

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 947**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

C10L 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2012 E 12737610 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2718453**

54 Título: **Éster metílico de ácido graso (biodiésel) útil para motor de combustión a partir de lechos de microalgas marinas de origen natural cultivadas en estanques salinos abiertos con la adición valiosa de otros productos**

30 Prioridad:

26.05.2011 IN DE15072011

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

09.03.2015

73 Titular/es:

**COUNCIL OF SCIENTIFIC & INDUSTRIAL RESEARCH (100.0%)
(An Indian registered body Incorporated under the Registration of Societies Act (Act XXI of 1860)) Anusandhan Bhawan, Rafi Marg New Dehli 110 001, IN**

72 Inventor/es:

**MISHRA, SANDHYA, CHANDRIKA, PRASAD;
GHOSH, PUSHPITO, KUMAR;
GANDHI, MAHESH, RAMNIKLAL;
BHATTACHARYA, SOURISH;
MAITI, SUBARNA;
UPADHYAY, SUMESH, CHANDRA;
GHOSH, ARUP;
PRASAD, RACHAPUDI, BADARI, NARAYANA;
KANJILAL, SANJIT;
MISHRA, SANJIV, KUMAR;
SHRIVASTAV, ANUPAMA, VIJAYKUMAR;
PANCH, IMRAN;
PALIWAL, CHETAN;
GHOSH, TONMOY;
MAURYA, RAHUL, KUMAR;
JAIN, DEEPTI;
PATIDAR, SHAILESH, KUMAR;
SAHU, ABHISHEK;
BOSAMIYA, HETAL y
ZALA, KRUSHNADEVSIH**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 530 947 T3

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

DESCRIPCIÓN

Éster metílico de ácido graso (biodiésel) útil para motor de combustión a partir de lechos de microalgas marinas de origen natural cultivadas en estanques salinos abiertos con la adición valiosa de otros productos

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de lechos de microalgas que contienen lípidos de origen natural recogidas en la costa occidental de la India para la producción de éster metílico de ácido graso (EMAG) y demostrar la adecuabilidad de este último para el funcionamiento de un vehículo normal. La invención se refiere también a la obtención de biomasa de microalgas que contienen lípidos fácilmente aprovechables (obtenida de *Chlorella variabilis* con nº de acceso PTA-12198) en estanques salinos solares y su conversión adicional en EMAG que es muy útil para un motor de combustión.

10

Antecedentes de la invención

Se puede hacer referencia al artículo de Daemon Fairless, Biofuel: The little shrub that could-may be. Nature (2007) 449, 652-655 y al de Laurent Lardon et al, Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae, Environmental Science & Technology (2009) 43:17, 6475-6481, en los que se destaca el complejo problema del alimento en comparación con el combustible y se enfatiza la necesidad de fuentes de biomasa que no interfieran con la producción de alimento.

20

Se puede hacer referencia también a D.H. Lee, Algal biodiesel economy and competition among biofuels, Bioresource Technology (2011) 102, 43-49, a la escasez de campos cultivables y a la necesidad de localizaciones alternativas para generar biomasa útil para la producción de combustible, en el que los cultivos de microalgas no requieren grandes superficies de tierras cultivables. Además, los sitios de cultivo pueden estar tanto en zonas desérticas como en aguas costeras poco profundas.

25

Se puede hacer referencia a Ghosh et al, patente de los EE.UU. 7666234, en la que se describe la utilidad de tierras marginales para la producción de biodiésel útil para motores de combustión. La biomasa en cuestión es de origen terrestre.

30

Se puede hacer referencia al artículo titulado "Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures" (B. D. Wahlen et al. Bioresource Technol., 2011, 102, 2724-2730).

35

Se puede hacer referencia a los artículos de Doan et al, Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock, Biomass and Bioenergy (2011) 35:7; 2534-2544 y a Matsunaga et al. Characterization of marine microalga, Scenedesmus sp. strain JPCC GA0024 toward biofuel production. Biotechnology Letters (2009) 31: 1367-1372, en los que se notifica que especies de microalgas marinas contienen lípidos que podrían servir como fuente de biodiésel.

40

Se puede hacer referencia a la patente de los EE.UU. 7977076; Nasrin Moazami et al. Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island.

45

Se puede hacer referencia al artículo de Brennan et al, Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renewable and Sustainable Energy Reviews (2010) 14: 557-577, que indica que las microalgas se cultivan normalmente para productos de alto valor y volumen bajo que requieren un área de tierra limitada o donde se puede obtener la biomasa bajo techo dentro de fotobiorreactores.

50

Se puede hacer referencia a los artículos de Hankamer et al, Photosynthetic biomass and H₂ production by green algae: from bioengineering to bioreactor scale-up Physiologia Plantarum (2007) 131: 10-21 y Wang et al, CO₂ biomitigation using microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology (2008) 79: 5; 707-718; en la que se enfatiza la importancia de la producción fotosintética de biomasa de microalgas para la producción de biocombustible.

55

Se puede hacer referencia al artículo de Douskova et al, Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs, Applied Microbiology & Biotechnology (2009), 82:179-185 donde, se reivindica que se puede aumentar la productividad de biomasa de microalgas mediante el uso de gas de combustión como una fuente rica en CO₂.

60

Se puede hacer referencia a cualquiera de numerosos artículos del tipo de Griffiths et al Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. Journal of Applied Phycology 2009, 21:493-507 y al informe preparado por Sustainable Energy Ireland de Tom Bruton et al. A Review of the Potential of Marine Algae as a Source of Biofuel in Ireland (2009) que hace mención de la importancia de las microalgas marinas como fuente de biodiésel pero que no describe cuando o como dicho cultivo ocupará una escala relevante en una producción de

65

biocombustible a gran escala.

