida curvata*, *Lipomyces* tales como *Lipomyces starkeyi* y *Trichosporon* tales como *Trichosporon cutaneum* o *Trichosporon pullulans*.

Bacterias pertenecientes a los siguientes géneros: *Acinetobacter*, *Actinobacter*, *Alcanivorax*, *Aerogenes*, *Anabaena*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Escherichia*, *Flexibacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Rhodomicrobium*, *Rhodopseudomonas*, *Shewanella*, *Shigella*, *Streptomyces* y *Vibrio*. Lo más preferentemente, bacterias que comprenden *Rhodococcus opacus*, *Acinetobacter*, *Nocardia* o *Streptomyces*.

En realizaciones preferidas de la invención, se usan organismos oleaginosos, productores de lípidos, que son capaces de utilizar la hemicelulosa o la celulosa polimérica debido a exoenzimas (tales como hemicelulasas, por ejemplo, xilanasas, galactosidasas o mananasas, o celulasas). Estos organismos incluyen, pero sin limitación, bacterias tales como *Streptomyces* o *Bacillus*, hongos filamentosos tales como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Rhizopus* o *Trichoderma*, tales como *A. niger*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *F. oxysporum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Rhizopus oryzae* o *Trichoderma reesei*, levaduras, tales como *Cryptococcus* o *Trichosporon*, tales como *Cryptococcus albidus*, *Trichosporon cutaneum*. También se incluyen los microorganismos oleaginosos que están modificados genéticamente para ser capaces de utilizar los azúcares poliméricos de la hemicelulosa o de la celulosa. Además, también se incluyen los organismos capaces de utilizar los azúcares poliméricos de la hemicelulosa o de la celulosa que están modificados genéticamente para mejorar la producción de lípidos.

En las realizaciones más preferidas, se usan organismos productores de lípidos que son capaces de utilizar los azúcares poliméricos de la lignocelulosa, especialmente de la hemicelulosa. Dichos organismos son preferentemente los de los siguientes géneros de hongos filamentosos: *Aspergillus*, *Humicola*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, levaduras *Cryptococcus* o bacterias *Streptomyces*.

#### Otras enzimas distintas de las hemicelulasas

Las hemicelulasas son las principales enzimas aplicadas en la industria de la pulpa y/o del papel. También se engloba la recuperación y utilización de otras enzimas distintas de las hemicelulasas del proceso de producción de lípidos del proceso de la industria de la pulpa y/o del papel. Dichas enzimas pueden incluir, pero sin limitación,

celulasas, lacasas, pectinasas, lipasas, amilasas, esterases y proteasas.

Otra característica es utilizar al menos una parte de la lignina o sus fracciones producidas o liberadas en la reducción a pulpa o extracción previa de hemicelulosa, (pre)blanqueamiento, lodos primarios, o incluidas en otros residuos de la industria de la pulpa y/o del papel para producir enzimas que son capaces de la degradación, modificación o realización de cambios estructurales de la lignina. Dichas enzimas se pueden usar en varias aplicaciones tales como, pero sin limitación, (pre)blanqueamiento de la pulpa, destintado de la pulpa, tratamiento de la lignocelulosa previo a la reducción química a pulpa, fabricación de pulpa disolvente, descortezado o modificación de la fibra.

Otra característica es utilizar al menos una parte de la fracción de celulosa (pulpa) para producir enzimas capaces de degradar la celulosa. Dichas enzimas se pueden usar, por ejemplo, en la modificación de la fibra o en el destintado de la pulpa. La producción de celulasas se puede realizar mediante el uso de microorganismos oleaginosos capaces de utilizar la celulosa por poseer actividad celulasa. Por lo tanto, la producción de lípidos y celulasas se puede combinar, así como la producción de lípidos y hemicelulasas.

Otra característica más es producir pectinasas a partir de las corrientes de la industria de la pulpa y del papel. La producción de pectinasas se puede combinar con la producción de lípidos. Las pectinasas se pueden usar, por ejemplo, en la modificación de la fibra, el destintado de la pulpa, el descortezado o el enriado de las fibras flexibles.

La producción de exoenzimas por organismos disminuye la necesidad de adquirir enzimas del exterior, lo que mejora la rentabilidad de todo el proceso. La utilización de enzimas en el mismo sitio disminuye los costes atribuidos a la purificación y la estabilización de las enzimas. Como alternativa, las enzimas se pueden extraer, purificar y estabilizar, para comercializarlas como un subproducto de alto valor.

#### **Proceso de producción de lípidos**

La producción de lípidos microbianos se puede realizar con cualquier método conocido o un método desarrollado en el futuro. Por lo general, el proceso de producción de lípidos microbianos incluye el cultivo de microorganismos en biorreactores aireados en cultivo sumergido. Los microorganismos se cultivan en un medio de cultivo líquido que comprende fuentes de carbono y energía tales como azúcares de la hemicelulosa, y macronutrientes y micronutrientes. El cultivo se puede realizar, por ejemplo, como un cultivo discontinuo, un cultivo alimentado por lotes o un cultivo continuo. El cultivo también se puede realizar en un proceso en cascada. En el cultivo, se deja que los microorganismos crezcan y acumulen lípidos intracelularmente. Algunos microorganismos también pueden ser capaces de excretar los lípidos al medio de cultivo.

El proceso de producción de lípidos microbianos también se puede llevar a cabo en reactores, donde la cantidad de agua libre es baja o donde la producción se lleva a cabo sobre una superficie sólida o semisólida. La masa celular, u otra biomasa que no se disuelve en agua, se pueden extraer con soluciones acuosas con el fin de obtener enzimas en forma soluble.

En diversas realizaciones, el aceite o los precursores del aceite se pueden recuperar de la biomasa celular o del caldo de cultivo usando cualquier método conocido en la técnica o desarrollado en el futuro. Por ejemplo, un microorganismo se puede separar del medio usando técnicas de filtración o decantación. Como alternativa, se puede usar la centrifugación con centrifugadores comerciales a escala industrial de gran capacidad de volumen para separar los productos deseados.

En diversas realizaciones, las células bacterianas se pueden alterar para facilitar la separación del aceite y otros componentes. Se puede usar cualquier método conocido para la alteración celular, tal como ultrasonidos, choque osmótico, fuerza de cizalla mecánica, prensado en frío, choque térmico, autólisis autodirigida o catalizada por una enzima. El aceite se puede extraer de las células mediante extracción con disolventes orgánicos o mediante cualquier método conocido en la técnica o desarrollado en el futuro.

#### *Otros productos distintos de los lípidos*

También se engloba la producción microbiológica de otros compuestos distintos de los lípidos de la hemicelulosa y/o de la celulosa a partir de materias primas o de los residuos procedentes del proceso de reducción a pulpa tras la recuperación y/o reutilización de las enzimas en el proceso de reducción a pulpa. Dichos productos incluyen la producción microbiológica de alcoholes, etanol, butanol, acetona-etanol-butanol (ABE), isobutanol, 2,3-propanodiol, ácido láctico y ácido succínico.

El fin de los lípidos o de una fracción de lípidos producidos con el método descrito no se restringe a una aplicación determinada. Los lípidos se pueden usar, por ejemplo, pero sin limitación, para fines de alimentación humana o animal, en la cocina, como nutracéuticos, en la producción de jabón o detergentes, en la producción de cosméticos como productos químicos o materia prima para la producción de productos químicos, como biocombustibles o como materia prima para la producción de biocombustible o como lubricantes, como aceites base para lubricantes (aceites de lubricación) o como material de partida para la producción de aceites base para lubricantes.

Preferentemente, los lípidos recuperados de la biomasa microbiana con el método descrito se pueden usar como materia prima para la producción de biodiesel, diesel renovable, combustible de avión o gasolina. El biodiesel comprende metilésteres de ácidos grasos, y se produce normalmente por transesterificación. En la transesterificación, los acilglicerol se convierten en alquilésteres de ácido graso de cadena larga (metilo, etilo o propilo). El diesel renovable se refiere a combustible que se produce mediante el tratamiento con hidrógeno (desoxigenación con hidrógeno, hidrogenación o hidrotretamiento) de los lípidos. En el tratamiento con hidrógeno, los acilglicerol se convierten en los alcanos correspondientes (parafinas). Los alcanos (parafinas) se pueden modificar más por isomerización o mediante otros procesos alternativos. El proceso de producción de diesel renovable también se puede usar para producir combustible de avión y/o gasolina. Además, se puede realizar el termofraccionamiento de los lípidos para producir biocombustibles. Es más, en ciertas aplicaciones, los lípidos se pueden usar directamente como biocombustibles.

"Biocombustible" se refiere a combustible sólido, líquido o gaseoso derivado principalmente de la biomasa o de los residuos biológicos y es diferente de los combustibles fósiles, que se obtienen de los restos orgánicos de microorganismos, plantas y animales prehistóricos.

De acuerdo con la directiva de la UE 2003/30/UE, "biodiesel" se refiere a un metiléster producido a partir de aceite de origen vegetal o aceite de origen animal, de calidad diesel que se usa como biocombustible. En términos más generales, biodiesel se refiere a alquilésteres de cadena larga, tales como metilésteres, etilésteres o propilésteres, de aceite vegetal o animal de calidad diesel. El biodiesel también se puede producir a partir de lípidos de microorganismos, pudiendo proceder el lípido del microorganismo de una bacteria, un hongo (una levadura o un moho), un alga u otro microorganismo.

"Diesel renovable" se refiere a un combustible que se produce mediante un tratamiento con hidrógeno de lípidos de origen animal, vegetal o microbiológico, o sus mezclas, mediante el cual el lípido del microorganismo puede proceder de una bacteria, un hongo (una levadura o un moho), un alga u otro microorganismo. El diesel renovable también se puede producir a partir de ceras derivadas de la biomasa por gasificación y síntesis de Fischer-Tropsch. Opcionalmente, además del tratamiento con hidrógeno, se pueden realizar la isomerización u otras etapas de procesamiento. El proceso del diesel renovable también se puede usar para producir combustible de avión y/o gasolina. La producción de diesel renovable se ha descrito en las publicaciones de patente EP 1396531, EP1398364, EP 1741767 y EP1741768.

El biodiesel o diesel renovable se pueden mezclar con diesel a base de aceite mineral. Al producto combustible, se pueden añadir aditivos adecuados tales como conservantes y antioxidantes.

