

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 617**

21 Número de solicitud: 201330859

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

10.06.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.01.2015

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070477

71 Solicitantes:

**NEOL BIOSOLUTIONS, S.A. (100.0%)
Avenida de la Innovación, 1 Edificio BIC, Parque
Tecnológico de la Salud
18016 Granada ES**

72 Inventor/es:

**CAMPOY GARCÍA, Sonia;
GIBERT AMAT, Jordi;
LARA CAMBIL, Armando;
SUÁREZ GONZÁLEZ, Beatriz;
VELASCO ALVAREZ, Javier y
ADRIO FONDEVILA, José Luis**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **PRODUCCIÓN DE ACEITES MICROBIANOS**

57 Resumen:

Producción de aceites microbianos.

La presente invención se refiere a la cepa *Rhodospiridium toruloicis* CECT 13085, así como a los usos de la misma para la obtención de biomasa microbiana rica en triglicéridos y para la producción de aceites de origen microbiano en presencia de hidrolizados de biomasa lignocelulósica.

ES 2 526 617 A1

DESCRIPCIÓN

PRODUCCIÓN DE ACEITES MICROBIANOS

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la producción de aceites de origen microbiano a partir de cultivos de un microorganismo en presencia de hidrolizados de biomasa lignocelulósica.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El creciente problema de las emisiones de CO₂, además de las preocupaciones relacionadas con la seguridad de la energía, ha incrementado en los últimos años el interés en las fuentes de energía alternativas no basadas en el petróleo. La lignocelulosa es la fuente de biomasa renovable más abundante con una producción mundial anual estimada de unas 10¹⁰ toneladas (Sánchez y Cardona, 2008. *Bioresour. Technol.*, 99: 5270-5295), y por ello, esta biomasa es la única fuente de energía primaria renovable que puede proporcionar biocombustibles alternativos como el bioetanol o biodiesel a corto plazo (Hamelinck *et al.* 2005. *Biomass Bioenergy*, 28: 384-410; Sánchez, 2009. *Biotechnol. Avd.*, 27: 185-194; Zhang, 2011. *Process Biochem.* 46: 2091-2110; Huang *et al.* 2013. *Biotechnol. Avd.* 31: 129-139).

Sin embargo, aunque la conversión biológica de diferentes materias primas lignocelulósicas como residuos agrícolas, o cultivos energéticos dedicados a la producción de biocombustibles o productos químicos ofrece numerosos beneficios, su desarrollo presenta todavía numerosos obstáculos técnicos y económicos. Uno de los obstáculos más importantes tanto a nivel económico como técnico es la liberación, a un precio económico, de los azúcares presentes en la biomasa (Lynd *et al.* 2008. *Nature Biotechnol.* 26: 169-172; Zhang, 2011. *Process Biochem.* 46. 2091-2110). De hecho, esta etapa está considerada como la más cara del proceso de producción de etanol pudiendo alcanzar hasta el 40% de los costes totales del proceso. A lo largo de los últimos años se ha desarrollado un gran número de estrategias de pretratamiento sobre diferentes tipos de materias primas como hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina, explosión de vapor, explosión de amonio o hidrotatamiento térmico, entre otras (Yang y Wyman, 2008. *Biofuels Bioprod. Bior.* 2: 26-40; Hendriks y Zeeman, 2009. *Bioresour. Technol.* 100: 10-18; Alvira *et al.* 2010. *Bioresour. Technol.* 101: 4851-4861).

Uno de los puntos más importantes a considerar la hora de desarrollar un proceso de pretratamiento es minimizar la cantidad de compuestos tóxicos que se generan en esta etapa ya que son potentes inhibidores del metabolismo microbiano afectando al crecimiento (Palmquist y Hahn-Hägerdal. 2000. *Bioresour. Technol.* 74: 17-24). La cantidad y variedad de compuestos depende del tipo de pretratamiento y de la naturaleza de la materia prima debido a los diferentes grados de metoxilación de la lignina y su asociación con la hemicelulosa y celulosa. Los productos de degradación que se generan durante el pretratamiento del material lignocelulósico pueden ser de tres tipos: ácidos carboxílicos, derivados del furano y compuestos fenólicos (Palmqvist y Hägerdal. 2000. *Bioresour. Technol.* 74: 25-33; Almeida et al., 2007. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82: 340-349). Los ácidos acético, fórmico y levulínico son los principales ácidos débiles. Los principales derivados del furano son el furfural y el 5-hidroximetilfurfural que se obtienen a partir de la degradación de las hexosas y pentosas. Los compuestos fenólicos incluyen alcoholes, aldehídos, cetonas y ácidos (Klinke et al. 2002. *Bioresour. Technol.* 82: 15-26).

Con el fin de minimizar los costes del proceso, el producto resultante del pretratamiento (*slurry*) debe ser empleado directamente para llevar a cabo sacarificación de la celulosa y hemicelulosa. Además, este proceso de hidrólisis debe realizarse empleando la mayor concentración posible de *slurry* (indicada como porcentaje de sólidos). Las concentraciones de *slurry*, en procesos industriales, deben alcanzar, como mínimo, valores entre un 15-20% de sólidos ya que permite reducir los volúmenes de operación y obtener soluciones con una alta concentración de azúcares (120-140 g/l). Sin embargo, existen dos problemas principales a la hora de emplear estas soluciones de azúcares directamente como parte de un medio de cultivo: en primer lugar, la presencia de los compuestos tóxicos ya mencionados (Palmquist y Hahn-Hägerdal. 2000. *Bioresour. Technol.* 74: 17-24; Almeida et al., 2009. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82: 625-638) y, en segundo lugar, la necesidad de metabolizar todas las pentosas (fundamentalmente xilosa) presentes en estas mezclas con el fin de utilizar todos los azúcares e incrementar el rendimiento final de los posteriores procesos de cultivo.

Aunque estos inhibidores pueden ser eliminados de forma eficiente por diferentes procesos de destoxificación (Mussatto y Roberto. 2004. *Bioresour Technol* 93: 1-10; Sánchez y Cardona. 2008. *Bioresour. Technol.*, 99: 5270-5295; Almeida *et al.* 2009. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82: 625-638), su aplicación incrementa el coste de producción de etanol y,

además, conlleva una pérdida de azúcares fermentables. Existen algunos procesos de hidrólisis y pretratamiento, utilizados con materias primas agrícolas y herbáceas, que dan lugar a hidrolizados fermentables que no requieren destoxificación (Mosier y col., 2005. Bioresour. Technol. 96:1986-1993). Sin embargo, el consumo de agua en estos casos es
5 elevado por lo que, teniendo presente el consumo/ahorro de agua, es necesario que los hidrolizados de cualquier tipo de biomasa lignocelulósica sean concentrados. Por ello, es previsible que los compuestos formados durante dicho proceso alcancen niveles inhibitorios.

Aunque existen microorganismos, bacterias, hongos filamentosos y levaduras, capaces de
10 fermentar D-xilosa de forma natural (Jeffries. 2006. Curr. Opin. Biotechnol. 17: 320–326; Hahn-Hägerdal et al. 2007. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74:937–953), la mayoría de los microorganismos prefieren glucosa sobre otros azúcares monoméricos (ej. xilosa) y no asimilan estos últimos hasta que la glucosa es consumida (Gancedo. 1998. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 334-361). La utilización simultánea de glucosa y otros azúcares es raramente
15 observada. Sin embargo, la utilización rápida y simultánea de mezclas de estos azúcares se considera esencial para la viabilidad económica de la producción de biocombustibles u otros productos químicos (ej. aceites) a partir de hidrolizados de biomasa (Rubin. 2008. Nature. 454: 841-845; Huang et al. 2013. Biotechnol. Adv. 31: 129-139). Se han empleado varias estrategias para intentar solventar la represión por glucosa como el control de la tasa de
20 alimentación (Gong *et al.* 2012. Bioresour. Technol. 117: 20-24), reducir la actividad de la hexoquinasa, o mediante la obtención de mutantes resistentes a la 2-deoxiglucosa (Kahar *et al.* 2011. J. Biosc. Bioeng. 5: 557-563).

La capacidad de ciertos microorganismos de acumular grandes cantidades de lípidos es
25 conocida desde años. Estos microorganismos se denominan oleaginosos por similitud con el término empleado con las semillas vegetales y se definen como aquellos capaces de acumular, al menos, un 20% de su peso seco en forma de lípidos (Ratledge y Wynn. 2002. Avd. Appl. Microbiol. 51: 1-51; Ratledge. 2004. Biochemie. 86: 807-815). Entre este tipo de microorganismos se encuentran varios géneros de levaduras como *Yarrowia*, *Candida*,
30 *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, y *Lipomyces*. Varias especies pertenecientes a estos géneros son capaces de acumular hasta un 50-70% de su peso seco en forma de lípidos (Ageitos *et al.* 2011. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90: 1219-1227; Beopoulos *et al.* 2011. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90: 1193-1206). La acumulación de lípidos se produce en presencia de exceso de diferentes fuentes de carbono como glucosa,
35 glicerol, suero lácteo, melazas e, incluso, xilosa en el caso de especies como *Rhodospiridium toruloides* (Freer et al. 1997. Biotechnol. Lett. 19: 1119-1122; Li et al. 2010.

J. Biobased Mat. Bioenergy. 4: 53-57), *Rhodotorula glutinis* (Dai et al. 2007. African J. Biotechnol. 6: 2130-2134), *Trichosporon cutaneum* (Chen et al. 2009. Appl. Biochem. Biotechnol. 159: 276-290) o *Trichosporon fermentans* (Huang et al. Bioresour. Technol. 100: 4535-4538), entre otras.

5

Rhodosporidium toruloides es uno de los organismos oleaginosos con mayor potencial para el desarrollo de procesos industriales debido a su capacidad para crecer hasta altas densidades celulares, fácil escalado y a su capacidad para acumular lípidos mayoritariamente en forma de triglicéridos (WO2009118438; Zhao et al. 2010. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 1: 1-6; Ageitos et al. 2011. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90: 1219-1227).

Sin embargo, *Rhodosporidium toruloides* no es capaz de crecer directamente en hidrolizados de bagazo de caña o de paja de trigo, preparados a partir de un 10% de sólidos (Yu et al. 2011. Bioresour. Technol. 102: 6134-6140; Zhao et al. 2012. Bioprocess Biosyst. Eng., 35: 993-1004), por lo que es necesario llevar a cabo procesos que eliminen estos compuestos tóxicos para lograr producir lípidos. La viabilidad de esta levadura se ve afectada, en diferente grado, por algunos de estos compuestos inhibidores, especialmente por el furfural y sus derivados el alcohol furfural y el ácido furoico (Hu et al. 2009, Bioresour. Technol., 100: 4843-4847).

20

Teniendo todo esto en cuenta, en un contexto industrial, la obtención de un microorganismo robusto, resistente a la acción de estos compuestos inhibidores, capaz de metabolizar xilosa de forma rápida y de acumular una gran cantidad de lípidos, es un prerrequisito indispensable para poder abordar el desarrollo de un proceso de producción de lípidos microbianos a partir de fuentes muy baratas de azúcares como son los hidrolizados de biomasa lignocelulósica.

25

SUMARIO DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han aislado un microorganismo de la cepa *Rhodosporidium toruloides* CECT 13085, que tiene la capacidad de metabolizar eficientemente diferentes fuentes de carbono incluyendo, sin limitación, glucosa, xilosa, glicerina cruda o los azúcares presentes en hidrolizados de biomasa lignocelulósica sin destoxificar, y además de acumular lípidos hasta al menos un 50% del peso seco.