- 5 Se puede hacer referencia a una revisión de Pittman et al The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources, *Bioresource Technology* (2011) 102, 17-25. Sin embargo, no se hace mención en el anterior a su utilidad para la producción de biodiésel, a pesar de que ni se determinó ni se usó *Microspora sp.* para la obtención de lípidos en el cultivo mixto de residuos agrícolas.
- 10 Se puede hacer referencia al trabajo de Syed Zahir Shah & Habib-ur-Rehman Khattak (Some Green Algae from Paddy Fields of Mathra (distrito de Peshawar), Syed Zahir Shah & Habib-ur-Rehman Khattak, Department of Botany, Islamia College, Peshawar) que describe la presencia de *Microspora sp.* cerca del río Sind como parte de un estudio de biodiversidad. No se hace mención en el anterior a ninguna utilidad de la biomasa.
- 15 Se puede hacer referencia al artículo titulado Cell division and wall structure in *Microspora* (Picketts-Heaps. Cell division and wall structure in *Microspora* (Picketts-Heaps. *New Phytologist*, (1973) 72,347-355) donde se describe la citología de *Microspora sp.* Se indica en el anterior que dicha alga puede producirse en la forma de un lecho. Se indica además que las algas pueden contener o no lípidos. No se hace referencia a ningún intento de utilizar dichos lechos para la preparación de un biodiésel.
- 20 Se puede hacer referencia al artículo de Mata et al, Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (2010) 14: 217-232; este enumera las diversas especies de microalgas marinas que contienen lípidos y, en este sentido, de potencial interés como fuente de biodiésel.
- 25 Se puede hacer referencia también al artículo de Greenwell et al, Placing Microalgae on the Biofuels Priority List: A Review of the Technological Challenges. *Journal of the Royal Society Interface* (2010), 7: 703-726 que dice, que microalgas diferentes crecen a diferentes velocidades y aunque algunas tengan un elevado contenido en aceites serán poco prácticas para su uso debido a motivos diferentes tales como una velocidad de crecimiento lenta, dificultad de cosecha de la biomasa, etc.
- 30 Se puede hacer referencia al documento US2009/0298159 A1 en el que se proporciona un método para producir biodiésel a partir de bioalgas utilizando las fases de crecimiento en dos etapas, autótrofa y heterótrofa, de *Chlorella variabilis* para la producción de biodiésel, que incluye una secuencia de procedimientos: cultivar algas fotoautótrofas, concentrar las células y a continuación transferirlas a un fermentador para el cultivo heterótrofo. Se añade carbono orgánico durante la etapa de cultivo heterótrofo. Es evidente que el proceso se lleva a cabo en sistemas cerrados y requiere la concentración de las células, que necesita un consumo alto de energía. Además, no se mencionan las características del biodiésel ni ningún análisis llevado a cabo en vehículos.
- 35 Se puede hacer referencia al sitio www.treehugger.com/chevron-backs-solazyme-to-develop-algal-biodiesel-technology.html para el artículo titulado "Chevron Backs Solazyme to Develop Algal Biodiesel Technology" de fecha 2 de febrero de 2008, en el que Solazyme produce biodiésel a partir de fuentes de azúcar mediante fermentación en la oscuridad.
- 40 Será evidente a partir de la técnica anterior que no se ha descrito un proceso económico para la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos a partir de dicha biomasa cultivada o cosechada obtenida de lechos de microalgas de origen natural. La presente invención parece que supera todas estas limitaciones básicas y da lugar a un novedoso proceso simplificado y con un coste económico para producir un éster metílico de ácido graso a partir de lechos de microalgas junto con subproductos de valor añadido procedentes de corrientes de subproductos residuales. Se ha encontrado que el carbono total del agua en el sitio disminuye con cada recogida posterior. Se puede atribuir esto a las frecuentes recogidas en el mismo sitio.
- 45 Se puede hacer referencia a la solicitud de patente WO 2011/027353 (PCT/IN2010/000192) de Ghosh et al que describe el cultivo de especies de microalgas marinas de *Chlorella* y las ventajas del crecimiento mixotrófico. No se hace referencia en dicho documento a la producción de biodiésel a partir de la biomasa ni a su cultivo práctico a gran escala de manera que se perciba la biomasa como un volumen elevado de materias primas asequibles.
- 50 Se puede hacer referencia al artículo de K. Boonprab, Biodiesel from fresh water algae, *Cladophora Glomerata*, *Phycologia*, (2009), Vol. 48 (49, Supl. 2, página 11, en el que se describe un proceso para producir ésteres metílicos de ácidos grasos mediante transesterificación alcalina utilizando lípidos obtenidos de *Cladophora glomerata* mediante extracción Soxhlet.
- 55 Se puede hacer referencia al artículo de Greenwell et al, "Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges.", *Journal of the Royal Society Interface* (2010), 7: 703-726 y Chisti, Y et al; *Biotechnology Advances* (2003), que destaca las dificultades del procesamiento posterior de la biomasa de microalgas y el consecuente resultado de penalización energética elevada. Entre las más importantes se destaca la dificultad de cosechar la biomasa procedente de suspensiones muy diluidas.
- 60
- 65

Se puede hacer referencia a los artículos <http://www.treehugger.com/renewable-energy/chevron-backs-solazyme-to-develop-algal-biodiesel-technology.html> y <http://www.treehugger.com/cars/solazyme-b100-algae-biodiesel-goes-on-the-road.html> que describen el funcionamiento de un vehículo con biodiesel B100 procedente de microalgas. Sin embargo, el artículo indica que la biomasa se obtuvo en condiciones heterótrofas utilizando azúcares como fuente de carbono orgánico.

No existen informes sobre el comportamiento de ningún tipo de biodiésel obtenido de lechos de microalgas marinas de origen natural o de una biomasa de microalgas marinas termotolerante obtenida en condiciones prácticas de crecimiento autótrofo en estanques salinos solares.

Durante la búsqueda de microalgas potenciales a lo largo de la costa occidental, el equipo de los inventores investigó unos pocos sitios que mostraban alguna probabilidad de obtener las microalgas deseadas mediante las imágenes observadas con el programa informático Google Earth. Uno de los sitios que los inventores investigaron se localizó en la longitud 70°54,959' E y en la latitud 20°42,391' N (sitio 1), y otro sitio localizado a una longitud 68°59,876' y latitud 22°23,975' (sitio 2), India, mostró un lecho denso de microalgas. En el examen microscópico (morfología) del lecho se reveló que el lecho contenía diversas especies de algas entre las cuales se ha encontrado que *Microspora sp.* era dominante. El método disponible para producir biodiésel a partir de algas requiere mucha energía. De este modo, se han hecho intentos de desarrollar un proceso económico para producir un biodiésel de microalgas marinas.

Se puede hacer referencia a Bligh, E.G., Dyer, W.J., A rapid method for total lipid extraction and purification, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* (1959). 37, 911-917. Lee et al. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae, *Bioresource Technology* 101 (2010) S75-S77, el método de extracción de lípidos procedentes de una biomasa de microalgas marinas que conlleva de forma típica la extracción con disolventes polares y da como resultado grandes cantidades de fosfolípidos además de triglicéridos, siendo lo anterior indeseable para la producción de biodiésel.

Objetivos de la invención

El principal objetivo de la presente invención es utilizar lechos de origen natural de una asociación de microalgas marinas y microalgas marinas autosedimentables obtenidas en estanques salinos solares como fuentes de ésteres metílicos de ácidos grasos útiles para motores de combustión (biodiésel).

Otro objetivo es identificar *Cladophora sp.* (Nº de acceso de la ATCC PTA-12199) y *Microspora sp.* (Nº de acceso de la ATCC PTA-12197) como la especie dominante en los lechos de asociaciones de microalgas marinas citados anteriormente.

Otro objetivo es cultivar artificialmente dichos lechos flotantes en estanques salinos solares y/o aumentar el contenido de lípidos mediante la aplicación de condiciones de estrés.

Otro objetivo es utilizar *Chlorella variabilis* (Nº de acceso de la ATCC PTA-1219B) aislada de la costa occidental de la India como cepa de microalgas marinas autosedimentable y termotolerante ideal para su crecimiento en estanques salinos solares durante la época de verano en Gujarat, India.