"Lubricante" se refiere a una sustancia, tal como grasa, lípido o aceite, que reduce la fricción cuando se aplica como un recubrimiento superficial en piezas móviles. Otras dos funciones principales de los lubricantes son la eliminación del calor y la disolución de impurezas. Las aplicaciones de los lubricantes incluyen, pero sin limitación, usos en motores de combustión interna como aceites de motor, aditivos de combustibles, en dispositivos impulsados por petróleo tales como bombas y equipos hidráulicos, o en diferentes tipos de rodamientos. Por lo general, los lubricantes contienen del 75 al 100 % de aceite base, siendo el resto aditivos. Los aditivos adecuados son, por ejemplo, detergentes, estabilizantes del almacenamiento, antioxidantes, inhibidores de la corrosión, deshumidificadores, desemulsionantes, agentes antiespumantes, codisolventes y aditivos de lubricidad (véase, por ejemplo, el documento US 7.691.792). El aceite base para el lubricante puede proceder del aceite mineral, aceite vegetal, aceite animal o de una bacteria, hongos (una levadura o un moho), un alga u otro microorganismo. El aceite base también puede proceder de ceras derivadas de la biomasa por gasificación y síntesis de Fischer-Tropsch. El índice de viscosidad se usa para caracterizar el aceite base. Por lo general, se prefiere un alto índice de viscosidad.

El término "lípido" se refiere a una sustancia grasa, cuya molécula contiene generalmente, como una parte, una cadena de hidrocarburo alifático, que se disuelve en disolventes orgánicos no polares, pero que es poco hidrosoluble. Los lípidos son un grupo esencial de grandes moléculas de las células vivas. Los lípidos son, por ejemplo, grasas, aceites, ceras, ésteres de ceras, esteroides, terpenos, isoprenoides, carotenoides, polihidroxialcanoatos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos, fosfolípidos, glucolípidos, esfingolípidos y acilglicerol.

El término "acilglicerol" se refiere a un éster de glicerol y ácidos grasos. Los acilglicerol se encuentran en la naturaleza en forma de grasas y aceites grasos. Los ejemplos de acilglicerol incluyen triacilglicerol (TG, triglicéridos), diacilglicerol (diglicéridos) y monoacilglicerol (monoglicéridos).

"Medio de cultivo agotado" se refiere a un medio usado en el cultivo de microorganismos y que comprende los productos acumulados por los microorganismos. En términos más generales, el medio de cultivo agotado se puede definir como una fracción del medio de cultivo tomado de un cultivo microbiano durante o después del cultivo. El medio de cultivo agotado también se puede denominar caldo de cultivo agotado.

El residuo celular extraído del aceite se puede usar para la producción de energía, por ejemplo, por combustión o tratamiento con un proceso de digestión anaerobia, o utilizar como pienso animal. El residuo celular extraído del

aceite, o una fracción del residuo celular, también se puede reciclar de nuevo al proceso de cultivo para su uso como una fuente de nutrientes.

La invención descrita en el presente documento se puede aplicar a cualquier proceso de reducción a pulpa, incluyendo, pero sin limitación, el proceso Kraft, el proceso de producción de pulpa disolvente o el proceso organosolv. En el caso del proceso de producción de pulpa disolvente, el presente proceso, tal como el proceso al sulfito o el proceso Kraft con extracción de la hemicelulosa (tal como el tratamiento con ácido), ya puede incluir la separación de la hemicelulosa antes de la reducción a pulpa, y el proceso de producción de lípidos se puede integrar más fácilmente en el proceso de reducción a pulpa.

La producción de enzimas para el proceso de la pulpa y/o del papel *in situ* es ventajosa por varias razones, y puede mejorar la rentabilidad del proceso de reducción a pulpa.

- reducción de los costes de procesamiento corriente abajo, incluyendo la estabilización del agua y de la enzima;
- reducción de los costes de transporte y de embalaje;
- reducción de las pérdidas a través de la transferencia directa de las enzimas al proceso de reducción a pulpa;
- reducción de los costes de capital frente a las instalaciones especializadas (remotas);
- la utilización de la misma materia prima o materia prima de la misma fuente para la producción enzimática y el proceso de pulpa/papel genera la inducción directa y la adaptación de las enzimas a la materia prima;
- control y ajuste de la producción sencillos del proceso, así como las oportunidades de mejora directamente dentro de la biorrefinería en la producción de enzimas y el proceso de pulpa/papel.

#### **Recuperación de enzimas del medio de cultivo agotado**

La concentración, la separación o la recuperación de enzimas del medio de cultivo agotado se pueden realizar mediante cualquier método conocido o un método desarrollado en el futuro. La recuperación se realiza con un método que preserva la actividad de la/s enzima/s deseada/s. Las enzimas del medio de cultivo agotado también se pueden volver a utilizar sin tener que realizar la concentración, separación ni recuperación de las mismas.

Las enzimas se pueden recuperar de cultivo de microorganismos, de medio de cultivo agotado, de sobrenadante mediante cualquier método conocido y adecuado o mediante cualquier método adecuado desarrollado en el futuro. Lo mismo se aplica también a los métodos mediante los cuales las enzimas se pueden separar en fracciones con las actividades enzimáticas deseadas.

Un método mediante el que se recuperan el cultivo de microorganismos o el sobrenadante o la fracción de proteína enriquecida que comprende enzima/s catalíticamente activa/s se puede basar en su tamaño molecular, comportamiento iónico, hidrosolubilidad, solubilidad en diferentes solutos o solubilidad en una mezcla de solutos que contenga un factor de tamponamiento o un factor tensioactivo, o un compuesto tensioactivo o una sal.

Las enzimas se pueden recuperar del medio de cultivo mediante diversos procedimientos, incluyendo, pero sin limitación, procedimientos tales como centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

Si es necesario, las enzimas se pueden purificar o aislar mediante diversos procedimientos que incluyen, pero sin limitación, cromatografía, procedimientos electroforéticos, solubilidad diferencial, SDS-PAGE o extracción.

Las enzimas se pueden estabilizar, por ejemplo, con sal, azúcar o glicerol.

Además, las enzimas se pueden formular para la aplicación deseada.

Por "condiciones adecuadas para la producción de lípidos" se entiende cualquier condición en la que el microorganismo sea capaz de crecer y producir lípidos.

Por "condiciones adecuadas para la producción de enzimas" se entiende cualquier condición en la que el microorganismo sea capaz de producir enzimas.

Como se describe en el presente documento, un microorganismo capaz de usar compuestos poliméricos u oligoméricos extracelulares para nutrirse, fuentes de carbono y/o de energía, se cultiva en un medio de cultivo que comprende la biomasa polimérica que contiene dichos compuestos. Se permite que el microorganismo produzca lípidos.



En el presente documento, "un medio de cultivo" se refiere a un medio usado para el cultivo de microorganismos. Por lo general, en el presente documento, el medio de cultivo comprende, al menos parcialmente, materia prima procedente de la industria de la pulpa y/o del papel que contiene, al menos en parte, compuestos poliméricos u oligoméricos tales como azúcares poliméricos. El medio de cultivo se puede complementar con minerales, micronutrientes, macronutrientes y agentes de tamponamiento.

Una materia prima preferida en las realizaciones desveladas es la biomasa polimérica que comprende lignocelulosa, celulosa, hemicelulosa y/o lignina, u otros componentes de la lignocelulosa como tales o como una combinación, o la biomasa tratada química o físicamente o por su combinación con el fin de mejorar el acceso de las enzimas hidrolíticas a polímeros de azúcar. La materia prima de lignocelulosa es preferentemente un residuo de la industria de la pulpa y del papel que contiene al menos algunos azúcares poliméricos de hemicelulosa y/o celulosa. Dicho residuo de la industria de la pulpa y/o del papel incluye, pero sin limitación, hemicelulosa del proceso de reducción química a pulpa, lodo primario de la reducción química a pulpa, reducción mecánica a pulpa, proceso de destintado o de fabricación de papel o residuos de fibra.

Por lo general, la biomasa pretratada es una biomasa que comprende hexosa y/o azúcares de pentosa. Las biomásas se pueden tratar antes o después del tratamiento enzimático por medios químicos, físicos (por ejemplo, (termo)mecánicos), biológicos o mediante cualquier combinación de los mismos, y tras ello, se usan para la producción de aceite unicelular.

"Azúcar polimérico" significa materia orgánica natural o materia orgánica tratada por diferentes métodos químicos o físicos, o por una combinación de los mismos. En el presente documento, azúcar polimérico normalmente significa un producto industrial o una corriente secundaria de un proceso de la industria de la pulpa y/o del papel, tal como una fracción que contiene hemicelulosa o celulosa.

"Separación del sobrenadante y de las células de microorganismos del medio de cultivo" significa cualquier proceso mediante el cual se obtienen una fracción celular separada y una fracción de sobrenadante.

"Enzima" significa, en particular, una enzima extracelular capaz de degradar hidratos de carbono complejos y proteínas. Más concretamente, la enzima es una enzima hidrolítica que degrada un enlace glucosídico o un péptido, éster o enlace de éter, o un enlace entre el nitrógeno y el carbono o entre el nitrógeno y el oxígeno. La enzima es preferentemente una celulasa, xilanasa, mananasa, galactasa, pectinasa, lipasa, proteasa o esterasa.

El preparado enzimático obtenido como se describe en el presente documento es el cultivo de microorganismos o, preferentemente, el sobrenadante o la fracción proteica enriquecida que comprende la enzima catalíticamente activa. Por lo general, el preparado enzimático es el agua del proceso de producción de aceite unicelular, o un agua de proceso, donde la fracción proteica está enriquecida. El enriquecimiento se puede llevar a cabo mediante cualquier método adecuado usado para enriquecer o concentrar proteínas en forma biológicamente activa.

En el presente documento, "enriquecimiento de una fracción proteica" se refiere a cualquier método de enriquecimiento de las proteínas del sobrenadante y mantenimiento de la actividad catalítica de las proteínas. Más concretamente, el método comprende que la fase líquida (sobrenadante) de un proceso de producción de aceite unicelular se trata mediante al menos un método de enriquecimiento de las proteínas en la fase líquida. La fracción de proteína se enriquece al menos un 10 %, normalmente al menos un 20 %, en diversas realizaciones, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, en comparación con la fase líquida original. Los ejemplos de métodos adecuados son los métodos basados en las propiedades iónicas de las proteínas, el tamaño molecular, la solubilidad, las propiedades tensioactivas o las interacciones hidrófobas. Preferentemente, la recuperación de la fracción enzimática se lleva a cabo en condiciones en las que la temperatura es de 70 °C o inferior.

"Celulasa" o "enzima celulolítica" se refiere a un grupo de enzimas producidas principalmente por hongos, tales como hongos filamentosos, o levaduras, bacterias, plantas o por animales que catalizan la hidrólisis de la celulosa, también denominada celulosolisis. El número EC para las enzimas celulasas es EC 3.2.1.4. Se conocen varios tipos diferentes de celulasas, que difieren estructural y mecánicamente. En general, las celulasas incluyen, basado en el tipo de reacción catalizada, endo-celulasas, exo-celulasas, celobiasas o  $\beta$ -glucosidasas, celulasas oxidativas y fosforilasas de celulosa.