30

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un microorganismo de la cepa *Rhodospiridium toruloides* CECT 13085, o de una cepa mutante de la misma que mantiene la capacidad de acumular lípidos hasta al menos un 50% del peso seco, la capacidad de resistir hidrolizados de biomasa sin detoxificar y/o la capacidad de metabolizar xilosa.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener una biomasa microbiana rica en triglicéridos, que comprende

- i) cultivar un microorganismo según el primer aspecto de la invención en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y al menos una fuente de nitrógeno, en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo, y
- ii) separar la biomasa microbiana del medio de cultivo,

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para extraer los lípidos de la biomasa microbiana según el aspecto anterior, que comprende un método de extracción mecánica o un método de extracción sólido-líquido.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener parafinas, que comprende

- i) obtener una preparación enriquecida en lípidos a partir de la biomasa microbiana de la invención
- ii) refinar dichos lípidos ,
- iii) convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) en parafinas.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener biodiesel, que comprende

- i) obtener una preparación enriquecida en lípidos a partir de la biomasa microbiana de la invención
- ii) refinar dichos lípidos ,
- iii) convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) en biodiesel.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para obtener biolubricantes que comprende:

- i) obtener una preparación enriquecida en lípidos a partir de la biomasa microbiana de la invención

- ii) refinar dichos lípidos ,
- iii) convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) en biolubricantes.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para obtener biosurfactantes que comprende:

- i) obtener una preparación enriquecida en lípidos a partir de la biomasa microbiana de la invención
- ii) refinar dichos lípidos ,
- iii) convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) en biosurfactantes.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo según la invención para obtener una biomasa microbiana rica en triglicéridos según el primer procedimiento de la invención.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo según la invención para extraer los lípidos de la biomasa microbiana según el segundo procedimiento de la invención.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo según la invención para obtener parafinas según el tercer procedimiento de la invención.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo según la invención para obtener biodiesel según el tercer procedimiento de la invención.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo según la invención para obtener biolubricantes según el cuarto procedimiento de la invención.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo según la invención para obtener biosurfactantes según el quinto procedimiento de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Curva de resistencia a los compuestos inhibidores de las cepas de *R. toruloides* 0013-09 (indicado en negro) y 0041-12 (indicado en rojo) cultivadas en medio HB (medio

m/MBO_008_1 conteniendo hidrolizado de paja de trigo, 20% de sólidos) (líneas continuas) y en medio m/MBO_007 (sin hidrolizado) (líneas discontinuas).

Figura 2: Curvas de consumo de los azúcares glucosa (círculos) y xilosa (cuadrados) de las cepas de *R. toruloides* 0041-12 (panel superior), M133 (panel medio) y M709 (panel inferior).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Microorganismo de la invención

10

En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un microorganismo, en adelante "microorganismo de la invención", en donde el microorganismo pertenece a la cepa *Rhodospiridium toruloides* CECT 13085 o a una cepa mutante de la misma que mantiene la capacidad de acumular lípidos hasta al menos un 50% del peso seco, la capacidad de resistir hidrolizados de biomasa sin detoxificar y/o la capacidad de metabolizar xilosa

15

El término "microorganismo" o "microbio", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un organismo microscópico con capacidad de acumular lípidos intracelularmente, que puede ser unicelular o multicelular. En particular, el microorganismo de la invención es una levadura de la especie *Rhodospiridium toruloides*, en concreto, la cepa CECT 13085.

20

El término "cepa", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una variante genética o subtipo de un organismo determinado.

25

El término "cepa mutante", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una cepa resultante de la mutación de una cepa de un organismo determinado y que conserva sustancialmente las propiedades de éste.

30

El microorganismo de la invención se refiere a un mutante de la cepa *Rhodospiridium toruloides* CECT 13085 que conserva sustancialmente la capacidad de la cepa *Rhodospiridium toruloides* CECT 13085 de acumular lípidos hasta al menos un 50% del peso seco, la capacidad de crecer en presencia de hidrolizados de biomasa sin detoxificar y/o la capacidad de metabolizar xilosa.

35

El microorganismo de la invención también se refiere a una cepa mutante de la misma que mantiene la capacidad de acumular lípidos hasta al menos un 50% del peso seco. En una

realización particular, la cepa mutante de la cepa CECT 13085 de *R. toruloides* mantiene la capacidad de acumular lípidos hasta al menos un 50% del peso seco, al menos un 60% del peso seco, al menos un 70% del peso seco, al menos un 80% de peso seco o al menos un 90% del peso seco.

5

Como es conocido por el experto en la materia, la capacidad para acumular lípidos se puede analizar mediante numerosos métodos que están disponibles en la técnica. Estos métodos incluyen, sin limitación, la determinación del contenido total de lípidos por métodos de extracción con disolventes orgánicos (por ejemplo Soxhlet, Goldfish, Mojonier), o también puede cuantificarse por métodos de extracción que no incluyen disolventes (por ejemplo, Babcock, Gerber) y por métodos instrumentales que se basan en propiedades físicas o químicas de los lípidos (por ejemplo, infrarrojo, densidad y absorción de rayos X).

10

El microorganismo de la invención también se refiere a una cepa mutante de la cepa CECT 13085 que mantiene la capacidad de crecer en presencia de hidrolizados de biomasa sin detoxificar.

15

El término “hidrolizado de biomasa”, según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier producto de sacarificación, que contiene los azúcares producidos en el proceso de sacarificación, los restos de biomasa no hidrolizada y las enzimas empleadas para la hidrólisis de dicha biomasa.

20

El término “sacarificación” o “hidrólisis de la biomasa”, según se usa en la presente invención, se refiere a la producción de azúcares fermentables a partir de polisacáridos.

25

El término “azúcar fermentable”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a los oligosacáridos y monosacáridos que pueden ser empleados como fuente de carbono por un microorganismo en el proceso de fermentación para la obtención de productos como etanol.

30

Los términos “biomasa” y “sustrato de biomasa”, tal y como se utilizan en la presente invención, hacen referencia a cualquier material apropiado para su uso en reacciones de sacarificación. Dichos términos incluyen pero no están limitados a materiales que comprenden celulosa (por ejemplo, biomasa celulósica, materia prima celulósica y sustrato celulósico), lignina o la combinación de celulosa y lignina. La biomasa puede derivar de plantas, animales o microorganismos y puede incluir, sin estar limitada, a residuos agrícolas,

35

industriales y forestales, desechos agrícolas y municipales y cultivos terrestres y acuáticos con fines energéticos. Ejemplos de sustratos de biomasa incluyen pero no están limitados a madera, pasta de madera, pasta de papel, fibra de maíz, grano de maíz, mazorcas de maíz, residuos de cosechas como hojas de maíz, rastrojo de maíz, pastos, trigo, paja de trigo, 5 cebada, paja de cebada, heno, arroz, paja de arroz, mijo, residuos de papel, papel, residuos de procesamiento de pulpa, leñosas o herbáceas, pulpa de fruta o verdura, productos de destilado del grano, hierbas, cáscaras de arroz, algodón, cáñamo, lino, sisal, bagazo de caña, sorgo, soja, mijo, componentes obtenidos de la molienda de granos, árboles, ramas, raíces, hojas, virutas de madera, aserrín, arbustos y matas, verduras, frutas y flores y 10 cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la biomasa comprende pero no está limitada a plantas cultivadas (por ejemplo, hierbas, incluyendo gramíneas C4, tales como pasto varilla, hierba espinal, hierba de centeno, *Miscanthus*, hierba cinta o combinaciones de las mismas), residuos de procesamiento del azúcar, por ejemplo pero sin limitarse a, bagazo [por ejemplo, bagazo de caña de azúcar, pulpa de remolacha (por 15 ejemplo remolacha azucarera), o una combinación de las mismas], residuos agrícolas (por ejemplo rastrojo de soja, rastrojo de maíz, fibra de maíz, paja de arroz, azúcar de caña de paja, arroz, cáscaras de arroz, paja de cebada, mazorcas de maíz, paja de trigo, paja de canola, paja de avena, cáscaras de avena, fibra de maíz, cáñamo, lino, sisal, algodón o cualquier combinación de los mismos), pulpa de fruta, pulpa de vegetales, productos de 20 destilado del grano, biomasa forestal (por ejemplo madera, pasta de madera, fibra, fibras de pasta de madera reciclada, serrín, madera dura, tal y como madera de álamo, madera blanda o una combinación de las mismas).

En algunas formas de realización, la biomasa comprende material de desecho celulósico y/o 25 residuos forestales incluyendo pero sin estar limitada a, papel y residuos de procesamiento de pasta de papel, residuos municipales de papel, papel de periódico, cartón y similares. En algunas realizaciones, la biomasa comprende una especie de fibra mientras que en otras realizaciones alternativas, la biomasa comprende una mezcla de fibras que se originan a partir de diferentes biomásas. En algunas realizaciones, la biomasa puede comprender 30 también plantas transgénicas que expresan ligninasa y/o celulasas (ver por ejemplo, el documento US2008/0104724 A1).

El término "biomasa" incluye cualquier material biológico vivo o muerto que contiene polisacáridos como sustratos incluyendo pero sin estar limitado a celulosa, almidón, otras 35 formas de polímeros de carbohidratos de cadena larga y combinaciones de los mismos. Puede o no estar formado completamente a partir de glucosa o xilosa, y opcionalmente,

puede contener otros monómeros de pentosas o hexosas. La xilosa es una aldopentosa que contiene cinco átomos de carbono y un grupo aldehído. Es el azúcar precursor de la hemicelulosa y es a menudo, el componente principal de la biomasa. En algunas realizaciones, el sustrato se pone en suspensión antes del pretratamiento. En algunas realizaciones, la consistencia de la suspensión es de entre aproximadamente 2% y aproximadamente 30% y más típicamente entre aproximadamente 4% y aproximadamente 15%. En algunas realizaciones la suspensión se lava o se trata con ácido antes del pretratamiento. En algunas formas de realización, la suspensión se deshidrata mediante cualquier método adecuado para reducir el consumo de agua y de productos químicos antes del pretratamiento. Ejemplos de dispositivos de deshidratación incluyen, pero no se limitan a prensas de tornillo a presión (véase por ejemplo, el documento WO 2010/022511), filtros presurizados y extrusoras.

Un sustrato de biomasa está “pretratado” cuando ha sido sometido a procedimientos físicos y/o químicos para facilitar la sacarificación. En algunas realizaciones, el sustrato de biomasa es “pretratado” o “tratado” para aumentar la susceptibilidad de dicha biomasa a la hidrólisis de la celulosa mediante el empleo de métodos conocidos en el estado de la técnica (Cuervo *et al.*, Biotecnología, 2008, 13:3), tales como métodos de pretratamiento físico-químicos (por ejemplo, tratamiento con amonio, pretratamiento con ácido diluido, pretratamiento con álcalis diluida, exposición a disolventes, explosión de vapor, molienda, extrusión), métodos de pretratamiento biológico (por ejemplo, la aplicación de microorganismos lignina-solubilizantes) y combinaciones de los mismos.

La molienda consiste en un proceso de trituración de la materia vegetal hasta su reducción a partículas de diferentes tamaños que pueden ser separadas por procedimientos mecánicos.

La extrusión es un procedimiento mediante el cual el material vegetal es forzado a fluir bajo una o más de una variedad de condiciones de mezclado, calentamiento y cizallamiento, a través de una boquilla diseñada para dar forma o expandir los ingredientes. Puede realizarse en frío donde el material se extruye sin expansión o en caliente, donde las macromoléculas de los componentes pierden su estructura nativa discontinua y se forma una masa continua y viscosa que dextriniza y gelatiniza el almidón, se desnaturalizan las proteínas, se inactivan las enzimas responsables de posibles deterioros, se destruyen algunos compuestos no nutricionales y se destruye al carga microbiana.

35

La hidrólisis ácida consiste en tratar el material vegetal con ácidos como ácido sulfúrico o ácido clorhídrico empleando altas temperaturas. Mediante este proceso se favorece la hidrólisis de la celulosa pero requiere una neutralización del pH al finalizar la hidrólisis para permitir el crecimiento posterior de microorganismos.

5

El tratamiento con álcalis consiste en la adición de bases diluidas a la biomasa vegetal. La eficiencia de este procedimiento depende del contenido de lignina de los materiales. El hidróxido de sodio diluido produce un hinchamiento, permitiendo un incremento en el área de superficie interna reduciendo el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, causando la separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos.

10

El tratamiento con disolventes orgánicos consiste en utilizar solventes como el metanol, etanol o acetona para la ruptura de los enlaces de la lignina y la celulosa. La remoción de los solventes del sistema es necesaria, ya que inhiben el crecimiento de los organismos.