Otro objetivo es minimizar la penalización energética asociada con el aislamiento de lípidos procedente de la biomasa.

Otro objetivo es utilizar biomasa fácilmente cosechable como un medio de reducir la penalización energética.

Otro objetivo es crear la oportunidad de obtener biomasa de microalgas marinas a gran escala utilizando cerca de 0,1 millones de acres (42.200 ha) de superávit de tierra disponible para la producción salina solar.

Otro objetivo es minimizar los costes imputables para el cultivo utilizando agua de mar, nutrientes inorgánicos baratos, y evitando accesorios mecánicos para la agitación del medio de cultivo consiguiendo a la vez una tasa de crecimiento diaria máxima de 45 g (en base seca)/m²/día durante los meses de verano.

Otro objetivo es definir las prácticas básicas seguidas en la producción salina solar tales como la alimentación por gravedad y el desplazamiento de líquidos de estanque a estanque.

Otro objetivo es el secado al sol de la biomasa cosechada.

Otro objetivo es extraer lípidos de la biomasa secada al sol utilizando disolventes volátiles no polares tales como hexano para minimizar la proporción de lípidos indeseados en la masa de lípidos extraídos globalmente.

Otro objetivo es utilizar opcionalmente combustible fósil para el proceso de extracción cuando se utiliza biodiésel mezclado. Otro objetivo es utilizar energía solar térmica para los procesos de extracción y aislamiento de lípidos

para maximizar la relación de salida a entrada de energía.
Otro objetivo es derivar el valor máximo de la biomasa agotada.

Otro objetivo es refinar el aceite bruto mediante medios sencillos y económicos.

5 Otro objetivo es aprovechar posteriormente el proceso de producción de EMAG conocido tal como se describe en la patente de los EE.UU. 7666234.

10 Otro objetivo es demostrar la producción de EMAG de microalgas marinas con las especificaciones de parámetros básicos deseadas tales como la viscosidad, contenido de ácidos grasos libres, estabilidad a la oxidación, glicerol libre y total, contenido en fósforo, contenido de humedad, etc.

15 Otro objetivo es demostrar el funcionamiento de un vehículo convencional con un biodiésel B20 producido a partir de lechos de microalgas marinas y combustible B100 producido a partir de *Chlorella variabilis* (con N° de acceso de la ATCC PTA-1219B).

Otro objetivo es utilizar el subproducto de la corriente de glicerol bruto para el crecimiento acelerado y un contenido superior de lípidos de las microalgas cultivadas tal como se describe en la técnica anterior.

20 Sumario de la invención

La presente invención proporciona ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) para uso como biodiésel, produciéndose los ésteres a partir de lechos de microalgas marinas en flotación de origen natural o capas gruesas de microalgas marinas sedimentadas formadas durante el cultivo en estanques salinos solares o una mezcla de los mismos.

25 Un aspecto de la presente invención proporciona un proceso integrado para la preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos útiles para motores de combustión (biodiésel) a partir de lechos en flotación de origen natural cosechados con una asociación de *Microspora* con N° de acceso de la ATCC PTA-12197 y *Cladophora* con N° de acceso de la ATCC PTA-12199 y lechos de microalgas cultivados junto con la masa de la cepa de microalgas termotolerante seleccionada cultivada (*Chlorella variabilis* con N° de acceso de la ATCC PTA-1219B) y utilización de los subproductos procedentes tanto de la biomasa de microalgas como de los subproductos de los ésteres metílicos de ácidos grasos y comprendiendo dicho proceso las etapas de:

35 a) recogida de la asociación de lechos de microalgas de diferentes sitios y lavado para eliminar la arena y las partículas adheridas de arena y suciedad; ii) identificación de las especies de microalgas presentes y cultivar el lecho en condiciones de laboratorio utilizando agua de mar y la granja salina experimental (GSE) (5° Beç) de la CSMRI para simular las condiciones naturales en los tanques para su proliferación posterior.

40 b) aislamiento de las especies de microalgas que contienen aceites (*Microspora*, *Rhizoclonium*, *Spirulina*, *Chlorella*, *Cladophora*, *Diatomeas*, *Oscillatoria* spp., etc) procedentes del lecho.

45 c) cultivo de la masa al aire libre de las especies de microalgas que contienen aceite en la granja salina experimental en tanques de 18 m² y 90 m² y autosedimentación de la biomasa que facilita un rápido cosechado y recirculado del sobrenadante como nutriente para el inóculo del siguiente lote.

d) secado de los lechos de microalgas seguido por molienda de los lechos de microalgas secos en un polvo fino.

50 e) extracción eficaz del aceite de la biomasa que incluye pretratamiento de la biomasa utilizando un molino de bolas/vapor seguido por la extracción con un disolvente no polar/ Soxhlet, etc., y recirculado del disolvente.

f) refinado del aceite bruto

55 g) seguido de procesos de transesterificación conocidos para preparar el biodiésel útil para motores de combustión como en la técnica anterior.

60 h) utilización de las corrientes de subproductos de biodiesel para aumentar la productividad de las algas a través del crecimiento mixotrófico como se describe en la técnica anterior (documento WO2012/038978 (solicitud de patente PCT/IN2011/000655)) y/o para la producción de otros materiales útiles tales como biopolímeros biodegradables (solicitud de patente WIPO WO/2011/027353).

i) utilización de la biomasa agotada y de las aguas residuales generadas durante la síntesis del biodiésel para la producción del biogas.

65 j) utilización de la biomasa agotada como suministro de agua y como biofertilizante.

- k) utilización de la biomasa residual y de la torta desaceitada para la preparación de briquetas.
- l) extracción de carotenoides de la biomasa residual desaceitada.
- 5 m) formulación de las mezclas B20 y B100 adecuadas para el funcionamiento de un vehículo (Chevrolet Tavera) con carga completa sin ninguna modificación en el motor.

En una realización de la presente invención se describe un proceso para la producción de un éster metílico de ácido graso útil para motor de combustión para su uso como biodiésel, el proceso comprende las etapas de:

- 10 (i) recoger lechos de microalgas de origen natural que tienen una asociación de *Microspora sp.* y *Cladophora sp.* y *Chlorella variabilis* cultivada para obtener la biomasa de algas;
- (ii) secar al sol la biomasa hasta un nivel de humedad residual del 5-10 %;
- 15 (iii) pretratar la biomasa de la etapa (ii) mediante un chorro de vapor o un choque osmótico para romper la pared celular;
- (iv) extraer los lípidos de la biomasa de algas de la etapa (iii) utilizando hexano como disolventes u opcionalmente con diésel donde el combustible es para usarse en forma de mezcla para obtener un aceite bruto;
- (v) eliminar el hexano mediante arrastre con aire y tratar el aceite bruto resultante con tierra de greda o tratar opcionalmente el extracto de la etapa (ii) directamente con tierra de greda para eliminar los fosfolípidos,
- 20 pigmentos y otras impurezas;
- (vi) filtrar para eliminar los sólidos en suspensión y tratar el extracto oleoso de la etapa (v) adicionalmente para reducir el contenido de ácidos grasos libres (AGL), si se requiere para obtener aceite refinado;
- (vii) acometer la transesterificación catalizada por álcali del aceite refinado de la etapa (vi), separar los EMAG, y purificarlos adicionalmente para obtener EMAG útiles para un motor de combustión.