"Hemicelulasa" se refiere a un grupo de enzimas producidas principalmente por hongos, tales como hongos filamentosos o levaduras, bacterias, plantas o por animales que catalizan la hidrólisis de la hemicelulosa. Por ejemplo, las enzimas implicadas en la hidrólisis del xilano incluyen endo-xilanasas, acetil-xilanesterasas,  $\alpha$ -D-glucuronidasas,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas, esterasas de ácido ferúlico y  $\beta$ -xilosidasas. Además, las enzimas implicadas en la hidrólisis de galactoglucomanano incluyen endomananasas, acetil-mananesterasas,  $\alpha$ -galactosidasas,  $\beta$ -glucosidasas,  $\beta$ -manosidasas. Además, las enzimas implicadas en la hidrólisis del arabinogalactano incluyen  $\beta$ -galactosidasa y endo- $\alpha$ -L-arabinanasa. Dichas enzimas se pueden encontrar en los siguientes números de la EC 3.2.1.8, EC 3.2.1.37, EC 3.2.1.55, EC 3.2.1.99, EC 3.2.1.139, EC 3.2.1.78, EC

3.2.1.25, EC 3.2.1.22, EC 3.2.1.21, EC 3.2.1.89, EC 3.1.1.72, EC 3.1.1.6, EC 3.1.1.73.

"Hemicelulosa" se refiere a un grupo de hidratos de carbono complejos que se encuentran en un material lignocelulósico que, con otros hidratos de carbono (por ejemplo, pectinas), rodean las fibras de celulosa de las células vegetales. La composición de las hemicelulosas depende del tipo de planta. La mayoría de los tipos comunes de hemicelulosas incluyen xilano, glucoronoxilano, glucomanano, galactoglucomanano, arabinoxilano, xiloglucano y arabinogalactano.

"Material lignocelulósico" o "biomasa lignocelulósica" se refieren a la biomasa que se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina.

"Sacarificación" se refiere a la hidrólisis de azúcares poliméricos en monómeros de azúcar. La sacarificación normalmente se realiza mediante el uso de enzimas capaces de hidrolizar los azúcares poliméricos.

En el presente documento, la expresión "microorganismo oleaginoso" se refiere a un microorganismo que es capaz de acumular al menos un 15 % (p/p) de lípidos de su biomasa cuando se cultiva en condiciones de cultivo adecuadas u óptimas.

"Lodo primario de la industria de la pulpa y del papel" se refiere a un lodo generado en el tratamiento primario de las aguas residuales procedentes del proceso de la industria de la pulpa y/o del papel. El lodo primario consiste en la materia suspendida en las aguas residuales de la industria de la pulpa y del papel que normalmente contiene celulosa oligomérica, hemicelulosa y lignina y/o compuestos inorgánicos. Por lo general, el lodo primario se obtiene por sedimentación (clarificación, sedimentación) de la materia en suspensión de las aguas residuales. Además de la sedimentación, se pueden usar otros métodos para recoger la materia en suspensión de las aguas residuales de pulpa y papel. Esto se considera un tratamiento primario de las aguas residuales, y los sólidos producidos se conocen como lodo primario.

Por lo general, en la naturaleza, la celulosa no se disuelve en el agua. La hidrólisis de la celulosa sólida requiere tres tipos diferentes de enzimas. Las endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas. Las endoglucanasas (CE 3.2.1.4) actúan principalmente en la parte amorfa de la celulosa, atacando aleatoriamente los estancos internos de la macromolécula de celulosa. Las exoglucanasas o celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) atacan la terminación de la cadena de celulosa, hidrolizando principalmente una unidad de celobiosa por vez. Las exoglucanasas también pueden hidrolizar el polímero de celulosa cristalino. Por último, la hidrólisis de la celobiosa en monómeros de glucosa es realizada por la  $\beta$ -glucosidasa (CE 3.2.1.21).

La hidrólisis de la celulosa necesita la cooperación de muchas celulasas diferentes. La cantidad de diferentes glucosilhidrolasas analizada es muy alta; más de 90 enzimas diferentes ya se encuentran numeradas (incluso más en estudio) en 14 familias diferentes como, por ejemplo, dominios celobiohidrolasa (CBH I, II), dominios endoglucanasa (EG I, II, III, IV, V) y dominios  $\beta$ -glucosidasa (BGL I, II). En muchas aplicaciones de las enzimas en la industria de la pulpa y del papel, tales como en el (pre)blanqueamiento de la pulpa, la degradación de las fibras de celulosa por parte de las celulasas es desfavorable.

Para la hidrólisis enzimática total de la hemicelulosa (xilanos, arabinoxilanos y glucomananos) se necesitan varias enzimas diferentes, que se deben activar aproximadamente a la vez. El primer ataque es realizado por enzimas tales como endoxilanasas (1,4- $\beta$ -D-xilan-xilano-hidrolasas), endoarabinasas y endomananasas (1,4- $\beta$ -D-manan-manano-hidrolasas). Por ejemplo, *Trichoderma reesei* tiene al menos 4 endoxilanasas diferentes y una endomananasa.

Las enzimas capaces de hidrolizar los oligómeros de hemicelulosa tras la operación de las endohemicelulasas son  $\beta$ -xilosidasa,  $\beta$ -arabinosidasa,  $\beta$ -manosidasa y  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21). Para romper los enlaces secundarios residuales incluidos en los oligómeros, se necesitan  $\alpha$ -glucuronidasa (EC 3.2.1.139),  $\alpha$ -arabinosidasa (EC 3.2.1.55) y  $\alpha$ -D-galactosidasa (EC 3.2.1.22). Para la eliminación de los constituyentes de aceto se requiere la operación de las esterases (EC 3.2.1.72).

Además, la hidrólisis enzimática de la lignina requiere la actividad de las enzimas oxidativas tales como lignina peroxidasa (LiP EC 1.11.1.14), peroxidasa dependiente del manganeso (MnP EC 1.11.1.13) y lacasa (EC 1.10.3.2). La modificación de la lignina necesita la cooperación de muchas enzimas, coenzimas y el sistema de transporte de electrones entre los donantes y aceptores finales. La estructura química y la unión de la lignina a la celulosa y la hemicelulosa son más importantes que la cantidad de lignina.

El medio de cultivo agotado (efluente) del proceso de producción de lípidos o los residuos celulares (biomasa residual) del proceso de recuperación de lípidos a partir del cual se han extraído las enzimas se pueden usar con varios fines. Por ejemplo, se puede reciclar parcial o totalmente hacia el proceso de producción de lípidos. Como alternativa, se puede tratar en la planta de tratamiento de aguas residuales de la industria de la pulpa y del papel. El efluente y/o residuo de biomasa contienen nutrientes que pueden reducir la necesidad de añadir nutrientes al

proceso de tratamiento de aguas residuales de la pulpa y/o del papel. El medio de cultivo agotado y/o los residuos celulares también se pueden tratar en el biogás de digestión anaerobia, obteniéndose biogás con o sin suplementación de residuos o lodo de producción de pulpa y/o papel procedentes del tratamiento de aguas residuales del proceso de pulpa y/ papel. El lodo procedente de la digestión anaerobia se puede usar como fertilizante.

En resumen, a continuación, se describen diversas realizaciones con ayuda de las siguientes cláusulas numeradas 1-31:

## Cláusulas

1. Un proceso integrado que comprende:

- un primer proceso, que es un proceso de producción de aceite unicelular, y un segundo proceso, que es un proceso de la industria de la pulpa y/o del papel, en el que la materia orgánica de la industria de la pulpa y/o del papel se introduce en el proceso de producción de aceite unicelular, y en el que, en el proceso de producción de aceite unicelular, se usa un microorganismo capaz de producir lípidos, o lípidos y enzimas cuando se cultiva en un medio que comprende materia orgánica de la industria de la pulpa y/o del papel;
- la producción de lípidos o de lípidos y enzimas por dichos microorganismos en el proceso de producción de aceite unicelular y/o en un proceso conectado al mismo;
- la separación del sobrenadante y/o de las células de microorganismos del cultivo de microorganismos;
- la recuperación de los lípidos de las células de microorganismos, y la recuperación del sobrenadante o de una fracción enriquecida en proteínas del sobrenadante o una dilución del sobrenadante que comprende enzimas catalíticamente activas del proceso de producción de aceite unicelular o de un proceso conectado al mismo y, opcionalmente, la introducción de uno o de todos ellos en el proceso de la industria de la pulpa y/o del papel.

2. El proceso de acuerdo con la cláusula 1, en el que al menos el 5 % de cierta/s enzima/s usada/s en el proceso de la industria de la pulpa y/o del papel se produce en el proceso de producción de aceite unicelular o en un proceso conectado a dicho proceso.

3. El proceso de acuerdo con la cláusula 1 o 2, en el que las enzimas y los lípidos son producidos por el mismo microorganismo.

4. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 3, en el que las enzimas y los lípidos son producidos por uno o más microorganismos.

5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 4, en el que el microorganismo productor de enzimas y el microorganismo productor de lípidos son diferentes.

6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 5, en el que las enzimas se producen en un proceso separado del proceso de producción de aceite unicelular integrado en el proceso de la industria de la pulpa y/o del papel.

7. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 6, en el que las enzimas comprenden hemicelulasas, xilanasas, mananasas, galatosidasas, peroxidadasas, lacasas, pectinasas, celulasas, glucosidasas, arabinasas, lipasas, amilasas, esteradasas o proteasas, o cualquier mezcla de las mismas.

8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 7, en el que la materia orgánica suministrada en el proceso de producción de aceite unicelular comprende al menos un 50 % de lignocelulosas o una fracción de lignocelulosa, preferentemente al menos un 10 % de azúcares poliméricos.

9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 8, en el que la materia orgánica comprende al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 % de hemicelulosas, o una o varias fracciones de hemicelulosa.

10. El proceso de acuerdo con la cláusula 8 o 9, en el que la materia orgánica comprende hemicelulosa o una fracción de la misma procedente del proceso de reducción a pulpa disolvente o extraída antes de la cocción del proceso de reducción a pulpa Kraft o del proceso de reducción a pulpa disolvente.

11. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 10, en el que las enzimas comprenden exoenzimas, preferentemente enzimas asociadas con la hidrólisis de la hemicelulosa.