15

El tratamiento con líquidos iónicos (por ejemplo, con una disolución de cloruro sódico) favorece la degradación de la celulosa debido a que los átomos de hidrógeno y oxígeno que forman parte de la misma interactúan por separado con el solvente de manera que se produce la ruptura de los enlaces puentes de hidrógeno entre las cadenas de celulosa.

20

El tratamiento con explosión de vapor consiste en tratar la biomasa con vapor saturado a una temperatura de 160-260°C (0,69-4,83 MPa) durante un cierto tiempo que dependerá del tipo de material vegetal de origen.

25

El tratamiento con microorganismos lignina-solubilizantes consiste en tratar a la biomasa con microorganismos que producen enzimas con capacidad de degradar el material lignocelulósico como por ejemplo, *Trichoderma reesei*, *Fusarium oxysporium*, *Piptopus betulinus*, *Penicillium echinalatum*, *Penicillium purpurogenum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Anaeromyces sp.*, *Caecomices sp.*, *Cyllumcyces sp.*, *Neocallimastix sp.*, *Orpinomyces sp.*, *Piromyces sp.*, *Sporotrichum thermophile*, *Scytalidium thermophilu*, *Thermonospora cubata*, *Rhodospirillum rubrum*, *Cellulomonas fimi*, *Clostridium stercorarium*, *Bacillus polymyxa*, *Pyrococcus furiosus*, *Acidothermus cellulotycus*, *Saccharophagus degradans*, etc.

30

35

El término “hidrolizado de biomasa sin detoxificar”, según se usa en la presente invención, se refiere al hidrolizado que contiene todos los productos de degradación que se generan

durante el proceso de hidrólisis de la biomasa y que, en general, son productos del tipo ácidos carboxílicos, (en particular ácidos acético, fórmico y levulínico) derivados del furano (en particular furfural y el 5-hidroximetilfurfural) y compuestos fenólicos (en particular alcoholes, aldehídos, cetonas y ácidos y, más en particular, ácido cumárico, ácido succínico, ácido 4-hidroxibenzoico, catecol, guaicol, ácido siríngico, ácido ferúlico, 4-hidroxibenzaldehído, vanillina, ácido vainílico, siringaldehído) y combinaciones de los mismos.

El término “capacidad de crecer en hidrolizado de biomasa sin detoxificar”, según se usa en la presente invención, se refiere a que la cepa es capaz de crecer en un medio que contiene hidrolizado de biomasa sin detoxificar hasta concentraciones superiores a las que de la cepa parental de *R. toruloides* 0041-12 en las mismas condiciones. En una forma preferida de realización, la cepa de acuerdo a la invención es capaz de crecer en cultivos a pequeña escala hasta una densidad óptica medida a 600 nm de al menos 50 y/o a una densidad de biomasa de 16 g/l de biomasa. Así, las cepas mutantes de la invención son capaces de crecer hasta concentraciones celulares superiores en al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 100% o más de las concentraciones celulares que se obtendrían en el mismo medio y a la mismas condiciones a partir de la cepa parental 0041-12. En una forma preferida de realización, el medio de cultivo en el que se determina la capacidad de crecimiento contiene al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70% o más de hidrolizado de biomasa sin detoxificar.

Métodos adecuados para determinar la capacidad de una cepa de crecer en presencia de hidrolizados de biomasa sin detoxificar incluyen, por ejemplo, el método descrito en el ejemplo 2 de la presente invención basado en la capacidad de la cepa de crecer en el medio de cultivo m/MBO_008_1, que comprende 9,6 g/l de líquido de macerado de maíz y 20-100 g/l de azúcares; pH 6).

El microorganismo de la invención se refiere a un mutante de la cepa *Rhodospiridium toruloides* CECT 13085 que conserva sustancialmente la capacidad de metabolizar xilosa. La expresión “capacidad de metabolizar xilosa”, según se usa en la presente invención, se refiere a la capacidad del microorganismos de crecer en presencia de xilosa como única fuente de carbono. En una forma preferida de realización, la cepa es capaz de crecer en presencia de 20 g/l de xilosa. En otra forma preferida de realización, la cepa es capaz de

crecer en presencia de 40 g/l de xilosa. En una forma preferida de realización, el microorganismo de acuerdo a la presente invención es capaz de crecer al menos un 10%, al menos un 20%, 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% o más con respecto a la cepa
5 *Rhodosporidium toruloides* de la que deriva.

Métodos adecuados para determinar la capacidad de un microorganismo para metabolizar xilosa incluyen, por ejemplo, el método descrito en el ejemplo 3 de la presente invención, basado en la capacidad de la cepa de crecer en medios de cultivo en donde la xilosa es la
10 única fuente de carbono disponible. En una forma preferida de realización, la cepa de acuerdo a la invención es capaz de crecer en un medio de cultivo que contiene xilosa como única fuente de carbono a una concentración de al menos 20 g/l o al menos 40 g/l.

La cepa CECT 13085 de *R. toruloides* tiene la capacidad de metabolizar otras fuentes de carbono distintas a la xilosa incluyendo, sin limitación, glucosa, glicerina cruda o los
15 azúcares presentes en hidrolizados de biomasa lignocelulósica.

El término "biomasa lignocelulósica", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a se refiere a una composición que comprende tanto la lignina y celulosa. En algunas
20 realizaciones, el material lignocelulósico también puede comprender almidón. "Lignina" es un material polifenólico. Las ligninas pueden ser altamente ramificadas y puede estar también reticuladas. Las ligninas pueden tener una variación significativa estructural que depende, al menos en parte, en la fuente de la planta en cuestión. Los materiales lignocelulósicos incluyen una variedad de plantas y materiales vegetales, tales como, sin
25 limitación, los lodos de fabricación de papel, la madera, y materiales relacionados con la madera, por ejemplo, polvo de sierra, o tableros de partículas, hojas o árboles como los álamos, las hierbas, como el mijo enteros; sembrar maíz, sorgo, pasto Sudán, recortes de césped, cáscara de arroz, bagazo (por ejemplo, la caña de azúcar bagazo), yute, cáñamo, lino, bambú, sisal, abacá, heno, paja, mazorcas de maíz, maíz y rastrojo de sorgo, y el pelo
30 de coco.

Procedimiento para obtener una biomasa microbiana rica en triglicéridos

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener una
35 biomasa microbiana rica en triglicéridos, en adelante "primer procedimiento de la invención", que comprende

- i) cultivar el microorganismo de la invención en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y al menos una fuente de nitrógeno, en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo, y
- 5 ii) separar la biomasa microbiana del medio de cultivo,

El término "biomasa microbiana", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere al material biológico de organismos vivos o recientemente vivos, en particular del microorganismo de la invención, y a la materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía. Como una fuente de energía renovable, la biomasa puede ser utilizada directa o indirectamente, previa conversión en otro tipo de producto tal como biocombustible. En el caso particular de la presente invención, la biomasa microbiana es rica en triglicéridos. El término "biomasa microbiana rica en triglicéridos", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una biomasa microbiana con un contenido de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70% o al menos el 80% de su peso seco total.

En una primera etapa, el primer procedimiento de la invención comprende cultivar el microorganismo de la invención en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y al menos una fuente de nitrógeno, en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo.

El término "cultivar", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere al procedimiento de sembrar, mantener y hacer que se desarrollen microorganismos sobre medios de cultivo adecuados.

El término "medio de cultivo", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un medio líquido, semisólido o sólido que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH, temperatura y oxigenación, el crecimiento de microorganismos. En una forma de realización particular, el medio de cultivo es un medio líquido. Medios de cultivo adecuados para cultivar microorganismos son ampliamente conocidos en la materia, como por ejemplo Maniatis et al. (1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY) y Madigan & Martinko (2005, Brock Biology of Microorganisms, 11th ed.). Entre otros nutrientes, el medio de cultivo comprende una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno. Ejemplos no limitativos de medios de cultivo adecuados para llevar a cabo el primer procedimiento de la invención incluyen medio

MEM, medio YPD, m/MBO_007 (glucosa 60 g/l; xilosa 40 g/l; líquido macerado de maíz 9,6 g/l; pH 6), m/MBO_008 (hidrolizado de biomasa lignocelulósica hasta una concentración de azúcares de 20 g/l; líquido macerado de maíz 9,6 g/l; pH 6), m/MBO_008_1 (composición: líquido macerado de maíz 9,6 g/l; 70 g azúcares/l de hidrolizado de paja de trigo; pH 6);
5 medio m/MBO_008_2 (composición: líquido macerado de maíz 9,6 g/l, 70 g azúcares/L de hidrolizado bagazo de caña, pH 6), o de medio m/MBO_008_3 (composición: líquido macerado de maíz 9,6 g/l, 70 g azúcares/L de hidrolizado de racimos vacíos de palma aceitera, pH 6). m/MBO2_003 (glucosa 10 g/l; xilosa 10 g/l; líquido macerado de maíz 9,6 g/l; pH 6), m/MBO_002 (en g/l: NH_4NO_3 1, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,4; KH_2PO_4 0,76; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,4;
10 xilosa 20; agar 20; pH 6)

En una realización particular, la fuente de carbono es un hidrolizado de biomasa lignocelulósica. Los términos “hidrolizado de biomasa”, “biomasa” y “lignocelulósica” han sido definidos previamente en el contexto del microorganismo de la invención.

15 Como el experto en la materia entenderá, el hidrolizado de biomasa lignocelulósica puede obtenerse de diferentes orígenes vegetales o subproductos de los mismos. El término “subproducto”, tal y como se utiliza en la presente invención, hace referencia al producto resultante de someter a dicho vegetal a procedimientos físico y/o químicos. En una
20 realización particular, el medio de cultivo comprende como fuente de carbono un hidrolizado de biomasa lignocelulósica que se obtiene a partir de paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, racimos vacíos de palma aceitera, poda de palma aceitera, fibra de palma aceitera, poda de vid, poda de olivo y combinaciones de las mismas. En una realización preferida, dicho hidrolizado procede de paja de trigo. En otra realización preferida, dicho hidrolizado
25 procede de bagazo de caña. En otra realización preferida, dicho hidrolizado procede de racimos vacíos de palma aceitera.

Preferiblemente, dichas combinaciones de hidrolizados mencionadas anteriormente tienen al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40% de
30 biomasa lignocelulósica hidrolizada.

En otra realización particular, la fuente de carbono empleada para el cultivo del microorganismo de la invención procede de una mezcla de un hidrolizado de biomasa lignocelulósica y glicerol. Como entenderá el experto en la materia, la proporción de
35 hidrolizado y glicerol podrá variar para que las condiciones de crecimiento y de producción lipídica del microorganismo de la invención sean óptimas. Así, preferiblemente la relación de

hidrolizado de biomasa:glicerina es 60:40; más preferiblemente, la relación de hidrolizado de biomasa:glicerina es 70:30; y aún más preferiblemente la relación de hidrolizado de biomasa:glicerina es 75:25.

5 En otra realización particular, la fuente de carbono se selecciona del grupo que consiste en glucosa, glicerol, glicerina, melazas, xilosa, arabinosa, manosa, fructosa, acetato, almidones y combinaciones de las mismas. En una realización preferida, la fuente de carbono es glucosa. En otra realización preferida, la fuente de carbono es xilosa. En una realización más preferida, la concentración de xilosa en el medio de cultivo es de 20 g/l. En otra
10 realización más preferida, la concentración de xilosa en el medio es de 40 g/l.

En otra realización particular, la fuente de la fuente de nitrógeno se selecciona del grupo que consiste en extracto de levadura, peptona, líquido macerado de maíz, urea, glutamato
15 sódico, diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico, como sales de amonio y combinaciones de las mismas. En una realización preferida, la fuente de nitrógeno es una sal de amonio, preferiblemente cloruro de amonio.