25 En otra realización de la presente invención se describe un proceso para preparar EMAG, donde los EMAG obtenidos de *Microspora sp* tienen una composición que se analizó mediante GC-MS que comprende un 9,92 % de ácido graso 16:0, 2,44 % de ácido graso 18:0, 28,27 % de ácido graso 18:1, 59,37 % de ácido graso 18:2, y 5-30 ppm de antioxidante BHT.

30 En otra realización adicional de la presente invención se describe un proceso, en el que los EMAG obtenidos de *Chlorella variabilis* tienen una composición que se analizó mediante GC-MS que comprende 6,9 % de ácido graso 16:0, 3,1 % de ácido graso 18:0; 32,6 % de ácido graso 18:1, y 57,3 % de ácido graso 18:2, y 5-30 ppm de antioxidante BHT.

35 En una realización de la invención, la presente invención proporciona un proceso integrado para la preparación de un éster metílico de ácido graso (biodiésel) útil para motor de combustión a partir de un lecho de microalgas naturales y cultivadas junto con la masa de la cepa de microalgas seleccionada cultivada y la utilización de los subproductos de la masa de microalgas así como de los subproductos de los ésteres metílicos de ácidos grasos.

40 En otra realización de la presente invención, el lecho de microalgas es una asociación de diferentes especies de microalgas con *Microspora* y *Cladophora* spp., con N° de acceso de la ATCC PTA-12199 como especies dominantes.

45 En otra realización más de la presente invención, el agua de mar con micronutrientes esenciales /granja salina CSMCRI -ESF se usa para el cultivo al aire libre de la masa de microalgas.

50 En otra realización más de la presente invención, se llevó a cabo la extracción del aceite utilizando disolventes seleccionados entre el grupo constituido por hexano, cloroformo, metanol, acetona, tetrahidrofurano, dietil éter; preferentemente hexano, cloroformo y metanol.

55 En otra realización más de la presente invención, se utilizan corrientes de subproductos de biodiésel para la producción de biopolímeros de PHA, biogas, gasificación, fertilizante, suministro de agua, carotenoides y para la preparación de briquetas.

Breve descripción de la invención

60 Se seleccionaron unos pocos sitios que mostraban alguna probabilidad de obtener las microalgas deseadas mediante las imágenes observadas en el programa informático Google Earth. Uno de los sitios se localizó en la longitud 700 54,959' E y en la latitud 200 42,391 N (sitio 1), y otro sitio localizado a una longitud 68° 59,876' y latitud 22023,975 (sitio 2), India. Mostró un denso lecho de microalgas en flotación. En el examen microscópico (morfología) del lecho se reveló que el lecho contenía diversas especies de microalgas entre las que se descubrió que *Microspora sp.* y *Cladophora sp.* con N° de acceso de la ATCC PTA-12199 eran dominantes. Los métodos disponibles para producir biodiésel a partir de algas requieren mucha energía. De este modo, se han hecho intentos

65 de desarrollar un proceso económico para producir biodiésel a partir de una asociación de un lecho de microalgas marinas así como la cepa aislada y cultivada en masa de *Chlorella variabilis* con N° de acceso de la ATCC PTA-

12198.

La utilización de lechos de microalgas que contienen *Microspora* y *Cladophora* spp. con N° de acceso de la ATCC PTA-12199 (dominantes, procedentes de los sitios 1 y 2 respectivamente) para la producción de biodiésel con un proceso integrado es única. El lecho natural se disemina ampliamente y se encuentra que se regenera en unas pocas semanas después que se ha cosechado. Además, se ha observado que se regeneran en otros muchos sitios experimentales. Se ha encontrado que el lecho de la asociación dominante de *Microspora* y *Cladophora* spp. con N° de acceso de la ATCC PTA-12199 sobrevive y crece en una gama variable de parámetros ambientales.

10 **Características novedosas de la invención:**

Las principales etapas inventivas son las siguientes:

- 15 • Reconocer que la recogida de algas requiere un consumo alto de energía y aprovechar las ventajas del ingenio de la naturaleza al crear lechos de microalgas marinas que contienen lípidos en flotación tales como los que incluyen *Microspora* sp. (con n° de acceso de la ATCC PTA-12197) y *Cladophora* sp. (PTA 12199) como especies dominantes que pueden retirarse sencillamente de la superficie del agua y procesarse adicionalmente.
- 20 • Reconocer que aunque determinadas condiciones naturales conducen al crecimiento natural de lechos de microalgas marinas, este tipo de crecimiento natural está confinado a determinados periodos específicos tales como unos pocos meses después del monzón y su incidencia es escasa durante otros meses tales como los meses de verano. Reconocer además que, después de mucho trabajo, no es siempre fácil simular dichas condiciones naturales y que otras variedades de microalgas marinas pueden ser más adecuadas para el cultivo.
- 25 • Reconocer que si se deben cultivar microalgas marinas para suplementar las fuentes naturales y también para conseguir una cosecha durante todo el año, entonces, una solución útil es cosechar de la naturaleza de una manera sostenible durante el periodo posterior al monzón y, posteriormente, recurrir al cultivo de microalgas marinas en estanques salinos solares que puede proporcionar una oportunidad ideal para un cultivo a gran escala dado que como máximo el 50 % de la tierra disponible para la producción de sal en la India se mantiene en barbecho y por tanto se le puede dar un uso productivo.
- 30 • Identificar *Chlorella variabilis* (con número de accesos de la ATCC PTA 12198) en aguas indias como una variedad termotolerante que crece bien en condiciones autótrofas durante los meses de verano con una productividad de la biomasa seca máxima observada de 45 g/m²/día con un mínimo de entradas de nutrientes y evitar también medidas con elevado consumo de energía tales como la agitación continua que se ha adoptado en los estanques de cultivo con recirculación.
- 35 • Observar también que, en las condiciones térmicas prevalecientes durante los meses de verano, la cepa seleccionada de *Chlorella* crece y sedimenta formando por tanto una capa espesa en la parte inferior que se cosecha fácilmente después del drenaje del sobrenadante que sirve como inóculo para el lote de cultivo siguiente.
- 40 • Reconocer que puede ser factible hacer crecer la *Chlorella* incluso en meses no veraniegos mediante el uso de reflectores solares colocados en estanques salinos que aumentan la radiación incidente en el estanque y por consiguiente aumentan la temperatura y la radiación fotónica incidente, ambas de las cuales tienen un efecto positivo sobre la productividad de la biomasa y el rendimiento lipídico.
- 45 • Reconocer que los lípidos son de tipo polar y no polar y que esto último es lo que se requiere para un biodiésel útil para motores de combustión y sacrificar posteriormente el elevado rendimiento lipídico para la fracción lipídica deseable y extraer la biomasa con disolventes no polares tales como hexano y diésel en vez de los disolventes polares utilizados convencionalmente tales como metanol/cloroformo.
- 50 • Reconocer además que aunque el uso de disolvente no polar para la extracción proporciona una fracción de aceite más limpia, el desprendimiento de la pared celular de microalgas es menos eficaz; de acuerdo con ello, suministrar un chorro de vapor como pretratamiento antes de la extracción; reconocer además que dichos procesos serían más eficaces desde un punto de vista energético si están impulsados por energía solar.
- 55 • Utilizar medios sencillos tales como la filtración con tierra de greda para refinar el aceite bruto y usar por tanto métodos convencionales de transesterificación catalizada por bases tales como los descritos en la técnica anterior para la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos útiles para motores de combustión.
- 60 • Producir ésteres metílicos procedentes de microalgas marinas tanto cosechadas de manera natural como cultivadas que tuvieran calidad adecuada para su uso en un vehículo diésel normal.
- 65 • Utilizar el subproducto de la corriente de glicerol procedente de la producción de biodiésel de microalgas marinas como nutriente para mejorar la productividad de la biomasa y el contenido lipídico en condiciones mixotróficas