12. El proceso de acuerdo con la cláusula 11, en el que las enzimas comprenden hemicelulasas, xilanasas, mananasas, arabinasas, galactosidasas, glucosidasas, manosidasas, xilosidasas, arabinofuranosidasas o esterasas, o cualquier mezcla de las mismas.
- 5 13. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 12, en el que la materia orgánica comprende al menos un 20 % de celulosa, preferentemente al menos un 30 % de celulosa o fracciones de la misma.
14. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 13, en el que la materia orgánica es lodo primario y/o residuos de fibra procedentes de la industria de la pulpa y/o del papel.
- 10 15. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 14, en el que las enzimas comprenden exoenzimas, preferentemente enzimas asociadas con la hidrólisis de la celulosa.
16. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 15, en el que las enzimas comprenden celulasas, endo-celulasas, exo-celulasas, celobiasas o  $\beta$ -glucosidasas, celulasas oxidativas, fosforilasa de celulosa o hemicelulasas, o cualquier mezcla de las mismas.
- 15 17. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 16, en el que se producen tanto celulasas como hemicelulasas.
- 20 18. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 16, en el que los productos de hidrólisis de azúcares poliméricos procedentes del proceso de la industria de la pulpa y/o del papel se recirculan hacia el proceso de producción de lípidos.
- 25 19. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 17, en el que el proceso de la industria de la pulpa y/o del papel comprende un proceso, tal como un proceso de reducción a pulpa disolvente, el tratamiento de la lignocelulosa en o antes de la reducción a pulpa (que mejora la reducción a pulpa disolvente), el proceso de reducción a pulpa Kraft, el tratamiento de la lignocelulosa en o antes de la reducción a pulpa (que mejora la reducción a pulpa Kraft), el (pre)blanqueamiento de la pulpa o el proceso de reducción mecánica a pulpa, la modificación de la fibra, el descortezado, el proceso de reciclaje de la fibra, el destintado, la modificación de la fibra, la fabricación de papel, la eliminación del limo y/o de la brea.
- 30 20. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 19 en el que el microorganismo es un hongo filamentoso, una levadura o una bacteria, preferentemente un hongo perteneciente a un género seleccionado del grupo que consiste en *Aspergillus*, *Humicola*, *Rhizopus* y *Trichoderma*, o una levadura perteneciente al género *Cryptococcus*, o una bacteria perteneciente al género *Streptomyces*.
- 35 21. Un preparado enzimático obtenido mediante el proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 19.
- 40 22. Uso de la enzima producida de acuerdo con el proceso de una cualquiera de las cláusulas 1-19 o el preparado enzimático de acuerdo con la cláusula 21 en la industria de la pulpa y/o del papel o en otras aplicaciones en forma de preparado enzimático o de fuente de enzimas.
- 45 23. Uso de las hemicelulasas producidas de acuerdo con el proceso de una cualquiera de las cláusulas 1 a 20 o preparado enzimático de acuerdo con la cláusula 21 en el (pre)blanqueamiento de la pulpa, la mejora del proceso de reducción a pulpa disolvente, la mejora del proceso de reducción a pulpa Kraft, el descortezado, el destintado y/o la modificación de la fibra, preferentemente en el (pre)blanqueamiento.
- 50 24. El uso de celulasas producidas de acuerdo con el proceso de una cualquiera de las cláusulas 1-20 o preparado enzimático de acuerdo con la cláusula 21 en el destintado, la modificación de la fibra, la mejora del proceso de reducción a pulpa disolvente, la mejora del proceso de reducción a pulpa Kraft y/o el descortezado, preferentemente en la modificación de la fibra y/o en el destintado.
- 55 25. Un sistema de procesos integrado para la producción de lípidos y la industria de la pulpa y/o del papel, que comprende que el proceso de producción de lípidos usa materia orgánica procedente de la industria de la pulpa y/o del papel como materia prima para la producción de lípidos, y un proceso de pulpa y/o papel usa enzimas procedentes del sobrenadante del proceso de producción de lípidos.
- 60 26. Un sistema de procesos integrado para la producción de lípidos y proceso de reducción química a pulpa, que comprende que el proceso de producción de lípidos usa hemicelulosa, lodo primario y/o fracciones del mismo como materia prima para la producción de lípidos, y el proceso de pulpa y/o papel usa las hemicelulasas obtenidas del proceso de producción de lípidos.
- 65 27. Un sistema de procesos integrado para la producción de lípidos y proceso de reciclaje de fibra, que comprende que el proceso de producción de lípidos usa lodo de destintado y/o fracciones del mismo como

materia prima para la producción de lípidos, y el proceso de pulpa y/o papel usa enzimas obtenidas del proceso de producción de lípidos.

5 28. Un sistema de procesos integrado para la producción de lípidos y proceso de reducción mecánica a pulpa, que comprende que el proceso de producción de lípidos usa residuos procedentes de la reducción mecánica a pulpa, lodo primario y/o fracciones del mismo como materia prima para la producción de lípidos, y el proceso de pulpa y/o papel usa enzimas obtenidas del proceso de producción de lípidos.

10 29. Un proceso para la producción de lípidos que comprende:

- 15 - el cultivo de un microorganismo capaz de producir tanto lípidos como enzimas en condiciones adecuadas para la producción de lípidos y la producción de enzimas en un medio que comprende la materia orgánica procedente de la industria de la pulpa y/o del papel, y la producción de lípidos y enzimas por dichos microorganismos;
- 20 - separación del sobrenadante y de las células de microorganismos del cultivo de microorganismos;
- la recuperación de los lípidos de las células de los microorganismos; y
- la recuperación del sobrenadante o una fracción enriquecida en proteína del sobrenadante o una dilución del sobrenadante que comprende enzimas catalíticamente activas.

25 30. Uso de los lípidos producidos de acuerdo con el proceso de una cualquiera de las cláusulas 1 a 20 o el preparado enzimático de acuerdo con la cláusula 21 como biocombustible, como un componente de biocombustible o como un material de partida para la producción de biocombustible.

31. El uso de acuerdo con la cláusula 30, en el que el biocombustible es el biodiesel o diesel renovable, gasolina y/o combustible para aviones.

30 Es un objeto de los siguientes ejemplos ilustrar la invención, y de ningún modo, se deben interpretar como limitantes de la misma.

#### Ejemplos

35 Se determinaron las actividades enzimáticas del caldo de cultivo agotado procedente de cultivos de hongos filamentosos productores de grasa mediante ensayos de hidrólisis con celulosa pura y con xilano como sustratos.

#### Métodos

##### 40 Definición de Azúcar:

Para definir la concentración de azúcar de una solución, se preparó la solución en una dilución adecuada que se filtró a través de 0,2  $\mu$ m antes de un análisis HPLC.

45 La columna usada en la definición del azúcar fue el intercambiador iónico Shodex Sugar SP 0810 en forma de plomo (en fase estacionaria). Las dimensiones de la columna fueron de 8,0 mm (DI) x 300 mm. El eluyente fue agua (caudal de 0,6 ml/min) y la temperatura de la columna fue de 60 °C. El detector fue RI Shimatzu RID 10A, la bomba fue A6 y el inyector automático fue Shimatzu SIL 20A. El procesamiento de los resultados se realizó con el software Class-VP.

##### 50 Análisis de los ácidos grasos:

Se determinó la composición de ácidos grasos de las muestras como en el método descrito por Suutari *et al.* (1990). Primero se hidrolizaron los lípidos de las muestras en ácidos grasos libres, que se saponificaron en sales sódicas de los mismos y, posteriormente, se metilaron en metilésteres. Los metilésteres de ácidos grasos se analizaron por cromatografía de gas.

##### Análisis de concentración de proteínas:

60 Se analizó la concentración de proteínas de los caldos de cultivo después de la filtración del caldo a través de papel de filtro Whatman3. La concentración de proteína se analizó de acuerdo con el ensayo de proteínas Bio-Rad (basado en el método de Bradford).

##### 65 Pruebas de hidrólisis:

Se filtró el caldo de cultivo a través de papel de filtro Whatman3 antes del ensayo de hidrólisis.

La actividad xilanasa se determinó de la siguiente manera. Se usó un matraz Erlenmeyer de 100 ml como recipiente de reacción. Se llenó con 20 ml solución de xilano de madera de abedul al 1 % (Sigma) en tampón fosfato (0,02 M, pH 5) como sustrato, 10 ml de caldo de cultivo filtrado y 20 ml de tampón de fosfato (0,02 M, pH 5). Se realizó la reacción de hidrólisis en un baño de agua agitado (140 rpm) a 50 °C. Se tomaron muestras de 1 ml del recipiente de reacción directamente tras la adición del caldo de cultivo y después de 1, 3, 5, 21/23 horas. Se detuvo la reacción de hidrólisis en la muestra de 1 ml disminuyendo el pH mediante la adición de 50 µl de ácido sulfúrico 1,33 M. Se trataron las muestras para eliminar la sal y el azúcar polimérico para adaptarla al análisis HPLC. Se analizaron los azúcares liberados por HPLC (véase la definición de azúcar) con manitol como patrón.

Se determinó la actividad de la celulasa con 1 g de papel de filtro Whatman como sustrato de celulosa en lugar de xilano. El volumen de reacción fue de 50 ml, y contenía 1 g de papel de filtro Whatman en círculos de igual tamaño (aprox. 5 mm de diámetro) como sustrato, 10 ml de caldo de cultivo filtrado y 40 ml de tampón de fosfato (0,02 M, pH 5). El experimento se realizó de otra manera como con xilano.

#### 15 **Cepas de microorganismos:**

En general, hay microorganismos productores de lípidos disponibles de una pluralidad de colecciones de cepas, tales como ATCC, DSM, etc. Diversas realizaciones de la invención se describen en los siguientes ejemplos mediante el uso de cepas de microorganismos de la siguiente manera. *Aspergillus oryzae* DSM 1861, *Aspergillus oryzae* DSM 1864 y *Aspergillus terreus* DSM 1958.

#### Ejemplo 1

El presente ejemplo muestra la actividad enzimática formada en el caldo de cultivo durante el cultivo de *Aspergillus oryzae* con material basado en hemicelulosa como fuente de carbono para la producción de lípidos.

Se cultivó *Aspergillus oryzae* en cultivos en matraz con xilano de abedul purificado (Sigma) y hemicelulosas de abeto y de abedul extraídas por extracción en agua caliente a presión como fuente de carbono. Se realizaron cultivos en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de medio de cultivo. La base del medio de crecimiento contenía por litro de agua 1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g de MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, 0,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0,2 g de CaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O, y se complementó con fuente de carbono, extracto de levadura y, opcionalmente, material de soporte. Se inocularon los medios de cultivo con suspensión de esporas de hongos al 1 % (v/v), y se incubaron los cultivos a 28 °C de temperatura.