En otra realización particular, el medio de cultivo comprende inhibidores sólidos. El término
20 “inhibidores sólidos”, tal y como se utiliza en la presente invención, hace referencia a compuestos que inhiben el metabolismo microbiano y afectan negativamente al crecimiento del organismo. En una forma de realización más particular, dichos inhibidores sólidos proceden de la degradación de la biomasa sin detoxificar (por ejemplo, proceden de la degradación de la lignocelulosa) y se seleccionan del grupo formado por ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido succínico, 4-
25 hidroxibenzaldehído, vanillina, ácido vanílico, siringaldehído, ácido 4-hidroxibenzoico, catecol, guaicol, ácido siríngico, furfural, 5-hidroxi metilfurfural y combinaciones de los mismos.

Métodos adecuados para determinar la capacidad de una cepa de *R. toruloides* de crecer en
30 presencia de inhibidores sólidos procedentes de hidrolizados de biomasa sin detoxificar incluyen, por ejemplo, métodos que permiten determinar la adaptación del microorganismo a un medio de cultivo en el que se incrementa progresivamente la concentración de inhibidores tal y como el método mostrado en el ejemplo 2 de la presente invención.

35 Normalmente, se puede someter al cultivo de microorganismos a un estrés metabólico, de forma que produzcan y acumulen intracelularmente grandes cantidades de lípidos. El estrés

metabólico se puede inducir por un exceso de fuente de carbono en relación con la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo. La acumulación de triglicéridos se produce cuando una fuente de carbono se encuentra en exceso y la fuente de nitrógeno limita el crecimiento. Bajo estas condiciones de crecimiento, las células utilizan la fuente de carbono para la síntesis de lípidos neutros.

Los métodos para el cultivo de microorganismos son estándares en la técnica y son ampliamente conocidos por el experto en la materia. El cultivo puede llevarse a cabo en matraces o biorreactores hasta alcanzar un contenido en triglicéridos elevado, típicamente igual o superior al 50% en peso seco. La duración del cultivo es variable, aunque típicamente el cultivo se realiza durante de 3 a 7 días.

El término “condiciones adecuadas para el crecimiento del microorganismo de la invención”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a condiciones que soportan el crecimiento del microorganismo de la invención. Tales condiciones pueden incluir pH, nutrientes, temperatura, humedad, oxigenación, ambiente y otros factores.

En una realización particular, las condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo de la etapa i) comprenden

- una temperatura en un rango entre 18 °C y 37 °C, preferentemente entre 23 °C y 32 °C, más preferentemente entre 28 °C y 30°C,
- una concentración de oxígeno disuelto de al menos el 20%, y/o
- agitación constante.

Las condiciones en las que se lleva a cabo el cultivo del microorganismo de la invención pueden ajustarse para aumentar el porcentaje de triglicéridos por unidad de peso seco en la biomasa microbiana resultante. Por ejemplo, es posible cultivar el microorganismo en presencia de concentraciones limitantes de algún nutriente, como por ejemplo, nitrógeno, fósforo o azufre a la vez que se mantiene un exceso de la fuente carbono. La limitación de la fuente de nitrógeno permite aumentar el rendimiento en lípidos de la biomasa por unidad de peso seco. El microorganismo se puede cultivar en condiciones limitantes de alguno de los nutrientes durante todo el tiempo de cultivo o se puede cultivar alternando ciclos de cultivo en concentraciones limitantes y ciclos de cultivo sin concentraciones limitantes.

El cultivo de acuerdo al primer procedimiento de la invención se lleva a cabo hasta que se ha alcanzado la cantidad de biomasa deseada y/o hasta que la biomasa contiene la cantidad

intracelular de triglicéridos deseada. El experto entenderá que es posible llevar a cabo una monitorización del cultivo para determinar la cantidad de biomasa alcanzada a lo largo del tiempo (por ejemplo, mediante la determinación de la densidad óptica a 600 nm o mediante la determinación del peso sólido por unidad de volumen de cultivo). El experto entenderá que es posible llevar a cabo una monitorización del cultivo para determinar el porcentaje de lípidos que se acumulan en la biomasa a lo largo del tiempo (por ejemplo, mediante la determinación de la cantidad de lípidos por unidad de masa en el cultivo usando cualquiera de los métodos anteriormente mencionados).

Una vez alcanzada la cantidad de biomasa deseada y/o la cantidad intracelular de triglicéridos deseada, en una segunda etapa, el primer procedimiento de la invención comprende separar la biomasa microbiana del medio de cultivo. Las células se recogen mediante alguno de los procedimientos habitualmente utilizados para este fin, tales como, centrifugación, filtración, decantación, flotación o sedimentación, adicionalmente ayudados por floculación o evaporación para eliminar parte o la totalidad del agua o del medio de la fracción acuosa del medio de cultivo.

En una realización particular, la segunda etapa del primer procedimiento de la invención se realiza mediante un método seleccionado del grupo que consiste en filtración, microfiltración, centrifugación, presión, decantamiento y combinaciones de los mismos.

En una realización particular, el procedimiento de la invención comprende además secar la biomasa microbiana obtenida en la segunda etapa.

Biomasa microbiana

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a la biomasa microbiana rica en triglicéridos obtenible según el primer procedimiento de la invención, en adelante "biomasa microbiana de la invención". El término "biomasa microbiana" se ha descrito con anterioridad y es de aplicación en el presente aspecto.

La biomasa microbiana generada de acuerdo al primer método de la invención comprende no solo los microorganismos sino también todos aquellos componentes del cultivo generados por los microorganismos o que se han incorporado a los microorganismos a partir del cultivo durante su crecimiento y proliferación, tales como ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos o lípidos. La biomasa microbiana de acuerdo a la invención comprende

microorganismos de la cepa *Rhodospiridium toruloides* CECT 13085 o de una cepa mutante de la misma, que mantiene la capacidad de acumular lípidos hasta al menos un 50% del peso seco, la capacidad de crecer en presencia de hidrolizados de biomasa sin detoxificar y/o la capacidad de metabolizar xilosa. En una realización particular, la biomasa
5 rica en triglicéridos contiene una cantidad del microorganismo de la invención de al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o superior respecto al resto de microorganismos presentes en el cultivo.

En una realización particular, la biomasa rica en triglicéridos tiene un contenido en
10 triglicéridos al menos el 50% del peso seco, al menos el 60% del peso seco, al menos el 70% del peso seco, o al menos el 80% del peso seco.

Procedimiento para extraer los lípidos de la biomasa microbiana

15 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para extraer los lípidos de la biomasa microbiana de la invención, en adelante "segundo procedimiento de la invención".

Los microorganismos que acumulan lípidos y que forman parte de la biomasa microbiana de
20 acuerdo la presente invención se puede lisar para producir un lisado, que se usa como material de partida para la extracción de lípidos., La etapa de lisis se puede llevar a cabo usando cualquier método conocido para un experto, como por ejemplo, lisis por calor, lisis en medio básico, lisis en medio ácido, lisis enzimática usando enzimas tales como proteasas o enzimas que degradan polisacáridos (amilasas), lisis mediante ultrasonidos, lisis
25 mecánica, lisis mediante choque osmótico, Estos métodos se pueden llevar a cabo de forma individual o combinada y, en caso de uso combinado, se pueden llevar a cabo de forma simultánea o secuencial. El grado de rotura celular se puede determinar mediante análisis microscópico.

30 Preferiblemente, la etapa de lisis requiere de la rotura de al menos en torno a un 70% de las células, al menos en torno a un 80% de las células, al menos en torno a un 90% de las células o, preferiblemente, al menos en torno a un 100% de las células.

Métodos adecuados para separar lípidos de los lisados celulares incluyen cualquier método
35 de extracción mecánico químico y, dentro de estos, cualquier método de extracción sólido-líquido. Métodos adecuados incluyen, la extracción en presencia de solventes orgánicos,

que permite la expresión de lípidos y derivados lipídicos tales como aldehídos y alcoholes de ácidos grasos (Frenz et al. 1989, Enzyme Microb. Technol., 11:717), licuefacción (Sawayama et al. 1999, Biomass and Bioenergy 17:33-39 and Inoue et al. 1993, Biomass Bioenergy 6(4):269-274); licuefacción en aceite (Minowa et al. 1995, Fuel 74(12):1735-1738), extracción con CO₂ supercrítico.

El término "biomasa microbiana" se ha descrito en detalle en el contexto del primer procedimiento de la invención, y su definición y sus detalles se aplican igualmente al segundo procedimiento de la invención

10

Los métodos para extraer y determinar la cantidad de lípidos empleados en relación con el microorganismo de la invención se pueden aplicar igualmente en relación con el segundo método de la invención. De esta manera, en una realización particular, el método de extracción mecánica se realiza usando prensa de tornillo, prensa francesa o molino de bolas.

15

Por otra parte, la extracción de los lípidos de la biomasa microbiana también se puede llevar a cabo aprovechando diferencias de solubilidad de los mismos en un determinado disolvente. En el caso favorable de una mezcla de sólidos en la cual uno de los compuestos es soluble en un determinado disolvente (normalmente un disolvente orgánico), mientras que los otros son insolubles, se puede realizar una extracción consistente en añadir este disolvente a la mezcla contenida en un vaso de precipitados, un matraz o una cápsula de porcelana, en frío o en caliente, agitar o triturar con ayuda de una varilla de vidrio y separar por filtración la disolución que contiene el producto extraído y la fracción insoluble. La extracción sólido-líquido suele ser mucho más eficiente cuando se hace de manera continua con el disolvente de extracción caliente en un sistema cerrado, utilizando una metodología similar a la explicada anteriormente, basada en la maceración con disolvente orgánico de la mezcla sólida a extraer, previa al vaporizado en un matraz y condensado en un refrigerante. El paso del disolvente orgánico con parte del producto extraído al matraz inicial, permite que el mismo disolvente orgánico vuelva a ser vaporizado, repitiendo un nuevo ciclo de extracción, mientras que el producto extraído, no volátil, se concentra en el matraz.

20

25

Así, en otra realización particular, el método de extracción sólido-líquido se realiza usando un disolvente orgánico inmiscible en agua. El término "disolvente orgánico", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una sustancia que disuelve un soluto cuyas moléculas contienen átomos de carbono. El término "disolvente orgánico inmiscible en

30

agua”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un disolvente orgánico con poca o ninguna capacidad para mezclarse con el agua. Ejemplos no limitativos de disolventes orgánicos inmiscibles en agua incluyen n-hexano, acetona, éter de petróleo y éter-etílico. Así, en una realización preferida, dicho disolvente orgánico inmiscible en agua se selecciona del grupo que consiste en n-hexano, acetona, éter de petróleo, éter-etílico y combinaciones de los mismos. En una realización aún más preferida, dicho disolvente orgánico inmiscible en agua es n-hexano.

La extracción sólido-líquido suele ser mucho más eficiente cuando se hace de manera continua con el disolvente de extracción caliente en un sistema cerrado, utilizando una metodología similar a la comentada para la extracción líquido-líquido continua, basada en la maceración con disolvente orgánico, previamente vaporizado en un matraz y condensado en un refrigerante, de la mezcla sólida a extraer contenida dentro de un cartucho o bolsa de celulosa que se coloca en la cámara de extracción. El paso del disolvente orgánico con parte del producto extraído al matraz inicial, permite que el mismo disolvente orgánico vuelva a ser vaporizado, repitiendo un nuevo ciclo de extracción, mientras que el producto extraído, no volátil, se va concentrando en el matraz.