como se describe en la técnica anterior.

- Utilizar la biomasa residual después de la extracción lipídica para diversas aplicaciones tales como estiércol, fuente de carotenoides, suministro de agua, fuente de energía, etc.
- Se utilizan aguas residuales domésticas y sales marinas brutas con un contenido bajo en NaCl pero alto en nutrientes tales como calcio, magnesio, y sulfato como suplemento del medio para el crecimiento del lecho de microalgas y cultivos de microalgas marinas aisladas.

10 Ejemplo 1

Con la ayuda de Google Maps (RTM) se emprendió una búsqueda de zonas verdes en las aguas costeras que pudieran ayudar a los inventores a identificar posibles lechos de microalgas en flotación. Se encontraron algunas zonas verdes prominentes en las regiones costeras de Goa (Madkai; 15° 41,0616' N, 73° 95,6227' E), Kerala (Vellanathuruthu Road; 90° 1,6659' N, 76° 52,5022' E), West Bengal (Port Canning, 22° 31,5577' N, 88° 67,3307' E; Dongajora, 22° 13,2696' N, 88° 60,2676' E; refinería de Haldia, 22° 04,9408' N, 88° 07,308' E), Diu (carretera secundaria de Nagoa, 70° 54,959' E, 20° 42,391 N) y Gujarat (Okha, 68° 59,876', 22° 23,975'). Se llevó a cabo la comprobación sobre el terreno de los sitios identificados en Diu y Gujarat y por supuesto se encontraron lechos de microalgas en flotación de color verde.

20 Ejemplo 2

Se recogieron los lechos del Ejemplo 1 y se observaron bajo el microscopio (Carl Zeiss Axio Imager a 40x) para la identificación taxonómica. Ambos lechos revelaron una asociación de microalgas que estaba dominada por la familia *Chlorophyceae*. Las recogidas en 70° 54,959' E, 20° 42,391 N tenían *Microspora* como forma dominante mientras que las recogidas en 68° 59,876', 22° 23,975' estaban dominadas por *Cladophora*. Se llevó a cabo el aislamiento de las especies asociadas de la asociación utilizando el método de las diluciones en serie. Se lavó el lecho de algas con agua destilada para eliminar la suciedad y las impurezas adheridas y se sometió adicionalmente a centrifugación. Se recogió el sobrenadante y se inoculó en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos con diferentes medios de cultivo (BG-11, BBM, Zarrouk, ASN-III, etc.). Se llevó a cabo la dilución en serie utilizando una dilución 1:10. Las placas de cultivo de tejido se mantuvieron con luz artificial (300 lux) en un ciclo de luz y oscuridad de 12 h a 25 °C. Tras un crecimiento visible, el cultivo enriquecido se distribuyó en forma de rayas en placas de agarosa sólida al 1 %. Las placas Petri se incubaron con luz artificial (300 lux) en un ciclo de luz y oscuridad de 12 h a 25 °C. El cultivo aislado se inoculó asépticamente en medio líquido y se mantuvo con luz artificial (300 lux) en un ciclo de luz y oscuridad de 12 h a 25 °C. Los lechos de las dos localizaciones anteriores se liofilizaron y se enviaron al Centro de Recogida de la American Tipe Culture (ATCC) para ensayo de viabilidad antes de la asignación de los números de acceso. Uno de los lechos que tenía *Cladophora* como cepa que contenía lípidos dominante recibió de la ATCC el N° de acceso PTA-12199 mientras que el ensayo de viabilidad del otro lecho que tenía *Microspora* como cepa que contenía lípidos dominante está en curso.

40 Ejemplo 3

Se retiraron de la superficie lechos de microalgas marinas de origen natural del sitio dominado por microalgas con longitud 70° 54,959' E y Latitud 20° 42,391 N. Se visitó el sitio después de 3-4 semanas de forma regular para estudiar el recrecimiento de los lechos. Durante la estación veraniega, la productividad de la biomasa fue de 22,22 g/m²/día y el contenido total de lípidos fue del 10 %; durante el monzón, la productividad de la biomasa fue de 6,03 g/m²/día y el contenido de lípidos totales fue de 9,61 %, y durante el invierno se consiguió una productividad de la biomasa de 16 g/m²/día y un contenido de lípidos totales del 12,85 %. Este ejemplo enseña que es factible cosechar lechos de microalgas de origen natural de manera sostenible.

50 Ejemplo 4

Se estudió el efecto de la radiación solar elevada sobre la productividad de la biomasa de ATCC-*Chlorella variabilis* durante el invierno (temperatura del aire, 25-30 °C) en tanques abiertos. Se inocularon dos tanques que tenían un área de 1,51 m² y una profundidad de 0,3 m que contenían 200 l de medio de agua de mar con un 10 % de inóculo de cultivo de *Chlorella* (DO 540 nm = 1,65). El rendimiento de la biomasa seca después de 14 días fue de 5,03 g/l con reflectores mientras que el rendimiento fue de 4,07 g/l en el tanque de control. Este ejemplo enseña el efecto beneficioso que pueden tener los reflectores solares en el proceso de cultivo, especialmente cuando la temperatura ambiente es menor que la óptima.