En el caso del xilano purificado, la base del medio se complementó con 40 g por litro de xilano de abedul purificado (Sigma) y 1 g de extracto de levadura. Se incubaron los cultivos por duplicado en un agitador orbital (160 rpm) durante 6 días.

En el caso de la hemicelulosa de abeto y abedul, la base del medio se complementó con 44 g por litro de hemicelulosa de abeto o abedul seca producida por extracción con agua caliente, 0,5 g de extracto de levadura y 2 g de celulosa para dar soporte mecánico al micelio fúngico. Se incubaron los cultivos por triplicado en un agitador orbital (180 rpm) durante 7 días.

Tras la incubación, se filtró el caldo de cultivo a través de papel de filtro Whatman 3. Se determinaron la concentración de proteína y las actividades enzimáticas del filtrado. Se lavó la materia retenida con agua destilada y se secó. Se determinaron la concentración de biomasa y el contenido de lípidos de las muestras secas.

Sobre xilano de abedul purificado después de 6 días de cultivo, el hongo *A. oryzae* produjo 16 g/l de biomasa (peso en seco) y la biomasa contenía 10,5 % de lípidos/peso seco. *Aspergillus oryzae* desarrollado sobre hemicelulosa de abedul extraída en agua produjo 14 g/l de biomasa seca durante 7 días de incubación. La biomasa que contenía micelio fúngico, hemicelulosa residual y celulosa contenía 8,9 % de lípidos/peso seco equivalentes a 1,26 lípidos por litro de medio de cultivo. Para la producción de lípidos, tanto el xilano como la hemicelulosa de abedul fueron mejores que la hemicelulosa de abeto, pues sobre hemicelulosa de abeto, se produjeron 8,7 g/l de biomasa seca que contenía 3,7 % de lípidos/peso seco.

La concentración de proteína de los caldos de cultivo fue de 0,06 y 0,02 mg/ml para los cultivos de hemicelulosa de abeto y abedul, y de 0,05 mg/ml para el cultivo de xilano de abedul.

En las Figuras 3 y 4, se presenta la xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis de xilano en función del tiempo por mililitro de caldo de cultivo y por miligramo de proteína en la reacción. En la Figura 3, se muestra la xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul. En la Figura 4, se muestra la xilosa liberada en el ensayo de la hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul.

Un mililitro de cultivo de caldo del cultivo de hemicelulosa de abeto liberó 1,2 mg de xilosa en 21 h, y 20,1 mg/mg de proteína. Un mililitro de caldo de cultivo del cultivo de hemicelulosa de abedul liberó 5,2 mg de xilosa en 21 h, y

234,6 mg/mg de proteína. Un mililitro de caldo de cultivo del cultivo de xilano de abedul liberó 5,0 mg de xilosa en 23 h, y 101,4 mg/mg de proteína.

Los caldos de cultivo de los cultivos de *Aspergillus oryzae* con hemicelulosa o fuente de carbono de xilano mostraron una actividad xilanasa significativa. Los caldos de cultivo no resultaron tener actividad celulasa detectable, pues no se detectó glucosa libre en el ensayo de hidrólisis de la celulosa. Los ejemplos indican que el medio de cultivo agotado de la producción de lípidos con *A. oryzae* a partir de hidrolizados de hemicelulosa de madera contiene hemicelulasas, tales como xilanasas, que pueden estar en la degradación de la hemicelulosa de los materiales de madera, lo que es una propiedad favorable para el (pre)blanqueamiento de la pulpa. La producción de lípidos a partir de la hemicelulosa procedente de material de madera muestra un ejemplo de una posibilidad de integración del proceso de producción de lípidos con un proceso de reducción a pulpa Kraft o un proceso de reducción a pulpa disolvente con la etapa de extracción previa de la hemicelulosa. Además, la actividad de las hemicelulasas, pero la falta de actividad de la celulasa, indica la aplicabilidad de las enzimas en las aplicaciones de (pre)blanqueamiento de la pulpa.

### Ejemplo 2

El presente ejemplo muestra la actividad de xilanasa selectiva formada en el caldo de cultivo durante el cultivo de *Aspergillus oryzae* con material basado en lignocelulosa como fuente de carbono para la producción de lípidos.

Se cultivó *Aspergillus oryzae* para la producción de lípidos en materiales lignocelulósicos a base de celulosa. La base del medio de crecimiento contenía por litro de agua 40 g de material lignocelulósico como fuente de carbono, 1,46 g de peptona como fuente de nitrógeno, 0,5 g de extracto de levadura, 1 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,5 g de  $K_2HPO_4$ , 1 g de  $KH_2PO_4$  y 0,2 g de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0,00015 g de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,0001 g de  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  y 0,00625 g de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ . Se trituró la fuente de carbono y se tamizó (0,2 mm) celulosa de sulfato de madera dura blanqueada de abedul que contenía aprox. 15 % de hemicelulosa. Se añadió dicho material de celulosa al cultivo, dando una concentración final de 50 g/l. Se inoculó el medio de cultivo con 50 ml de suspensión de *Aspergillus oryzae* previamente cultivada durante 48 h. Se realizó la fermentación en un volumen de medio de cultivo de 1 l a una temperatura de 28 °C con 0,8 l/min de aireación y 350-450 rpm de agitación. El pH del cultivo fue de 5,7 y se ajustó con NaOH 3 M durante el cultivo. Las actividades enzimáticas se determinaron tras 188 h de incubación.

Se separaron los cultivos de caldos, y se ensayaron la concentración de proteína, y la actividad de xilanasa y celulasa como se ha descrito anteriormente. La concentración de proteína del caldo de cultivo fue de 0,11 mg/ml. En las Figuras 5 y 6, se presenta el azúcar liberado durante los ensayos de hidrólisis como miligramos por mililitro de caldo de cultivo y miligramos por miligramo de proteína en función del tiempo. La Figura 5 muestra la xilosa y la xilobiosa liberadas en el ensayo de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul. La Figura 6 muestra la xilosa y la xilobiosa liberadas en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul. La Figura 7 muestra el azúcar liberado (xilosa y glucosa) como el % del sustrato (500 mg de celulosa nativa o biomasa residual del cultivo) durante el ensayo de hidrólisis con 1 ml de solución de xilanasa comercial.

Se quedó una cantidad significativa de material de celulosa residual tras 188 h de cultivo. Se trató dicha biomasa con xilanasa comercial (10,6 mg de proteína/ml) para determinar la composición del residuo. Como referencia, se trató celulosa de abedul nativa con la misma solución enzimática. En los ensayos de hidrólisis, se suspendieron 500 mg de material de celulosa seca en 49 ml de tampón de fosfato (0,02 M, pH 5) y 1 ml de solución enzimática. El ensayo de hidrólisis se realizó de otro modo de manera similar a los ensayos de actividad enzimática. En la Figura 7, se presenta el azúcar liberado durante los ensayos de hidrólisis como miligramos por mililitro de caldo de cultivo y miligramos por miligramo de proteína en función del tiempo.

El ensayo enzimático (celulasa y xilanasa) para el caldo de cultivo solo mostró actividad de la xilanasa, pero no se detectó actividad de la celulasa. En el ensayo de hidrólisis con xilano como sustrato, se liberaron cantidades significativas tanto de xilosa como de xilobiosa.

El ensayo de hidrólisis con la xilanasa comercial (con una pequeña actividad de celulasa) para la biomasa residual mostró que solo se pudieron hidrolizar trazas de hemicelulosa (inferiores al 2 % de xilosa liberada) de la celulosa residual del cultivo. En otras palabras, la xilanasa formada en el caldo durante el cultivo había hidrolizado de manera eficaz la parte de hemicelulosa de la celulosa.

Del material de celulosa nativa original usado en el cultivo como fuente de carbono, el 11 % del sustrato se liberó como xilosa cuando se trató con xilanasa. El material contenía aprox. el 15 % de hemicelulasas.

Dicho ejemplo muestra que *Aspergillus oryzae* puede producir enzimas con actividad selectiva de la xilanasa (sin actividad de celulasa) en el proceso de producción de lípidos cuando se cultiva con material de lignocelulosa como fuente de carbono. Dicha xilanasa se puede usar para hidrolizar selectivamente la hemicelulosa dejando una fracción enriquecida de celulosa intacta. La actividad de las hemicelulasas, pero la falta de actividad de la celulasa, indica la aplicabilidad de las enzimas en las aplicaciones de (pre)blanqueamiento de la pulpa.

**Ejemplo 3**

El presente ejemplo muestra la actividad enzimática formada en el caldo de cultivo durante el cultivo de *Aspergillus terreus* con material basado en hemicelulosa como fuente de carbono para la producción de lípidos.

*Aspergillus terreus* se cultiva para la producción de lípidos en una hemicelulosa de paja de trigo como sustrato de carbono en un volumen de 2 litros en un biorreactor. El medio de cultivo se compone de 50 ml de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos ni sulfato de amonio (Difco) 10 x solución madre suspendida en 2 l de agua y se complementó por litro con: 1,0 g de extracto de levadura, 1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 2 g de celulosa. Se inoculó el medio de cultivo con 150 ml de cultivo de *A. terreus* previamente cultivado durante 24 h. La fermentación se realizó a una temperatura de 35 °C con 3,0 l/min de aireación y agitación a 200-430 rpm. El pH del cultivo fue de 5,7, y se ajustó con NaOH 3 M durante el cultivo. Durante el cultivo, se suministró la solución de hemicelulosa en el fermentador. Las actividades enzimáticas se determinaron tras 165 h de incubación.

Se separó el caldo de cultivo y se concentró parcialmente por ultrafiltración en una celda de ultrafiltración agitada Amicon con un filtro de 10.000 Da (Millipore). La concentración de proteína y de lípidos, y la actividad de la xilanasas y la celulasa se ensayaron como se ha descrito anteriormente.

El contenido de lípidos de la biomasa que contiene micelio fúngico, hemicelulosa residual y celulosa fue del 15 % en peso seco. La concentración de proteína fue de 0,72 mg/ml en el caldo de cultivo sin concentrar y de 2,15 mg/ml en el caldo concentrado.

En las Figuras 8 a 11, se presenta el azúcar liberado durante los ensayos de hidrólisis como miligramos por mililitro de caldo de cultivo y miligramos por miligramo de proteína en función del tiempo.

La Figura 8 muestra la xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul. La Figura 9 muestra la xilosa liberada en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usaron 200 mg de xilano de madera de abedul. La Figura 10 muestra la glucosa liberada en los ensayos de hidrólisis por volumen de caldo de cultivo. Como sustrato, se usó 1 g de celulosa. Parte de la xilosa se liberó de la hemicelulosa procedente del caldo de cultivo usado. La Figura 11 muestra la glucosa liberada en el ensayo de hidrólisis por proteína. Como sustrato, se usó 1 g de celulosa. Parte de la xilosa se liberó de la hemicelulosa procedente del caldo de cultivo usado.