Procedimiento para obtener productos de interés industrial a partir de la biomasa rica en lípidos de acuerdo a la invención

Los lípidos obtenidos a partir de la biomasa microbiana de acuerdo a la presente invención pueden ser procesados químicamente para dar lugar a productos de interés en la industria. Ejemplos de métodos de modificación química que pueden ser aplicados a los lípidos de acuerdo a la invención incluyen hidrólisis de los lípidos, hidroprocesamiento de los lípidos y esterificación de los lípidos. Otras modificaciones químicas incluyen, sin limitación, epoxidación, oxidación, hidrólisis, sulfatación, sulfonación, etoxilación, propoxilación, amidación y saponificación. La modificación de los lípidos de acuerdo a la presente invención permite generar productos que pueden ser modificados adicionalmente para dar lugar a compuestos de interés, tales como jabones, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, compuestos de nitrógeno grasos, ésteres metílicos de ácidos grasos y glicerol. Ejemplos de productos oleoquímicos derivados incluyen, pero no se limitan a, nitrilos grasos, ésteres, ácidos dímeros, compuestos cuaternarios, tensioactivos, alcanolamidas grasos, sulfatos de alcoholes grasos, resinas, emulsionantes, alcoholes grasos, olefinas, lodos de perforación, polioles, poliuretanos, poliácridatos, goma, velas, cosméticos, jabones, jabones metálicos, ésteres de metilo alfa-sulfonados, sulfatos de

alcoholes grasos, etoxilatos de alcoholes grasos, sulfatos de éteres de alcoholes grasos, imidazolinas, agentes tensioactivos, detergentes, ésteres, compuestos cuaternarios, productos de ozonolisis, aminas grasas, alcanolamidas grasas, sulfatos de etoxi, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos (incluyendo triglicéridos de cadena media), lubricantes, fluidos hidráulicos, grasas, fluidos dieléctricos, agentes de liberación del molde, fluidos para trabajo de metales, fluidos de transferencia de calor, otros fluidos funcionales, productos químicos industriales (por ejemplo, productos de limpieza, auxiliares de tratamiento de los textiles, plastificantes, estabilizantes, aditivos), superficie revestimientos, pinturas y lacas, aislamiento del cableado eléctrico, y alcanos superiores.

10

Procedimiento para obtener parafinas

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener parafinas a partir de los lípidos obtenidos en el segundo procedimiento de la invención, en adelante "tercer procedimiento de la invención", que comprende

15

- i) obtener una preparación enriquecida en lípidos a partir de la biomasa microbiana de la invención
- ii) refinar los lípidos obtenidos en la etapa i) y
- iii) convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) en parafinas.

20

El término "parafina", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un grupo de hidrocarburos alcanos de fórmula general C_nH_{2n+2} , donde n es el número de átomos de carbono. La molécula simple de la parafina proviene del metano, CH_4 , un gas a temperatura ambiente; en cambio, los miembros más pesados de la serie, como el octano C_8H_{18} , se presentan como líquidos. Las formas sólidas de parafina, llamadas cera de parafina, provienen de las moléculas más pesadas C_{20} a C_{40} . Ejemplos no limitativos de parafinas incluyen queroseno, diésel, biofuel o biocombustible, cera de parafina, nuyol, aceite de adepsina, albolin, glimol, parafina medicinal, saxol y aceite mineral de USP.

25

El término "biofuel" o "biocombustible", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un combustible que se deriva de la biomasa, tal como residuos animales, de plantas o microbianos. Los biocombustibles incluyen, pero no se limitan a, biodiésel, bioqueroseno, biohidrógeno, biogás, biomasa derivada de dimetilfurano (DMF), y similares. El término "biocombustibles" también se utiliza para referirse a mezclas de combustible que comprenden derivados de la biomasa combustibles, tales como mezclas de alcohol / gasolina (es decir, gasohols).

35

En una realización preferida del tercer método de la invención, la parafina es diésel renovable . En otra realización preferida, la parafina es bioqueroseno.

5 En una primera etapa, el tercer procedimiento de la invención comprende obtener una preparación enriquecida en lípidos según el procedimiento del segundo aspecto de la invención.

10 En una segunda etapa, el tercer procedimiento de la invención comprende refinar los lípidos obtenidos a partir de la primera etapa de dicho método.

15 El término “refinación” o “refino”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere al proceso de purificación de una sustancia química obtenida muchas veces a partir de un recurso natural. Numerosos métodos son conocidos en el estado de la técnica para la refinación de sustancias. Por ejemplo, la refinación de líquidos se logra a menudo a través de la destilación o fraccionamiento. Un gas se puede refinar también de esta manera enfriándolo o comprimiéndolo hasta su licuefacción. Los gases y líquidos también se pueden refinar por extracción con un solvente que disuelva la sustancia de interés o bien las impurezas.

20 Así, en una realización particular, los lípidos obtenidos en el segundo procedimiento de la invención se refinan mediante al menos un lavado con NaOH a una concentración entre 5% y 15%. El proceso de refinación comprende al menos un lavado con NaOH, al menos dos lavados con NaOH, al menos tres lavados con NaOH, al menos cuatro lavados con NaOH, 25 al menos cinco lavados con NaOH, al menos diez lavados con NaOH o más. En una realización preferida, la concentración de NaOH es de entre 8% y 12%. En una realización más preferida, la concentración de NaOH es de 10%.

30 En una tercera etapa, el tercer procedimiento de la invención comprende convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) en parafinas.

En una realización particular, la etapa ii) del tercer método de la invención comprende un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en hidrotratamiento o hidroprocesamiento

35

El experto en la materia entenderá que existen en la técnica numerosos procedimientos para convertir lípidos en parafinas que incluyen, sin limitación, procedimientos de hidrotratamiento o hidroprocesamiento (EP1682466, EP1795576, EP1681337, EP1640437).

5 El término “hidrotratamiento” o “hidroprocesamiento”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a reacciones de hidrogenación, habitualmente catalíticas, que son ampliamente usadas sobre fracciones de petróleo como nafta, keroseno y diesel, así como fracciones de lípidos, bajo presión y temperatura elevadas. En el caso particular de la presente invención, el hidroprocesamiento se efectúa sobre la mezcla de lípidos obtenida
10 del segundo procedimiento de la invención.

El hidroprocesamiento es necesario para eliminar los contaminantes como los metales de azufre, nitrógeno y metales pesados de aceites combustibles. De esta manera, los hidrocarburos oxigenados reemplazan sus átomos de oxígeno por átomos de hidrógeno, y
15 los átomos de oxígeno que salen se combinan con moléculas de hidrógeno formando agua. Los hidrocarburos nitrogenados reemplazan sus átomos de nitrógeno por átomos de hidrógeno, y los átomos de nitrógeno que salen se combinan con moléculas de hidrógeno formando amoníaco. Finalmente los hidrocarburos que contienen azufre reemplazan sus átomos de azufre por átomos de hidrógeno, y los átomos de azufre que salen se combinan
20 con moléculas de hidrógeno formando sulfuro de hidrógeno. Una vez realizado el procedimiento de hidroprocesamiento, se separan las parafinas del resto de las sustancias y se someten a otros tratamientos hasta conseguir las características deseadas.

El término “catálisis”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere al aumento de
25 la velocidad de una reacción química debido a la participación de una sustancia denominada catalizador. A diferencia de otros reactivos en la reacción química, un catalizador no se consume. Un catalizador puede participar en múltiples transformaciones químicas. El efecto de un catalizador puede variar debido a la presencia de otras sustancias conocidas como inhibidores o venenos (que reducen la actividad catalítica) o promotores (que aumentan la actividad). En el contexto de la presente invención, los principales catalizadores útiles en
30 hidroprocesamiento se basan en disulfuro de molibdeno (MoS_2) junto con cantidades menores de otros metales. La mayoría de los metales catalizan el hidroprocesamiento, pero aquellos en el medio de la serie de transición de un metal son más activos. El disulfuro de rutenio parece ser el catalizador más activo, pero las combinaciones binarias de cobalto y el
35 molibdeno son también altamente activas. Aparte de la base de cobalto modificado con

catalizador MoS₂, también se utilizan níquel y tungsteno. Por ejemplo, los catalizadores de Ni-W son más eficaces para hidrodeshidrogenación.

Otro método de hidrotreatmento comprende poner en contacto los lípidos refinados con agua, aplicar una temperatura y presión elevadas, y separar la fase orgánica del agua. Otro método de hidrotreatmento comprende hidrogenar la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa, y además desoxigenar dicha mezcla de lípidos refinados.

En una realización preferida, el método de hidrotreatmento comprende

- 10
- poner en contacto la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) con agua,
 - aplicar una temperatura y presión elevadas, y
 - separar la fase orgánica del agua.

15 En esta realización, el hidrotreatmento se lleva a cabo en fase líquida, a una temperatura elevada, de 100 a 400 °C, preferiblemente 250 a 350 °C. La reacción puede llevarse a cabo a presión atmosférica. Sin embargo, con el objetivo de mantener los reactivos en la fase líquida, es preferible utilizar una presión mayor que la presión de saturación de vapor y, por lo tanto, los intervalos de presión de reacción tienen un rango desde la presión atmosférica hasta 20 MPa, preferiblemente de 0,1 a 5 MPa.

Una vez finalizada la reacción, la fase orgánica se separa del agua obteniéndose como producto un destilado con la composición de un diésel renovable.

En otra realización preferida, el método de hidrotreatmento comprende

- 25
- hidrogenar la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii), y
 - desoxigenar dicha mezcla de lípidos refinados.

En una realización más preferida, el método de hidrotreatmento se lleva a cabo a temperatura y presión elevadas.

30 El término “desoxigenación”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una reacción química que implica la eliminación de oxígeno molecular (O₂) a partir de una mezcla de reacción o disolvente, o la eliminación de los átomos de oxígeno de una molécula. Ejemplos no limitativos de reacciones de desoxigenación incluyen la sustitución de un grupo hidroxilo por hidrógeno en la desoxigenación de Barton-McCombie o en la

35

desoxigenación Markó-Lam, y la sustitución de un grupo oxo por dos átomos de hidrógeno en la reducción de Wolff-Kishner.

5 Por ejemplo, los lípidos y opcionalmente un disolvente o una mezcla de disolventes se ponen en contacto con un catalizador heterogéneo de descarboxilación seleccionado a partir de catalizadores que contienen uno o más metales del grupo VIII y/o VIA del sistema periódico. Preferiblemente, los catalizadores son catalizadores de Pd, Pt, Ni, NiMo o CoMo, la sobre un soporte de alúmina, sílice y/o carbono. Se puede usar hidrógeno opcionalmente. Las condiciones de reacción de descarboxilación varían con la materia prima utilizada. La
10 reacción se lleva a cabo en fase líquida, a una temperatura elevada, de 100 a 400 °C, preferiblemente 250 a 350 °C. La reacción puede llevarse a cabo a presión atmosférica. Sin embargo, con el objetivo de mantener los reactivos en la fase líquida, es preferible utilizar una presión mayor que la presión de saturación de vapor y, por lo tanto, los intervalos de presión de reacción tienen un rango desde la presión atmosférica hasta 150 MPa,
15 preferiblemente de 0,1 a 5 MPa.

En una realización preferida, la hidrogenación y desoxigenación de dicha mezcla de lípidos refinados se realiza en la misma etapa. En otra realización preferida, la hidrogenación y desoxigenación de dicha mezcla de lípidos refinados se realiza en etapas consecutivas.

20

El producto que se obtiene una vez finalizada la reacción es un diésel renovable.

En otra realización particular, el tercer procedimiento de la invención comprende adicionalmente un proceso de craqueo catalítico en condiciones adecuadas para convertir
25 las parafinas obtenidas en la etapa iii) en bioqueroseno.

El término "craqueo catalítico" o "cracking catalítico", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a la ruptura de un alcano de cadena larga en otros alcanos y alquenos de cadena corta más útiles, es decir, el proceso de ruptura de hidrocarburos de cadena
30 larga en hidrocarburos de cadena corta. Se trata de un proceso de descomposición termal en presencia de un catalizador de los componentes de las parafinas obtenidas mediante los procesos de hidrotratamiento, con el propósito de craquear hidrocarburos de cadena larga cuyo punto de ebullición es igual o superior a los 315 °C, y convertirlos en hidrocarburos de cadena corta cuyo punto de ebullición se encuentra por debajo de los 221 °C. Dichos
35 catalizadores se presentan en forma granular o microesférica. Los catalizadores usualmente

se componen por óxido de silicio (SiO_2) y alúmina (Al_2O_3). El mineral más comúnmente usado para este fin es la faujasita.

En una realización preferida, dicho craqueo catalítico emplea un catalizador sólido.