60 Ejemplo 5

Se llevó a cabo un cultivo en masa de *Chlorella variabilis*, con N° de acceso de la ATCC PTA-12198 en la granja salina experimental del Instituto (21° 47,488' N 72° 07,316' E Elevación: 28 % en pies (metros)). Se llevó a cabo el cultivo durante los meses de marzo-junio. La temperatura exterior durante el cultivo fue de 45±3 °C. Se necesitó para este fin que el cultivo creciera en primer lugar en dos tanques con un área de 18 m² cada uno que se utilizaron en

5 primer lugar como tanques de inóculo. Los tanques se controlaron regularmente midiendo el pH, la DO a 540 nm y el rendimiento de la biomasa. Después de alcanzar una concentración celular de 5 g/l (base húmeda), se usó el cultivo para inocular 7 tanques más con un área de 18 mm² cada uno y 3 tanques con un área de 90 m² cada uno. El pH, DO a 540 nm, rendimiento de la biomasa y los parámetros ambientales se controlaron regularmente. Los tanques se agitaron manualmente (tres veces al día) utilizando una tubería hueca atada con cuerdas en sus extremos durante un máximo de 18 días. Después de 20 días de cultivo, se observó que la biomasa sedimentó automáticamente formando una capa espesa en la parte inferior de los tanques. En la siguiente tabla se proporcionan datos sobre la productividad de la biomasa.

Estanque	Volumen (l)	Biomasa seca (kg)	Productividad de la biomasa (g/m ² /d)
P2	5000	11,75	32,64
P3	5000	9,8	27,22
P4	5000	8,4	23,33
P5	5000	10,08	28
P10	5000	7,5	20,83
P11	5000	13,95	38,75
P12	5000	4,2	11,67
XL1	20000	52,1	28,94
XL2	20000	73,8	41
XL3	20000	56,2	31,22

10 Se transfirió el sobrenadante de cada tanque a un tanque vacío y se recogió la biomasa sedimentada que se secó al sol. Este ejemplo enseña la factibilidad de cultivar *Chlorella variabilis* (Nº de acceso de la ATCC PTA-12198) en estanques salinos solares.

15 **Ejemplo 6**

Se repitieron los experimentos del Ejemplo 5 en dos estanques adicionales. 25 kg de bicarbonato de sodio, 6 kg de nitrato de sodio y 62,5 g de sulfato ferroso se añadieron a 5000 l del medio de cultivo de agua de mar. Se encontró que la productividad de la biomasa aumentaba como se puede observar en la siguiente tabla.

20

Estanque	Volumen (l)	Biomasa seca (kg)	Productividad de la biomasa (g/m ² /d)
P6	5000	16,2	45
P8	5000	16,4	45,56

Este ejemplo enseña que se puede aumentar la productividad de la biomasa mediante la adición de determinados nutrientes críticos al medio de agua de mar.

25 **Ejemplo 7**

Se llevó a cabo la extracción de lípidos con hexano en los lechos de microalgas cosechados de origen natural. Se usó hexano como disolvente. Los datos se proporcionan en la siguiente tabla. Como se puede observar, el contenido lipídico varió de 5 a 16 %.

30

Lote Nº	Recogida mensual de biomasa	Biomasa bruta seca al sol (kg)	% de arena en la biomasa bruta	Aceite obtenido mediante la extracción con hexano (kg)	Rendimiento del aceite en y base libre (%)
MM/NPL/2010/Lote 2	Sep-10	25,0	35,0	1,63	9,07
MM/NPL/2010/Lote 3	Nov-10	34,8	40,0	1,79	8,65
MM/NPL/2010/Lote 4	Nov-10	15,6	40,0	0,68	7,26

MM/NPL/2010/Lote 5	Nov-10	46,0	40,0	1,44	5,22
MM/NPL/2010/Lote 6	Dec-10	72,1	50,0	2,03	5,63
MM/NPL/2011/Lote 7	Abr-11	12,1	20,0	1,58	16,32

Nota: Para mm/NPL/2010/lote 2,3,4 recogida del NRS del Sitio 1, Diu; para mm/NPL/2010/Lote 5, 6, 7 recogida del NPI del Sitio 2, Diu.

Ejemplo 8

5 Se repitió el estudio del Ejemplo 7 con la biomasa de *Chlorella variabilis* de los Ejemplos 5 y 6. Los datos se proporcionan en la siguiente tabla. Este ejemplo enseña que la biomasa cultivada proporciona un rendimiento del aceite más consistente.

Lote	Mes de la cosecha	Peso en seco (kg)	Humedad (%)	Peso de aceite bruto (Kg)	Rendimiento (%)
ESF/NPL/Lote 1	11 de junio	209,9	8,0	21,45	11,11
ESF/NPL/Lote 2	11 de junio	53,0	7,8	5,45	11,15
ESF/NPL/Lote 3	11 de junio	48,0	7,1	5	11,21

Ejemplo 9

10 La siguiente tabla proporciona datos relevantes relativos a la composición de ácidos grasos de los aceites brutos de los Ejemplos 7 y 8 que se analizaron anteriormente mediante GC-MS.

Acido graso	Composición (% en peso)	
		Ejemplo 8
14:0	0,6	0,4
16:0	9,4	12,1
16:1	0,7	1,0
16:2	-	1,0
18:0	3,7	4,2
18:1	33,2	29,4
18:2	50,4	45,7
18:3(ALA)	-	4,8
20:0	0,7	-
22:0	1,3	1,4

15 **Ejemplo 10**

Se tomaron 18,738 kg del aceite obtenido en el lote 1 del Ejemplo 8 en un recipiente de acero inoxidable y se calentaron a 90 °C. Se añadieron a estos 1,8 kg de tierra de greda. Se filtró el aceite para obtener 15.916 kg de aceite clarificado. Se analizó el aceite clarificado para su contenido de AGL y se encontró que contenía un 0,6 % de AGL. Se tomaron 13 g de NaOH y se disolvieron en 65 ml de agua. La solución alcalina preparada de esta manera se añadió en el aceite clarificado y se agitó durante 15 minutos. Se filtró para eliminar el jabón. El aceite transparente filtrado pesó 15,210 kg. El aceite refinado se transesterificó utilizando 2,92 kg (3,756 l) de metanol y 399,24 g de KOH. El contenido se agitó durante 90 minutos a temperatura ambiente y se dejó que reposaran durante 60 minutos. Se separó la capa de glicerol que contenía el alcohol en exceso y se separó el KOH; el peso de la capa de glicerol fue de 4 kg. La capa de biodiésel se lavó con 682 g de glicerol y se dejó sedimentar durante 60 minutos. Se pesaron 687 g de glicerol. A continuación se lavó la capa de biodiésel con 1 l de agua hasta que se alcanzó un pH 7. Se secó calentando el contenido a 110 °C. Se analizaron 13,35 kg de biodiésel obtenido de esta manera para determinar el glicerol libre, glicerol total, humedad, viscosidad y densidad. Los datos se proporcionan en la siguiente tabla.

o.	Nombre del análisis	Resultado
1	Cantidad de aceite bruto	18,738 kg
2	Aceite obtenido tras el refinado	15,210 kg
4	B100 EMAG (metil éster de ácido graso)	13,350 kg
5.	Rendimiento de B100 EMAG con respecto al aceite bruto	71,25 % (p/p)
6.	Densidad a 25 °C a 40 °C	0,8704 g/cm ³ 0,8591 g/cm ³
7.	Rendimiento de B100 EMAG con respecto a la biomasa seca	7,92 % (p/p) 9,15 % (v/p)
8.	Viscosidad	4.8 cSt (40 °C)
9.	Glicerina total	0,15 %
10.	Glicerina libre	0,02 %
11.	CFPP	-5 °C
12.	Contenido en fósforo	5,1 ppm
13.	Kilometraje promedio del ensayo TAVERA durante 200 km a carga completa	11,2 km
14	Valor calorífico	9843 kcal/kg

Ejemplo 11

- 5 Se llevó a cabo también el estudio del Ejemplo 10 con el aceite obtenido del Lote 2 del Ejemplo 7. Los datos se proporcionan en la Tabla 6 siguiente.