El presente ejemplo indica que *Aspergillus terreus* puede producir tanto lípidos intracelulares como enzimas hidrolíticas extracelulares al caldo de cultivo. El ejemplo muestra que *A. terreus* produce y excreta al medio de crecimiento enzimas que tienen actividad de degradación tanto del xilano y como de la celulosa. Dichas enzimas se pueden separar, concentrar y usar en la hidrólisis y el tratamiento de material lignocelulósico en aplicaciones en las que son favorables las actividades tanto de la celulasa como de la hemicelulosa. Dichas aplicaciones en la industria de la pulpa y/o del papel pueden incluir la modificación de fibras, el destintado o el descortezado. Además, la cepa para la actividad tanto hacia la hemicelulosa como la celulosa polimérica es aplicable para su uso con residuos de la industria de la pulpa y/o del papel que contienen tanto celulosa como hemicelulosa, tales como lodo primario del destintado, la reducción química a pulpa y/o reducción mecánica a pulpa. Por lo tanto, el presente ejemplo indica la posibilidad de integrar el proceso de producción de lípidos con la reducción química a pulpa, la reducción mecánica a pulpa o los procesos de reciclaje de fibra.

**Referencias**

Bajpai P. 1999. "Application of Enzymes in the Pulp and Paper Industry". *Biotechnol. Prog.* 15: 147-157.

Bajpai P. 2004. "Biological Bleaching of Chemical Pulps". *Critical Reviews in Biotechnology.* 24:1-58.

Bhat M. K. "Cellulases and related enzymes in biotechnology", *Biotechnology Advances*, Vol 18, Nº 5, 1 de agosto de 2000 (2000-08-01), páginas 355-383.

Beg Q. K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G. S. 2001. "Microbial xylanases and their industrial applications: a review". *Appl Microbiol Biotechnol* (2001) 56:326-338.

Dhiman S. S., Sharma J., Battan B. 2008. "Industrial application and future prospects of microbial xylanases: a review". *Bioresources* 3:1377-1402.

Fall R., Phelps P., Spindler D. 1984. "Bioconversion of Xylan to Triglycerides by Oil-Rich Yeasts". *Applied and Environmental Microbiology* 47:1130-1134.

Lin H., Cheng W., Ding H. T., Chen X. J., Zhou Q. F., Zhao Y. H. 2010. "Direct microbial conversion of wheat straw into lipid by a cellulolytic fungus of *Aspergillus oryzae* A-4 in solid-state fermentation". *Bioresource*



*Technology* 101:7556-7562.

Lynd L. R., van Zyl W. H., McBride J. E., Laser M. 2005. "Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update". *Current Opinion in Biotechnology* 16:577-583.

5 Huang H-J. Ramaswamy S., Tschirner U. W., Ramarao B. V. 2008. "A review of separation technologies in current and future biorefineries". *Separation and Purification Technology* 62:1-21.

10 Marinova M., Mateos-Espejel E. Jemaa N., Paris J. 2009. "Addressing the increased energy demand of a Kraft mill biorefinery: The hemicellulose extraction case". *Chemical engineering research and design* 87:1269-1275.

15 C. V. T. Mendes, M. G. V. S. Carvalho, C. M. S. G. Baptista, J. M. S. Rocha, B. I. G. Soares, G. D. A. Sousa. 2009. "Valorisation of hardwood hemicelluloses in the kraft pulping process by using an integrated biorefinery concept". *Food and Bioproducts Processing* 87:197-207.

Peng Xuiao-Wei *et al.*, "Microbial oil accumulation and cellulase secretion of the endophytic fungi from oleaginous plants", *Annals of Microbiology*, Vol. 57, N° 2, 1 de enero de 2007 (2007-01-01), páginas 239-242.

20 Suutari M., Liukkonen K., Laakso S. 1990. "Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids". *Journal of General Microbiology* 136: 1469-1474.

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso integrado que comprende:

5 - un primer proceso, que es un proceso de producción de aceite unicelular, y un segundo proceso, que es un proceso de la industria de la pulpa y/o del papel,

en el que la materia orgánica del proceso de la industria de la pulpa y/o del papel se introduce en el proceso de producción de aceite unicelular, y en el que, en el proceso de producción de aceite unicelular, se usa un  
10 microorganismo capaz de producir lípidos y enzimas cuando se cultiva en un medio que comprende materia orgánica del proceso de la industria de la pulpa y/o del papel,

- la producción de lípidos y enzimas por dichos microorganismos en el proceso de producción de aceite unicelular;

15 - la separación del sobrenadante y de las células de microorganismos del cultivo de microorganismos;  
- la recuperación de lípidos de las células de microorganismos, y

la recuperación del sobrenadante o de una fracción enriquecida en proteínas del sobrenadante que comprende enzimas catalíticamente activas o una dilución del sobrenadante que comprende enzimas catalíticamente activas del  
20 proceso de producción de aceite unicelular y la introducción de uno o de todos ellos en el proceso de la industria de la pulpa y/o del papel.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las enzimas y los lípidos son producidos por el mismo microorganismo.

25 3. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el microorganismo productor de enzimas y el microorganismo productor de lípidos son diferentes.

30 4. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las enzimas comprenden hemicelulasas, xilanasas, mananasas, galatosidasas, peroxidadas, lacasas, pectinasas, celulasas, glucosidasas, arabinasas, lipasas, amilasas, esterasas o proteasas o cualquier mezcla de las mismas.

35 5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la materia orgánica suministrada en el proceso de producción de aceite unicelular comprende al menos un 50 % de lignocelulosas o una fracción de lignocelulosa, preferentemente al menos un 10 % de azúcares poliméricos.

6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la materia orgánica comprende al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 % de hemicelulosas, o una o varias fracciones de hemicelulosa.

40 7. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las enzimas comprenden exoenzimas, preferentemente enzimas asociadas con la hidrólisis de la hemicelulosa.

8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la materia orgánica comprende al menos un 20 % de celulosa, preferentemente al menos un 30 % de celulosa o fracciones de la misma.

45 9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que las enzimas comprenden exoenzimas, preferentemente enzimas asociadas con la hidrólisis de la celulosa.

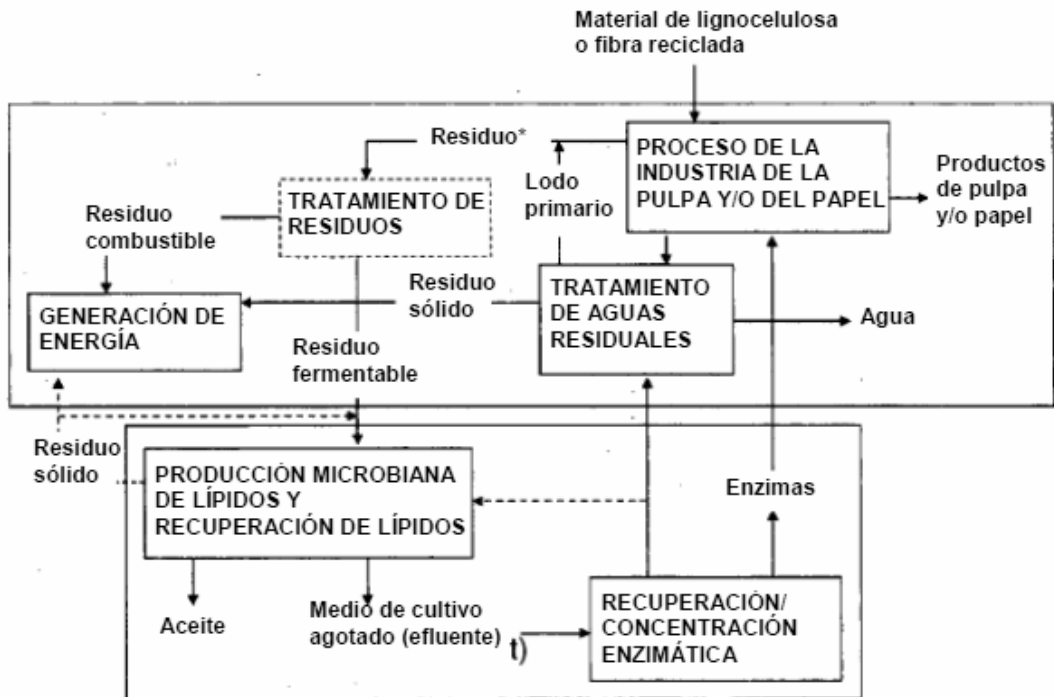
50 10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el proceso de la industria de la pulpa y/o del papel está seleccionado del grupo de un proceso de reducción a pulpa disolvente, un proceso de reducción a pulpa Kraft, (pre)blanqueamiento de la pulpa o un proceso de reducción mecánica a pulpa, modificación de la fibra, descortezado, un proceso de reciclaje de la fibra, destintado, modificación de la fibra, fabricación de papel y eliminación del limo y/o de la brea.

55 11. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el microorganismo es un hongo filamentoso, una levadura o una bacteria, preferentemente un hongo perteneciente a un género seleccionado del grupo de *Aspergillus*, *Humicola*, *Rhizopus* y *Trichoderma*, o es una levadura perteneciente al género *Cryptococcus*, o es una bacteria perteneciente al género *Streptomyces*.

60 12. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que las enzimas producidas en el proceso de producción de aceite unicelular se usan en el proceso de la industria de la pulpa y/o del papel como un preparado enzimático o como una fuente de enzimas.

65 13. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que las enzimas producidas en el proceso de producción de aceite unicelular se vuelven a usar con fines catalíticos en el proceso de producción de aceite unicelular.