5

El término “catalizador sólido” tal y como se usa aquí se refiere a una sustancia química, sólida, simple o compuesta, que modifica la velocidad de una reacción química, interviniendo en ella pero sin llegar a formar parte de los productos resultantes de la misma. La mayoría de los catalizadores sólidos son los metales o los óxidos, sulfuros y haloideos de elementos metálicos y de semimetálicos como los elementos boro aluminio, y silicio. Los catalizadores sólidos pueden prepararse mediante precipitación-deposición, que consiste en depositar un hidróxido mediante la precipitación de una sal soluble del metal sobre el soporte. En este caso la precipitación se realiza principalmente por modificación del pH de la disolución. El método más empleado debido a su sencillez es la impregnación, que consiste en añadir el soporte a una disolución, con el contenido de fase activa deseado, y eliminar el disolvente por evaporación. En una realización más preferida, dicho catalizador sólido se selecciona del grupo que consiste en catalizadores que consisten en sistemas bifuncionales de hidrogenación-deshidrogenación metálicos (por ejemplo, Co-Mo o Pd-Pt) y componentes ácidos para craqueo (por ejemplo, Al_2O_3 , SiO_2 , y también en forma de zeolitas) en presencia de hidrógeno.

10
15
20

Procedimiento para obtener biodiesel

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener biodiesel a partir de los lípidos obtenidos en el segundo procedimiento de la invención, en adelante “cuarto procedimiento de la invención”, que comprende

25

- i) obtener una preparación enriquecida en lípidos a partir de la biomasa microbiana de la invención
- ii) refinar los lípidos obtenidos en la etapa i) y
- iii) convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) en biodiesel

30

El término “biodiesel”, según se usa en la presente invención, se refiere a una composición química compuesta fundamentalmente por ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga. Los ésteres que forman parte del biodiesel son ésteres metilo, etilo o propilo y los ácidos grasos son los que proceden de la composición lipídica de acuerdo a la presente invención. En formas preferidas de realización, el biodiesel de acuerdo a la presente

35

invención comprende uno o varios de los siguiente ésteres de alquílicos de ácidos grasos: esterres metílicos de ácidos grasos (FAME o fatty acid methyl ester), esterres etílicos de ácidos grasos (FAEE o fatty acid ethyl esters), ésteres butílicos de ácidos grasos (FABE o fatty acid butyl esters). En formas particulares de realización, el biodiesel puede contener uno o varios ácidos grasos seleccionados de miristato, palmitato, estearato, oleato, linolenato, araquidate y behenato. En una forma preferida de la invención, el biodiesel es un combustible que está compuesto en su totalidad por esterres de origen biológico que no contienen diésel procedente del petróleo y que comprende monoalquil ésteres de ácidos grasos de cadena larga. Este tipo de biodiesel se conoce con B100 e indica que el 100% del combustible es biodiesel

El experto en la materia entenderá que existen en la técnica numerosos procedimientos para convertir lípidos en biodiesel que incluyen, sin limitación, procedimientos de transesterificación (EP1682466, EP1795576, EP1681337, EP1640437).

El término “esterificación” o “transesterificación” tal y como se usa en la presente invención, se refiere a la reacción que se produce entre un ácido graso y un alcohol. El producto de dicha reacción es un éster de ácido graso. La transesterificación puede ser catalizada por bases, ácidos o enzimas. En una forma de realización, el biodiesel se obtiene a partir de la preparación lipídica de acuerdo a la invención mediante la transesterificación de los ácidos grasos libres que forman parte de la preparación lipídica.

El proceso de transesterificación catalizado por ácidos se lleva a cabo en presencia de ácidos Brönsted, preferentemente por ácido sulfónico o sulfúrico. Estos catalizadores generan una muy alta producción de ésteres alquílicos pero las reacciones son lentas en comparación con catalizadores alcalinos. Típicamente este tipo de transesterificación se emplea con aquellos lípidos de elevado contenido en ácidos grasos libres.

El proceso de transesterificación catalizado por bases se lleva a cabo con metanol vía alcalina. El catalizador (por ejemplo, NaOH, KOH, NaHCO₃, KHCO₃) es disuelto en el alcohol y tras añadirlo al aceite, la mezcla se agita a una determinada temperatura y presión, que podrán ser ajustadas según las condiciones experimentales. Esta reacción da lugar a ésteres de ácidos grasos y glicerina cruda como productos finales de reacción.

El proceso de transesterificación enzimática catalizado por lipasas se lleva a cabo en presencia de estas enzimas o de microorganismos que las producen, como por ejemplo

aquellos pertenecientes a los géneros *Candida sp*, *Chromobacteri sp*, *Cryptococcus sp*, *Mucor sp*, *Pseudomonas sp*, *Rhizomucor sp*, *Rhizopus sp*, *Thermomyces sp*, etc.

5 En una realización aún más particular la obtención de biodiesel se lleva a cabo mediante transesterificación catalizada por bases tal y como se muestra en el ejemplo 6 de la presente invención. Como el experto en la materia entenderá, la concentración del catalizador básico, la cantidad de sustrato, la temperatura y el tiempo de reacción podrá ser ajustada. Los productos de reacción obtenidos son ésteres metílicos de los correspondientes ácidos grasos que conforman el biodiesel y glicerina. El metanol utilizado
10 como diluyente del catalizador puede ser retirado mediante diferentes procedimientos físico-químicos conocidos en el estado de la técnica como tratamiento con calor, destilación etc. Debido a la distinta densidad de los productos de reacción, la fase ligera, en donde se encontrará la glicerina y otros compuestos, puede ser separada de la fase pesada, formada por los ésteres metílicos de los ácidos grasos, mediante cualquier técnica conocida que
15 permita la separación de líquidos de distinta densidad como por ejemplo centrifugación, sedimentación, filtración, cristalización etc.

Los ésteres metílicos obtenidos, pueden ser opcionalmente purificados para eliminar impurezas (pequeñas cantidades de metanol, glicerina, catalizador, jabones, restos
20 celulares y compuestos de alto punto de ebullición). Métodos para la purificación de ésteres metílicos son bien conocidos en el estado de la técnica, e incluyen sin limitarse a, métodos de purificación cromatográficos, cristalización, destilación al vacío, o lavado con soluciones diluidas de ácido. En una realización aún más particular etapa de purificación de los ésteres metílicos obtenidos se lleva a cabo mediante lavado con una solución diluida de ácido
25 clorhídrico. Este lavado permite eliminar las impurezas insolubles que acompañan al éster y consigue evitar la formación de emulsiones. Típicamente el lavado se realiza a la misma temperatura empleada en la reacción de transesterificación. Tras el lavado, se lleva a cabo la separación la fase acuosa y orgánica de la mezcla. Como el experto en la materia entenderá cualquier técnica que permita la separación de la fase orgánica y la fase acuosa
30 podrá ser empleada en el contexto de la presente invención. La separación de ambas fases puede llevarse a cabo, pero sin estar limitado a, mediante la extracción de la fase orgánica, decantación, o evaporación de la fase acuosa. Finalmente, la fase orgánica, en donde se encontrarán los ésteres metílicos, aún arrastra una parte considerable de agua que debe ser eliminada. Típicamente la etapa de secado se lleva cabo en condiciones de presión y
35 temperatura elevadas (temperaturas de alrededor de 100°C y se suele aplicar el vacío).

Procedimiento para obtener biolubricantes

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener biolubricantes a partir de los lípidos obtenidos en el segundo procedimiento de la invención, en adelante “quinto procedimiento de la invención”, que comprende:

- i) obtener una preparación enriquecida en lípidos a partir de la biomasa microbiana de la invención,
- ii) refinar los lípidos obtenidos en la etapa i) y
- iii) convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) en biolubricantes.

El término “biolubricante”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un lubricante que se deriva de la biomasa, tal como residuos animales, de plantas o microbianos que no es tóxicos para la vida animal ni para la vida acuática y que puede degradarse mediante la acción de microorganismos en un periodo de tiempo relativamente breve.

En una primera etapa, el quinto procedimiento de la invención comprende obtener una preparación enriquecida en lípidos según el procedimiento del segundo aspecto de la invención.

En una segunda etapa, el quinto procedimiento de la invención comprende refinar los lípidos obtenidos a partir del segundo procedimiento de la invención. El término refinar o refino ha sido definido para el tercer procedimiento de la invención así como realizaciones particulares del mismo y aplica igualmente al cuarto procedimiento de la invención.

En una tercera etapa, el quinto procedimiento de la invención comprende convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) en biolubricantes. El experto en la materia entenderá que existen en la técnica numerosos procedimientos para convertir lípidos en biolubricantes que incluyen, sin limitación los procedimientos mostrados en los documentos, Petran *et al.* 2008. Govira i Maziva, 47: 463-478, US8124572 y US5713965) .Dichos métodos están basados en procedimientos de transesterificación y posterior modificación química de los ácidos grasos libres obtenidos. El término “transesterificación” ha sido previamente definido en el contexto del tercer procedimiento de la invención y aplica de forma similar al cuarto procedimiento de la invención. En una forma preferida, tras la etapa de transesterificación los ácidos grasos pueden ser separados según el número de dobles

enlaces que contengan en su estructura mediante cualquier método conocido en el estado de la técnica (Biochem. J., vol., 62, pag 222, 1956). Generalmente, los ácidos grasos monoinsaturados son los seleccionados para su empleo como lubricantes. Dichos ácidos grasos pueden ser modificados mediante esterificación dando lugar a ésteres de ácidos grasos insaturados, y epoxidación. Las especies formadas tras esta etapa (epoxi-ésteres de ácidos grasos) pueden ser finalmente modificadas químicamente mediante la esterificación con diferentes grupos tales como ácidos carboxílicos, ácido hálido, acil anhidros etc.

Procedimiento para obtener biosurfactantes

10

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener biosurfactantes a partir de los lípidos obtenidos en el segundo procedimiento de la invención, en adelante “sexto procedimiento de la invención”, que comprende:

15

- i) obtener una preparación enriquecida en lípidos a partir de la biomasa microbiana de la invención,
- ii) refinar los lípidos obtenidos en la etapa i) y
- iii) convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) en biosurfactantes.

20

El término “biosurfactante”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un compuesto anfipático con capacidad para interaccionar con compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos al mismo tiempo, que se deriva de la biomasa, tal como residuos animales, de plantas o microbianos. Dicho término incluye sin limitación ramnolípidos, trehalolípidos, soforolípidos, celobiolípidos, lípidos polioles, diglicosil diglicéridos, lipopolisacáridos, arthrofactin, surfactina, viscosina, fosfolípidos y sulfonilípidos.

25

En una primera etapa, el sexto procedimiento de la invención comprende obtener una preparación enriquecida en lípidos según el procedimiento del segundo aspecto de la invención.

30

En una segunda etapa, el sexto procedimiento de la invención comprende refinar los lípidos obtenidos a partir del segundo procedimiento de la invención. El término refinar o refino ha sido definido para el tercer procedimiento de la invención así como realizaciones particulares del mismo y aplica igualmente al cuarto procedimiento de la invención.

35

En una tercera etapa, el sexto procedimiento de la invención comprende convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) en biosurfactantes El experto en la materia

entenderá que existen en la técnica numerosos procedimientos para convertir lípidos en biosurfactantes que incluyen, sin limitación, procedimientos de... (ver por ejemplo O'Lenick. 1999. Surfactants: Chemistry & Properties; Levinson. 2008. Surfactant production, pp: 1-37. CRC Press,).

5

En una forma preferida de realización, el surfactante es un ácido graso, que puede obtenerse a partir de la preparación lipídica de acuerdo a la invención mediante la saponificación de los triglicéridos que forman parte de la preparación lipídica.

10 En otra forma preferida de realización, el surfactante es un monoglicérido, que puede obtenerse a partir de la preparación lipídica de acuerdo a la invención mediante la glicerolisis de los triglicéridos que forman parte de la preparación lipídica.

15 En otra forma preferida de realización, el surfactante es un alquil poliglucósido (APG), que puede obtenerse a partir de la preparación lipídica de acuerdo a la invención mediante las etapas de (i) saponificación de los triglicéridos de acuerdo a la invención para dar lugar a ácidos grasos, (ii) hidrogenación de los ácidos grasos para dar lugar a alcoholes y (iii) acetalización (o transcetalización) con glucosa de los alcoholes de ácido graso.