Nº	Análisis	Resultado
1.	Glicerina total del biodiésel	0,1014 %
2.	Glicerina exenta de biodiésel	0,0086 %
3.	Densidad	0,872 g/ml
4.	Viscosidad 40 °C	4,5 CS (a 40 °C)
5	Valor calorífico	9879 kcal/kg

Ejemplo 12

- 10 La tabla siguiente proporciona la composición de ácidos grasos de ésteres metílicos de ácidos grasos de los Ejemplos 10 y 11, que se analizaron respectivamente mediante GC-MS. Será evidente que las composiciones son muy transparentes.

Acido graso	Composición (% en peso)	
		Ejemplo 10
16:0	9,92	6,9
18:0	2,44	3,1
18:1	28,27	32,6
18:2	59,37	57,3

15 Ejemplo 13

- 20 Los datos del Ejemplo 12 proporcionaron la confianza de que los biodiésels de microalgas marinas de los Ejemplos 10 y 11 pueden ser útiles para motores de combustión. El biodiésel B20 preparado a partir del éster metílico del ácido graso del Ejemplo 11 y el biodiésel B100 del Ejemplo 10 se utilizaron directamente en un coche TAVERA normal sin ninguna modificación cualquiera que sea. No se observó ningún tipo de problemas en el funcionamiento del vehículo y se han estimado kilometrajes similares a los del diésel fósil. Un periodista dijo lo anterior acerca del

funcionamiento del coche en el biodiésel B100 del Ejemplo 11: "Este corresponsal realizó una prueba de conducción en el Tavera que había inaugurado por el ministro. La experiencia fue equivalente a la de cualquier otro vehículo diésel, acompañada por un humo constante de un motor de combustión diésel. Los dos km que rodó alrededor del área de la Secretaría Central fueron suaves y sin ningún contratiempo." (Dinsa Sachan, "Biodiesel from microalgae becomes a reality", Down to Earth, 30 de marzo, 2012; www.down-toearth.org.in).

Ejemplo 14

Se hizo pasar vapor a 121 °C, 15 psi (206,7 kPa) de presión a través de un lecho de 30 g de biomasa de *Chlorella* con un valor calorífico de 4590 kcal/Kg durante 15 minutos. Se tomaron 10,1 g de esta muestra tratados con vapor en un cartucho de celulosa para la extracción lipídica en un Soxhlet automatizado de 150 ml de capacidad del disolvente durante 4 horas con 100 ml de hexano a 80 °. Los estudios indicaron que la extracción con hexano se convirtió en más eficaz tras el pretratamiento con vapor y la extracción completa requirió 10 horas en comparación con las 16 horas utilizadas normalmente.

Ejemplo 15

Se llevó a cabo la extracción de carotenoides en un recipiente de reacción cerrado de 1 l de capacidad con 50 g de biomasa de microalgas desaceitada del Ejemplo 8. Se llevó a cabo la extracción con 500 ml de acetona al 80 % (v/v) y se mantuvo en una habitación oscura con agitación magnética constante de 200 rpm. Tras una agitación magnética continua durante 3 horas, la solución se evaporó y el extracto de acetona libre se filtró mediante papel de filtro para obtener los carotenoides como retentato. Los carotenoides obtenidos variaron de 2-4 %.

Ejemplo 16

Producción de biogas a partir de la biomasa residual desaceitada de lecho y *Chlorella*

Se usaron las biomásas residuales de los Ejemplos 7 y 8 para la producción de biogás. Tras la generación de biogás, la suspensión de biomasa, que tenía muchos micronutrientes, carbono y nitrógeno, se puede usar como biofertilizante. La biomasa residual puede usarse también como una alimentación acuosa; contiene proteínas, hidratos de carbono y micronutrientes esenciales. Se pueden preparar briquetas de biomasa residual. La producción de biogas a partir de la biomasa de microalgas residuales, tras la extracción de aceite, es potencialmente factible y puede aumentar considerablemente el rendimiento energético de la biomasa. Por lo tanto, se ha considerado una etapa necesaria para hacer sostenible la producción de biodiésel a partir de las microalgas. (Torres y Jeison, 2010).

Se tomaron biomásas desaceitadas residuales que tenían valores caloríficos de 1884,52 kcal/kg para la torta desaceitada del Ejemplo 7 y 1679,00 kcal/kg para la torta desaceitada del Ejemplo 8. La suspensión digerida de la planta de biogás se usó como inóculo para la producción de biogas. El conjunto se dividió en tres partes (1) Digestor (5,0 l), (2) Portabotellas de vidrio (1,0 l) y (3) Botella de desplazamiento de líquidos (1,0 l). Se marcó el digestor a una capacidad de 4,0 l y sus juntas se hicieron herméticas al aire aplicando cinta de silicona y lubricante para vacío. Se rellenó un portabotellas de vidrio de 1,0 l de capacidad hasta la marca de 1 l con un reactivo coloreado. Se pegó una escala graduada sobre el anterior para medir la producción de gas con precisión. Se llevó a cabo el experimento del biogás de un modo continuo y discontinuo para cada ensayo (biomasa residual) y un digestor de control para cada uno de los procesos, continuo y discontinuo. El tiempo de retención hidráulico (TRH) para este experimento fue de 30 días y el sustrato de alimentación fue del 5 %; para el digestor continuo, se sustituyeron 134 ml (4,0 l/30 días=0,1333 o 134 ml) de la muestra con 134 ml del ensayo [como el 5 % (6,7 g) de la biomasa+ 67 ml de suspensión+ 67 ml t/p] diariamente a través del tubo de alimentación a la vez que se añadían 200 g de biomasa (5 % para 4,0 l) directamente al digestor discontinuo. Se usó una solución de activación diluida a una relación de 1:10 (comprimido multivitamina y clorhidrato de cisteína) para inducir el crecimiento de la microflora para la producción de biogas y mantener las condiciones anaerobias. La suspensión del efluente resultante se analizó diariamente para determinar parámetros del tipo de sólidos totales, sólidos volátiles totales, pH, conductividad eléctrica, carbono orgánico total, nitrógeno disponible y fósforo disponible. Se midió también diariamente la producción total de biogás. La producción de biogás diaria promedio en el digestor de la biomasa desaceitada del Ejemplo 7 y 8 fue de 426,26 y 446,02 ml d⁻¹, respectivamente, para el proceso discontinuo y 270,51 y 473,15 ml d⁻¹ para el proceso continuo.