- 5 14. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que las hemicelulasas producidas en el proceso de producción de aceite unicelular se usan en el (pre)blanqueamiento de la pulpa, la mejora del proceso de reducción a pulpa disolvente, la mejora del proceso de reducción a pulpa Kraft, el descortezado, el destintado y/o la modificación de la fibra, preferentemente en el (pre)blanqueamiento.
- 10 15. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que las celulasas producidas en el proceso de producción de aceite unicelular se usan en el destintado, la modificación de la fibra, la mejora del proceso de reducción a pulpa disolvente, la mejora del proceso de reducción a pulpa Kraft y/o el descortezado, preferentemente en la modificación de la fibra y/o en el destintado.
- 15 16. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que los lípidos producidos en el proceso de producción de aceite unicelular se usan como biocombustible o como un componente de biocombustible o como un material de partida para la producción de biocombustible.
17. El proceso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el biocombustible es biodiesel o diesel renovable, gasolina y/o combustible para aviones.
- 20 18. Un sistema de procesos integrado para la producción de lípidos y la industria de la pulpa y/o del papel, que comprende que un proceso de producción de lípidos usa materia orgánica procedente de procesos de la industria de la pulpa y/o del papel como materia prima para la producción de lípidos, y los procesos de la industria de la pulpa y/o del papel usan enzimas procedentes del proceso de producción de lípidos.
- 25 19. El sistema de procesos integrado de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el proceso de la industria de la pulpa y/o del papel es un proceso de reducción química a pulpa, y en el que el proceso de producción de lípidos usa hemicelulosa, lodo primario y/o fracciones del mismo como materia prima para la producción de lípidos, y el proceso de la industria de la pulpa y/o del papel usa hemicelulasas obtenidas del proceso de producción de lípidos.
- 30 20. El sistema de procesos integrado de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el proceso de la industria de la pulpa y/o del papel es un proceso de reciclaje de fibra, en el que el proceso de producción de lípidos usa lodo del destintado y/o fracciones del mismo como materia prima para la producción de lípidos, y el proceso de la industria de la pulpa y/o del papel usa enzimas obtenidas del proceso de producción de lípidos.
- 35 21. El sistema de procesos integrado de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el proceso de la industria de la pulpa y/o del papel es un proceso de reducción mecánica a pulpa, en el que el proceso de producción de lípidos usa residuos procedentes de la reducción mecánica a pulpa, lodo primario y/o fracciones del mismo como materia prima para la producción de lípidos, y el proceso de la industria de la pulpa y/o del papel usa enzimas obtenidas del proceso de producción de lípidos.



\*material que contiene hemicelulosa y/o celulosa, tal como extracto de hemicelulosa, licor de sulfito agotado, lodo primario, o restos o residuos de fibra.