20 En otra forma preferida de realización, el surfactante es un éster de ácido graso, que puede obtenerse a partir de de la preparación lipídica de acuerdo a la invención mediante las etapas de (i) saponificación de los triglicéridos que forman parte de la preparación lipídica de acuerdo a la invención para dar lugar a ácidos grasos y (ii) condensación con etanolamina para dar lugar a los etoxilatos.

25

Usos de la invención

30 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo de la invención, en adelante "primer uso de la invención", para obtener una biomasa microbiana rica en triglicéridos según el primer procedimiento de la invención.

35 Los términos "microorganismo" y "biomasa microbiana rica en triglicéridos" y sus particularidades han sido descritos en el contexto del microorganismo y del primer procedimiento de la invención, y son aplicables al primer uso de la invención. Asimismo, también son aplicables de igual manera los modos de realización particulares y preferidos del microorganismo y del primer procedimiento de la invención.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo de la invención, en adelante "segundo uso de la invención", para extraer los lípidos de la biomasa microbiana según el segundo procedimiento de la invención.

5

Los términos "microorganismo" y "biomasa microbiana" y sus particularidades han sido descritos en el contexto del microorganismo y del primer procedimiento de la invención, y son aplicables al segundo uso de la invención. Asimismo, también son aplicables de igual manera los modos de realización particulares y preferidos del microorganismo y del segundo procedimiento de la invención.

10

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo de la invención, en adelante "tercer uso de la invención", para obtener parafinas según el tercer procedimiento de la invención.

15

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo de la invención, en adelante "cuarto uso de la invención", para obtener biodiesel según el cuarto procedimiento de la invención.

20

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo de la invención, en adelante "quinto uso de la invención", para obtener biolubricantes según el quinto procedimiento de la invención.

25

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo de la invención, en adelante "sexto uso de la invención", para obtener biosurfactantes según el sexto procedimiento de la invención.

30

Los términos "microorganismo", "parafina", "biodiesel", "biolubricante" y "biosurfactante" y sus particularidades han sido descritos en el contexto del microorganismo y del tercer, cuarto, quinto y sexto procedimiento de la invención, y son aplicables al tercer, cuarto, quinto y sexto uso de la invención. Asimismo, también son aplicables de igual manera los modos de realización particulares y preferidos del microorganismo y del tercer, cuarto, quinto y sexto procedimiento de la invención.

35

La invención se describe en detalle a continuación por medio de los siguientes ejemplos, que han de interpretarse como meramente ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Obtención de *Rhodospiridium toruloides* CECT 13085

10

La obtención de esta cepa se llevó a cabo a partir de la cepa superproductora *R. toruloides* 0041-12 aplicando procedimientos estándares de enriquecimiento, mutación y selección (Adrio y Demain. 2006. FEMS Microbiol. Rev. 30: 187-214). El microorganismo se ha depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como *Rhodospiridium toruloides* CECT 13085.

15

La capacidad para acumular grasas se analizó mediante hidrólisis ácida y extracción de la grasa intracelular con hexano siguiendo el procedimiento descrito en Kolar et al (Kolar et al. 1993. J. Anal. Chem., 347: 393-395).

20

Mediante esta medida por gravimetría se confirmó que la cepa era capaz de acumular más de un 50% de su peso seco en forma de lípidos. Esta cepa se identificó, mediante amplificación por PCR de la región D1/D2 del gen 28S y la región intergénica del ADN ribosomal (ITS-5,8S), seguido de la secuenciación de ambas y comparación con las bases de datos (NCBI/Blast)

25

El microorganismo se ha depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como *Rhodospiridium toruloides* CECT 13085.

30

Ejemplo 2: Crecimiento en hidrolizados de biomasa

Los hidrolizados de biomasa obtenidos al tratar paja de trigo mediante explosión de vapor en medio ácido se hidrolizaron empleando diferentes concentraciones de sólidos (4-20% p/p). Las soluciones resultantes, conteniendo 20-100 g de azúcares/litro, se emplearon para preparar los medios de cultivo. *R. toruloides* 0013-09 se creció en matraces conteniendo

35

medio m/MBO_008 (composición: líquido de macerado de maíz 9,6 g/l; azúcares 20 g/l; pH 6) a 30°C, 250 rpm durante 24 horas. Estos cultivos se emplearon para inocular 50 ml del medio m/MBO_008_1 (composición: líquido de macerado de maíz 9,6 g/l; azúcares procedentes de paja de trigo 70 g/l; pH 6). Los cultivos se mantuvieron a 30°C, 250 rpm durante 5 días. Como muestra la figura 1 la cepa *R. toruloides* 0013-09 no fue capaz de crecer debido a las altas concentraciones de compuestos inhibidores presentes en este medio de cultivo.

Con el fin de lograr una cepa capaz de resistir y crecer en presencia de estas altas concentraciones de tóxicos, se realizó una evolución de esta cepa por adaptación. Para ello se realizaron sucesivas rondas de cultivo en matraces de 50 ml conteniendo medio m/MBO_008_1 y transfiriendo, cada 24 horas, 10% del volumen del cultivo a otro matraz conteniendo medio fresco. De esta forma se completaron un total de 25 rondas. Finalmente se seleccionó una cepa (0041-12) que mostró un buen crecimiento en presencia de estas altas concentraciones de inhibidores tal y como se puede observar en la Figura 1.

Ejemplo 3: Mejora del metabolismo de xilosa

Células de *R. toruloides* 0041-12 crecidas en medio YPD (composición: extracto de levadura 10 g/l, glucosa 20 g/l, peptona 20 g/l) durante 16 h a 30°C y 250 rpm se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en tampón fosfato potásico 50 mM pH 8. Alícuotas de 10 ml de dicha suspensión se trataron con N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG, 0,15 mg/ml) y se incubaron con agitación a 30°C durante 45 minutos. La viabilidad del cultivo a este punto final fue menor del 1%.

Las células supervivientes se sembraron sobre placas de medio m/MBO_002 (composición: NH₄NO₃ 1 g/l; CaCl₂·H₂O 0,4 g/l; KH₂PO₄ 0,76 g/l; MgSO₄·7H₂O 0,4 g/l; xilosa 20 g/l; agar 20 g/l; pH 6) y se incubaron a 30°C durante 5 días. Un total de 785 colonias mostraron un crecimiento más rápido y se seleccionaron como posibles candidatas. A continuación, estas colonias se sometieron a una segunda ronda de selección en placas de 96 pocillos conteniendo 0,4 ml de medio m/MBO2_002 (composición: líquido macerado de maíz 0,96 g/l; glucosa o xilosa 40 g/l, pH 6). Se seleccionaron 87 cepas que mostraron un crecimiento similar, o incluso mejor, al emplear xilosa como única fuente de carbono. Posteriormente, estas colonias se cultivaron en 10 ml de medio m/MBO2_004 (composición: líquido de macerado de maíz 9,6 g/l; glucosa o xilosa 40 g/l; pH 6). De esta tercera ronda se seleccionaron 21 cepas que mostraron un crecimiento similar en ambos azúcares. De entre

ellas, las cepas M709 y M133 mostraron las mejores tasas de crecimiento específico y crecimiento en xilosa (μ_{xil}) con respecto a la cepa parental (Tabla 1 y figura 2). De ambas, la cepa M133 fue capaz de consumir toda la xilosa presente en el medio de cultivo de manera más rápida (figura 2).

5

La cepa M133 se ha depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso 13085.

10

	Fuente de carbono	μ_{net} (h^{-1})	Td (h)	R ²
M133	Glucosa	0,2956	2,3	0,9915
	Xilosa	0,1339	5,2	0,9985
M709	Glucosa	0,3173	2,2	0,9978
	Xilosa	0,1548	4,5	0,9944
0041-12	Glucosa	0,3263	2,1	0,998
	Xilosa	0,071	9,8	0,9723

15

μ_{net} (h^{-1}): tasa de crecimiento específica (horas⁻¹)

Td (h): tiempo de duplicación (horas)

R²: coeficiente de correlación

20 **Ejemplo 4: Producción de aceite a partir de diferentes tipos de hidrolizados de biomasa**

Cultivos de *R. toruloides* CECT 13085 crecidos en medio m/MBO_008 (composición: líquido macerado de maíz 9,6 g/l, hidrolizado hasta una concentración de azúcares de 20 g/l, pH 6) se utilizaron para inocular matraces de 500 ml conteniendo 100 ml de medio m/MBO_008_1 (composición: líquido macerado de maíz 9,6 g/l, 70 g azúcares/l de hidrolizado paja de trigo, pH 6), de medio m/MBO_008_2 (composición: líquido macerado de maíz 9,6 g/l, 70 g azúcares/l de hidrolizado bagazo de caña, pH 6), o de medio m/MBO_008_3 (composición: líquido macerado de maíz 9,6 g/l, 70 g azúcares/l de hidrolizado de racimos vacíos de palma aceitera, pH 6). Los cultivos se mantuvieron a 30°C, 250 rpm durante 7 días. Finalizados los cultivos, las células se recogieron por centrifugación y la biomasa de cada matraz se secó en una estufa a 65°C durante 48 horas con una agitación constante obteniéndose 1,70 g, 1,68 g y 1,72 g, respectivamente. A partir de la biomasa de cada matraz se analizó el contenido en aceite por gravimetría mediante extracción con n-hexano. Finalmente se obtuvieron 1, 1,1 y 1 gramos de aceite lo que corresponde a un contenido en aceite intracelular del 61%, 65% y 58%, respectivamente.

30

35

Ejemplo 5: Producción de aceite a partir de hidrolizado de paja de trigo y glicerina cruda

5 Cultivos de *R. toruloides* CECT 13085 crecidos en medio m/MBO_008 (composición: líquido macerado de maíz 9,6 g/l, hidrolizado hasta una concentración de azúcares de 20 g/l, pH 6) se utilizaron para inocular matraces de 500 ml conteniendo 100 ml de medio m/MBO_008_4 (composición: líquido macerado de maíz 9,6 g/l, azúcares de hidrolizado paja de trigo 52 g/l, glicerina cruda 18 g/l, pH 6). El cultivo se mantuvo a 30°C, 250 rpm durante 7 días.

10 Finalizado el cultivo, las células se recogieron por centrifugación y la biomasa se secó en una estufa a 65°C durante 48 horas con una agitación constante obteniéndose 1,8 g. A partir de esta muestra se analizó el contenido en aceite por gravimetría mediante extracción con n-hexano. Se obtuvieron 1,2 g de aceite, lo que corresponde a un contenido intracelular del 64%.

15

Ejemplo 6: Producción de biodiésel

Una muestra (0,5 kg) de aceite extraído y refinado de la cepa *Rhodospiridium toruloides* CECT 13085 se empleó para llevar a cabo la reacción de transesterificación. La reacción se

20 realizó en tres etapas cada una de 2 horas de duración a una temperatura de 55°C. En cada etapa se añadieron NaOH (1% p/v) y metanol (10% v/v). Concluida la reacción se detuvo la agitación y la mezcla se separó mediante centrifugación. Se obtuvieron dos fases: una ligera, conteniendo los ésteres metílicos y metanol en exceso, y una fase pesada formada por glicerina, restos de metanol, catalizador y sales.

25 La purificación de la fase ligera se realizó mediante cuatro etapas de lavado a 55°C. En la primera se utilizó HCl (al 2%) y en las tres restantes agua destilada. Al finalizar cada lavado se dejó decantar la mezcla hasta lograr una buena separación de la fase orgánica y acuosa. Se retiró la fase acuosa y los ésteres metílicos se sometieron a una etapa de secado, para eliminar los restos de metanol y agua, mediante evaporación a vacío y 115°C. La cantidad

30 final obtenida fue de 0,49 kg de ésteres metílicos lo que representa un rendimiento del 98%. El análisis del biodiésel obtenido cumplió todos los parámetros exigidos por la norma EN14214.