Fig. 1

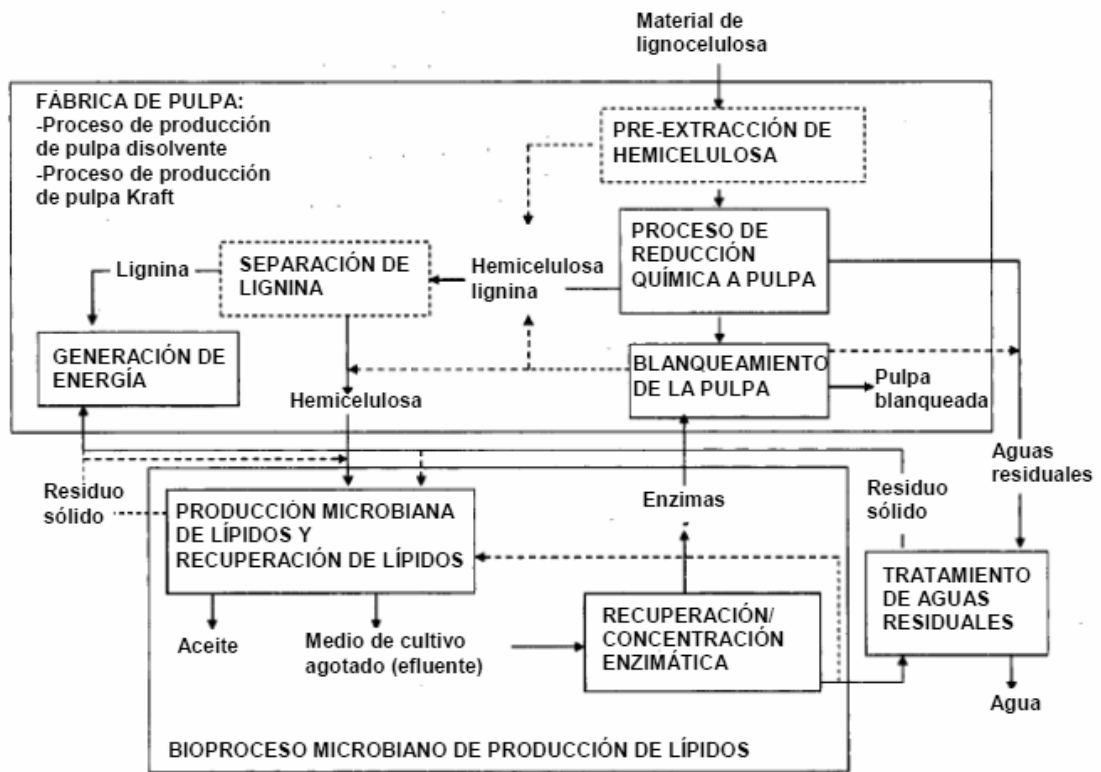


Fig. 2

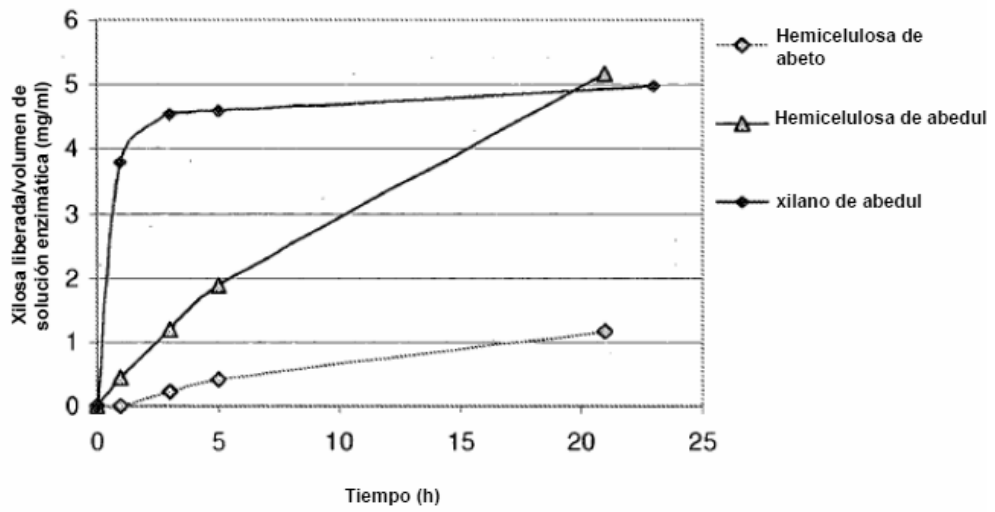


Fig. 3

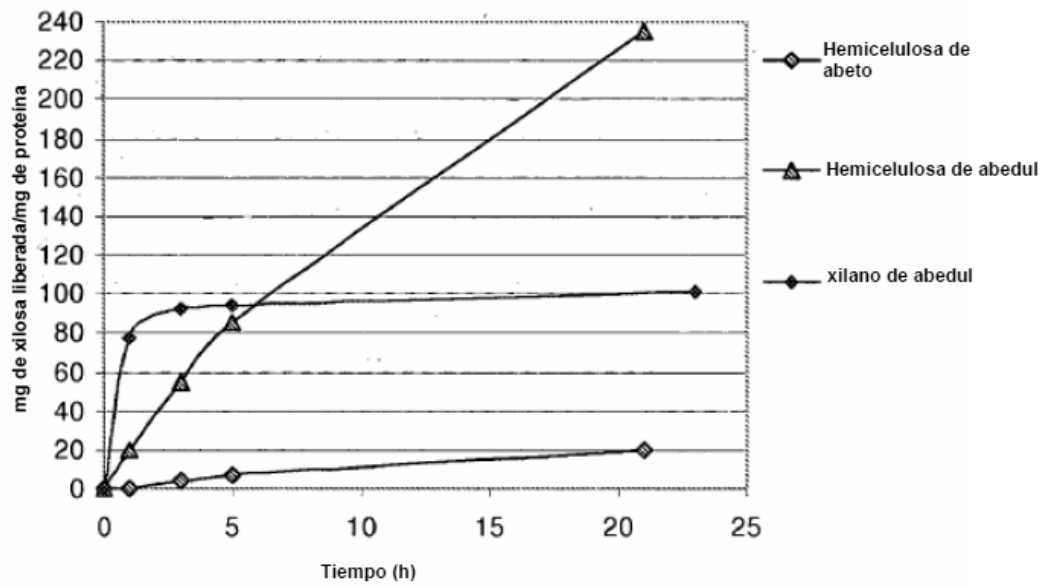


Fig. 4

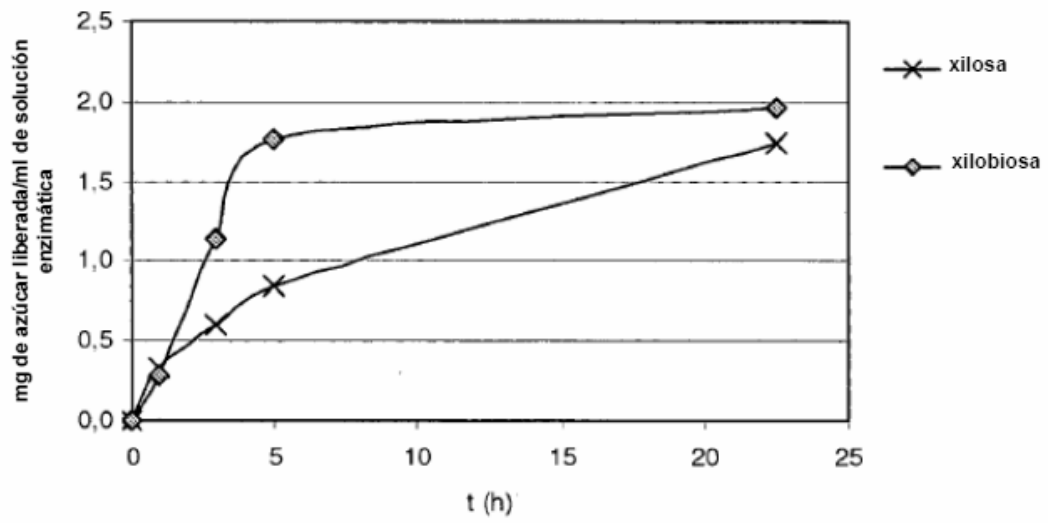


Fig. 5

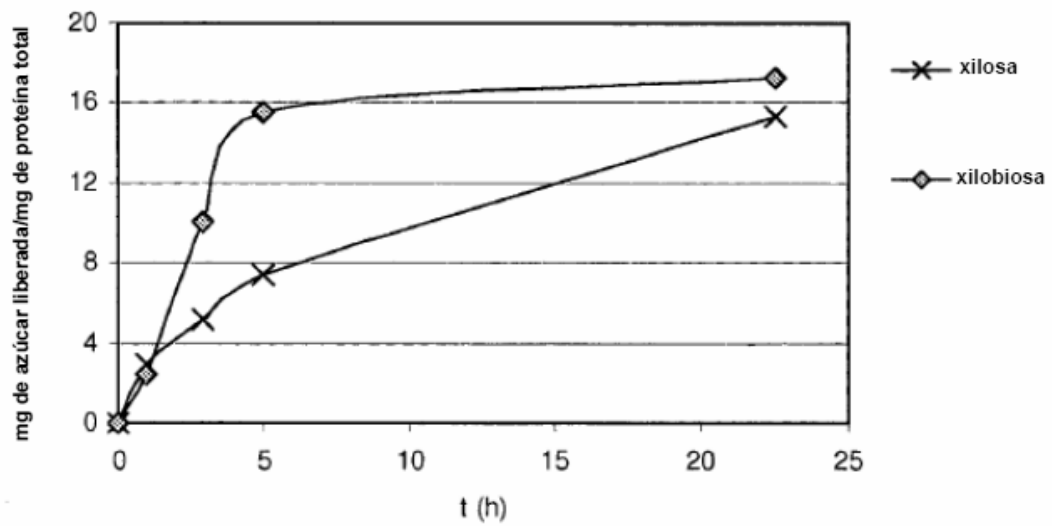


Fig. 6

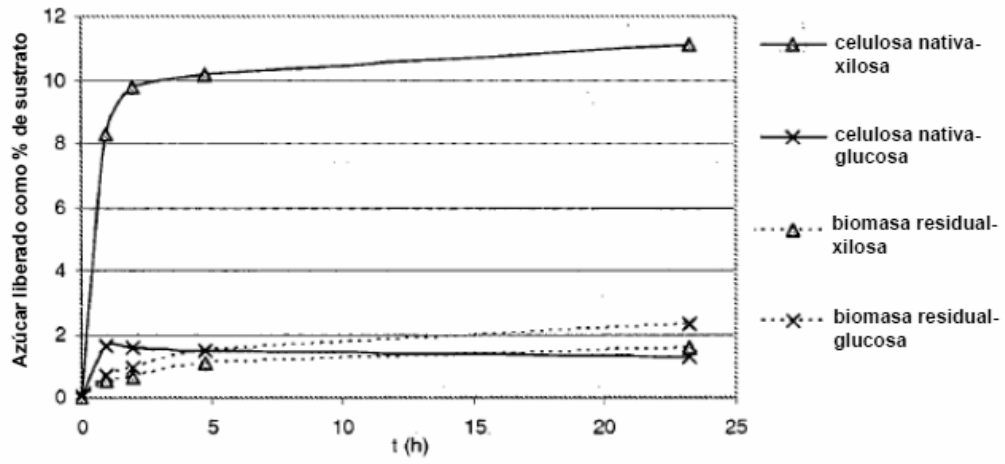


Fig. 7

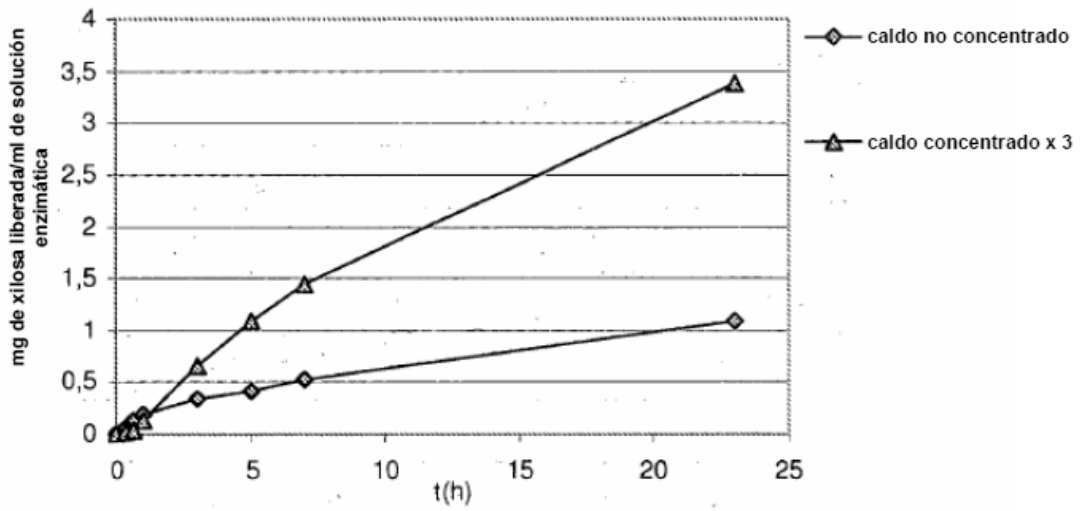


Fig. 8



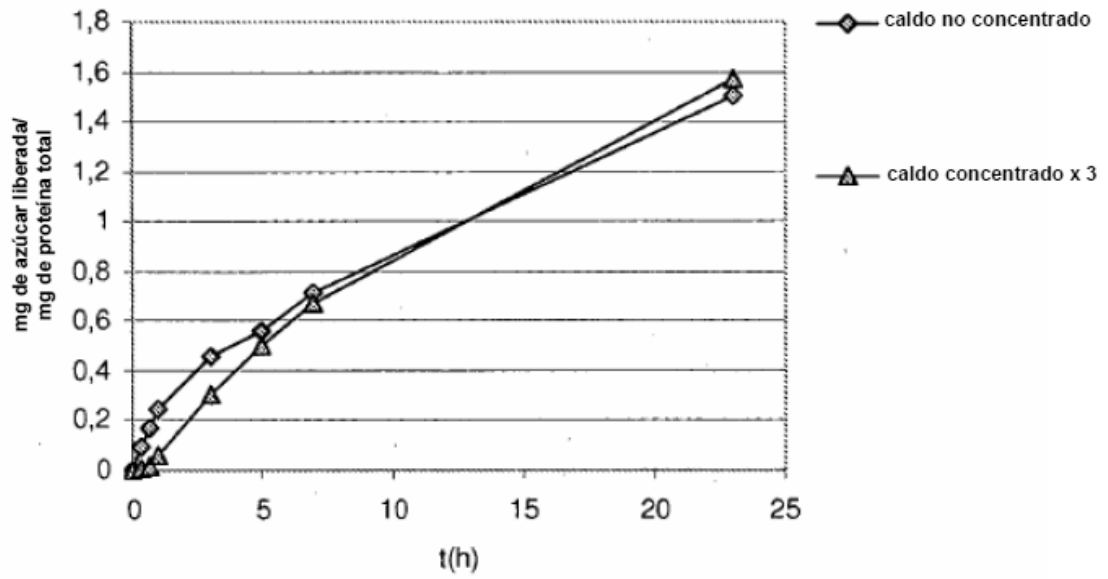


Fig. 9

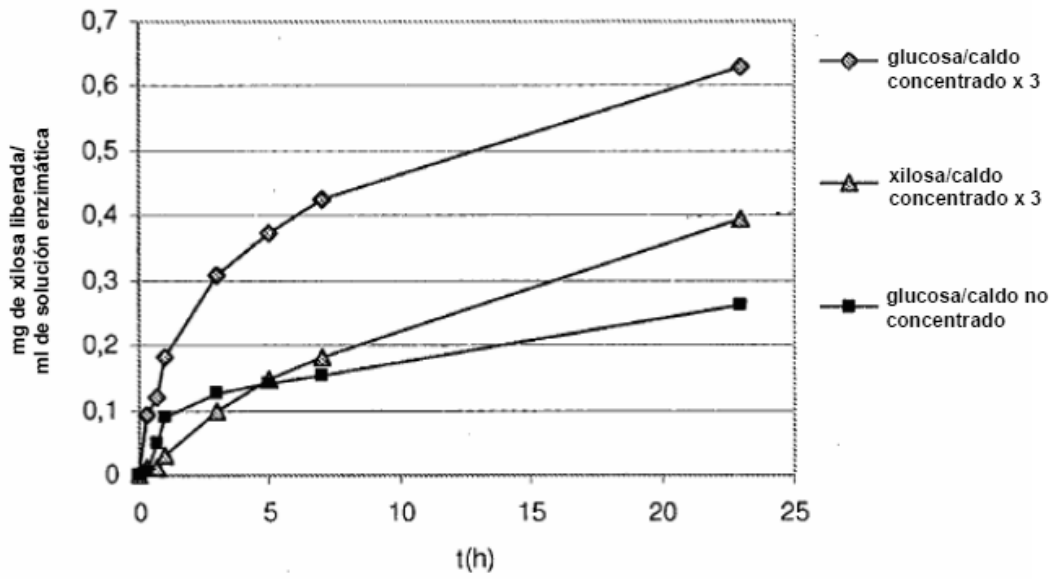


Fig. 10

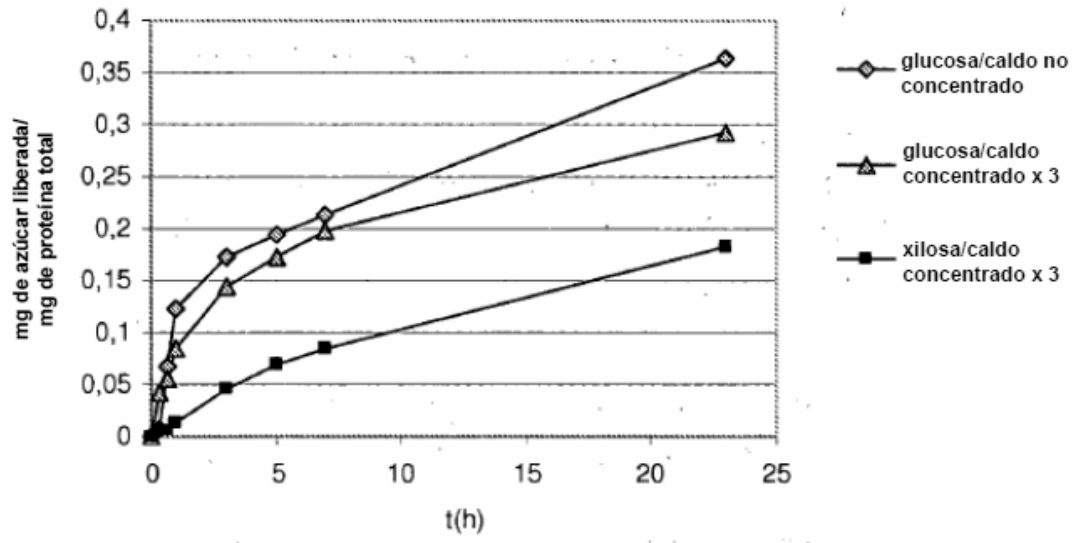


Fig. 11