DEPÓSITOS DE MATERIAL BIOLÓGICO

- 5 La cepa *Rhodosporidium toruloides* caracterizada por su capacidad de acumular lípidos hasta al menos un 50% del peso seco, por su capacidad de resistir hidrolizados de biomasa sin detoxificar y por su capacidad de metabolizar xilosa ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo en las condiciones estipuladas en el Tratado de Budapest. El depósito se efectuó el 7 de mayo de 2013 y el número asignado a dicho depósito fue de
- 10 CECT 13085.

REIVINDICACIONES

1. Microorganismo de la cepa *Rhodospiridium toruloides* CECT 13085 o de una cepa mutante de la misma, que mantiene la capacidad de acumular lípidos hasta al menos un 50% del peso seco, la capacidad de crecer en presencia de hidrolizados de biomasa sin detoxificar y/o la capacidad de metabolizar xilosa.
2. Procedimiento para obtener una biomasa microbiana rica en triglicéridos, que comprende
 - i) cultivar un microorganismo según la reivindicación 1, en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y al menos una fuente de nitrógeno, en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo, y
 - ii) separar la biomasa microbiana del medio de cultivo,
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicación 2, en donde la fuente de carbono es un hidrolizado de biomasa lignocelulósica.
4. Procedimiento, según la reivindicación 3, en donde la fuente de carbono comprende además, glicerol.
5. Procedimiento, según las reivindicaciones 3 o 4, en donde el hidrolizado se obtiene de paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, bagazo de maíz, racimos vacíos de palma aceitera, poda de palma aceitera, fibra de palma aceitera, poda de vid, poda de olivo y combinaciones de las mismas.
6. Procedimiento según la reivindicación 2, en donde la fuente de carbono se selecciona del grupo que consiste en glucosa, glicerol, melazas, xilosa, arabinosa, manosa, fructosa, acetato y combinaciones de las mismas.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en donde la fuente de carbono es glucosa.
8. Procedimiento según la reivindicación 6, en donde la fuente de carbono es xilosa.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en donde la fuente de nitrógeno se selecciona del grupo que consiste en extracto de levadura, peptona,

líquido macerado de maíz, urea, glutamato sódico, diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico, como sales de amonio y combinaciones de las mismas.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9 en donde la fuente de nitrógeno es una sal de amonio, preferiblemente cloruro de amonio.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10 en donde el medio de cultivo contiene inhibidores sólidos seleccionados de: ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido succínico, 4-hidroxibenzaldehído, vanillina, ácido vanílico, siringaldehído, ácido 4-hidroxibenzoico, catecol, guaicol, ácido siríngico, furfural, 5-hidroximetilfurfural y combinaciones de los mismos.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11, en donde las condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo de la etapa (i) comprenden
 - temperatura en un rango entre 18 °C y 37 °C,
 - concentración de oxígeno disuelto de al menos el 20%, y/o
 - agitación constante.
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12 en donde la etapa ii) se realiza mediante un método seleccionado del grupo que consiste en filtración, microfiltración, centrifugación y combinaciones de los mismos.
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, que comprende además secar la biomasa microbiana de la etapa ii).
15. Biomasa microbiana rica en triglicéridos obtenible según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14.
16. Procedimiento para obtener una preparación enriquecida en lípidos que comprende
 - i) obtener una biomasa microbiana según la reivindicación 15 y
 - ii) extraer los lípidos de dicha biomasa microbiana.
17. Procedimiento según la reivindicación 16 en donde la extracción de la etapa (ii) se lleva cabo mediante métodos mecánicos o mediante un método de extracción sólido-líquido

18. Procedimiento según la reivindicación 17, en donde el método de extracción mecánica se realiza usando prensa de tornillo, prensa francesa o molino de bolas.
19. Procedimiento según la reivindicación 18, en donde el método de extracción sólido-líquido se realiza usando un disolvente orgánico inmiscible en agua.
20. Procedimiento según la reivindicación 19, en donde dicho disolvente orgánico inmiscible en agua se selecciona del grupo que consiste en n-hexano, acetona, éter de petróleo, éter-etílico y combinaciones de los mismos.
21. Procedimiento para obtener parafinas que comprende las etapas de:
 - i) obtener una preparación enriquecida en lípidos a partir de una biomasa microbiana según la reivindicación 15,
 - ii) refinar los lípidos obtenidos en la etapa ii) y
 - iii) convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) en parafinas.
22. Procedimiento según la reivindicación 21, en donde la etapa ii) se realiza mediante al menos un lavado con NaOH a una concentración entre 5% y 15%.
23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 21 o 22 en donde la etapa iii) comprende un procedimiento de hidrotratamiento o hidroprocesamiento
24. Procedimiento según la reivindicación 23, en donde el método de hidrotratamiento comprende
 - poner en contacto la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) con agua,
 - aplicar una temperatura y presión elevadas, y
 - separar la fase orgánica del agua.
25. Procedimiento según la reivindicación 23 en donde el método de hidroprocesamiento comprende
 - hidrogenar la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii), y
 - desoxigenar dicha mezcla de lípidos refinados.

26. Procedimiento según la reivindicación 25, en donde la hidrogenación y desoxigenación de dicha mezcla de lípidos refinados se realiza en la misma etapa o en etapas consecutivas.
27. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 25 o 26, en donde el método de hidroprocesamiento se lleva a cabo a temperatura y presión elevadas.
28. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, que comprende adicionalmente un proceso de craqueo catalítico en condiciones adecuadas para convertir las parafinas obtenidas en la etapa ii) en bioqueroseno.
29. Procedimiento según la reivindicación 28, en donde dicho craqueo catalítico emplea un catalizador sólido.
30. Procedimiento para obtener biodiesel que comprende las etapas de
 - i) obtener una preparación enriquecida en lípidos a partir de la biomasa microbiana según la reivindicación 15,
 - ii) refinar los lípidos obtenidos en la etapa i) y
 - iii) convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) en biodiesel.
31. Procedimiento para obtener biolubricantes que comprende las etapas de
 - i) obtener una preparación enriquecida en lípidos a partir de la biomasa microbiana según la reivindicación 15,
 - ii) refinar los lípidos obtenidos en la etapa i) y
 - iii) convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) en biolubricantes.
32. Procedimiento para obtener biosurfactantes que comprende las etapas de: a partir de, que comprende:
 - i) obtener una preparación enriquecida en lípidos a partir de la biomasa microbiana según la reivindicación 15,
 - ii) refinar los lípidos obtenidos en la etapa i) y
 - iii) convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) en biolubricantes.
33. Uso del microorganismo según la reivindicación 1 o de la biomasa microbiana rica en triglicéridos según la reivindicación 15 para obtener una preparación enriquecida en

lípidos, para obtener parafinas, para obtener biodiesel, para obtener biolubricantes o para obtener biosurfactantes.

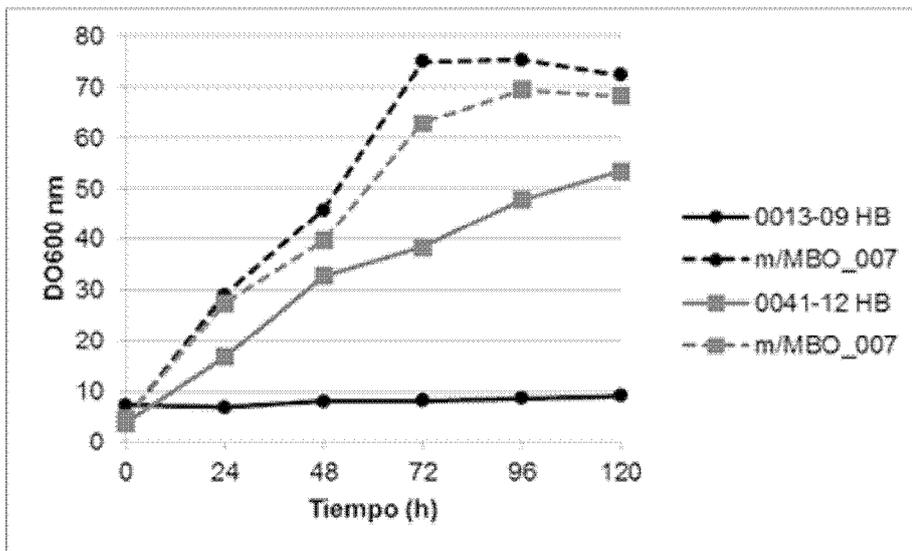


Figura 1

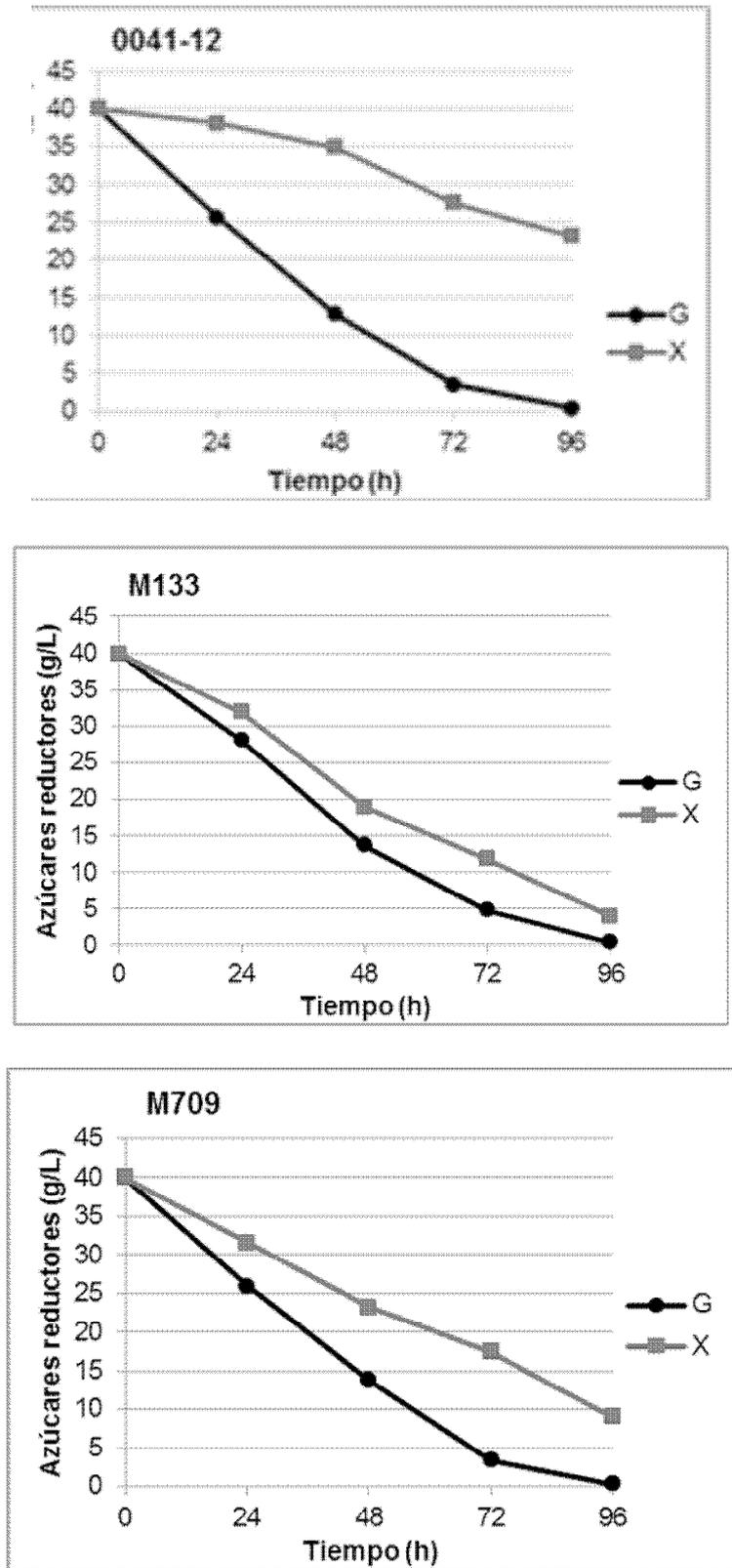


Figura 2