Ejemplo 17

El subproducto del biodiésel de microalgas que contenía glicerol bruto se utilizó como fuente de nutrientes para el crecimiento mixotrófico, y heterotrófico de *Chlorella variabilis*, donde todos los matraces contenían 100 ml de medio de agua de mar con una variación de desechos residuales del biodiesel de algas (ABWR) para el crecimiento mixotrófico a temperatura ambiente. Tras la inoculación, la DO es de 0,5 a 540 nm. Después de 8 días se observó que la productividad de la biomasa era máxima para 5 g/l de ABWR (mixotrófico). Este ejemplo enseña la utilidad de la corriente de glicerol bruta en el aumento de productividad de la biomasa.

Ejemplo 18

Se usó la biomasa de microalgas agotada como biofertilizante para estimular el crecimiento y puede sustituir a los fertilizantes químicos. El contenido de NPK es 1,2: 0,03: 0,6 (%) para *Cladophora*, 1,4: 0,01: 1,1 (%) para *Microspora* y 2,19: 0,01: 1,0 (%) para *Chlorella*. Se llevaron a cabo los experimentos en dos parcelas para el cultivo de maíz, cada una con 6 surcos para el control (K_2O) y 4 surcos para *Cladophora*, *Microspora* y *Chlorella* para una base de nutrientes equivalente (K_2O). Se midieron la altura de la planta, número de hojas por planta, número de mazorcas por planta, la longitud y la anchura de las mazorcas y el índice de clorofila después de ocho semanas de crecimiento. los resultados muestran que *Chlorella* proporcionó los mejores resultados con una altura de la planta promedio de $167,8 \pm 7,34$ cm, $14,8 \pm 0,583$ hojas por planta, 2 mazorcas por planta, longitud de la mazorca $32,0 \pm 0,84$ cm, anchura de la mazorca $7,24 \pm 0,24$ cm y $49,31 \pm 0,03$ de índice de clorofila (OptiSciences CCM-200, EE.UU) en comparación con el control (fertilizante químico K_2O) altura de la planta $158,4 \pm 2,79$ cm, $13,6 \pm 0,4$ hojas por planta, $1,6 \pm 0,25$ mazorcas por planta, longitud de la mazorca $28,6 \pm 0,75$ cm, anchura de la mazorca $7,24 \pm 0,24$ cm y $40,25 \pm 1,97$ de índice de clorofila. Se observó un aumento del 16,43 % en el rendimiento cuando se usó *Chlorella* como biofertilizante en vez de K_2O (control). Este ejemplo enseña una utilidad adicional de la torta desaceitada.

Ejemplo 19

La torta desaceitada del Ejemplo 8 tenía un valor calorífico de 1765,91 kcal/kg. Las algas se mezclaron con un 10 % en peso de excrementos de vaca secos, se convirtieron en briquetas hechas a mano de un diámetro de 4 cm y una profundidad de 2 cm y se sometieron a secado al sol al aire libre. A continuación se introdujeron 30 kg de dicha biomasa seca en el gasificador de biomasa de 15 Kg/h instalado en el local del Instituto ESF. Después de aproximadamente 10 minutos de funcionamiento del gasificador, se observó el componente de combustible del gas productor utilizando un analizador de gas en línea. El gas ardió con una llama amarilla. Este ejemplo enseña que la torta desaceitada se puede usar también en un gasificador de biomasa.

Hora	Monóxido de carbono	Metano	Hidrógeno
4.15 P.M	0,30	0,23	2,52
4.20 P.M	0,33	0,25	2,67
4.25 P.M	0,33	0,30	3,13
4.30 P.M	0,35	0,32	3,79

Las ventajas de la presente invención son:

- La presente invención proporciona una opción de bajo coste para generar una biomasa de microalgas marinas cosechando lechos de origen natural de dichas algas de una manera sostenible.
- La invención tiene también la ventaja de que se ha descubierto una *Chlorella sp.* termotolerante que se puede cultivar en estanques salinos solares abiertos incluso en condiciones veraniegas calurosas con una elevada productividad de la biomasa y un buen contenido de lípidos.
- La invención tiene la ventaja de que se requieren mínimas entradas de nutrientes y energía para el cultivo de la biomasa.
- La invención tiene también la ventaja de que la biomasa se puede recoger con facilidad.
- La invención tiene la ventaja adicional de que solamente la porción útil de los lípidos adecuada para la producción de biodiésel se extrae selectivamente con la ayuda de un disolvente no polar.
- La invención tiene la ventaja adicional de que se utilizan métodos sencillos para refinar el aceite bruto que se obtiene mediante la extracción con un disolvente no polar y posteriormente el aceite se procesa fácilmente en un biodiésel de alta calidad mediante métodos conocidos.
- La invención tiene la ventaja adicional de demostrar que dicho éster metílico obtenido de fuentes de microalgas marinas puede utilizarse incluso en estado puro (B100) para hacer funcionar un vehículo diésel normal sin ninguna modificación del motor de combustión.
- La invención tiene la ventaja adicional de demostrar la utilidad directa y/o la valiosa adición de determinadas corrientes de productos simultáneos.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la producción de un éster metílico de ácido graso (EMAG) útil para motor de combustión para su uso como biodiésel, el proceso comprende las etapas de:

- (i) recoger lechos de microalgas marinas de origen natural seleccionadas entre el grupo que consiste en *Microspora sp.* y *Cladophora sp.* y *Chlorella variabilis* cultivada y obtener la biomasa de algas;
- (ii) secar al sol la biomasa hasta un nivel de humedad residual del 5-10 %;
- (iii) pretratar la biomasa de la etapa (ii) mediante un chorro de vapor o un choque osmótico para romper la pared celular;
- (iv) extraer los lípidos de la biomasa de algas de la etapa (iii) utilizando hexano como disolventes u opcionalmente con diésel, donde el combustible es para usarse en forma de mezcla para obtener un aceite bruto;
- (v) eliminar el hexano mediante arrastre con aire y tratar el aceite bruto resultante con tierra de greda o tratar opcionalmente el extracto de la etapa (ii) directamente con tierra de greda para eliminar los fosfolípidos, pigmentos y otras impurezas;
- (vi) filtrar para eliminar los sólidos en suspensión y tratar el extracto oleoso de la etapa (v) adicionalmente para reducir el contenido de ácidos grasos libres (AGL), si se requiere para obtener aceite refinado;
- (vii) acometer la transesterificación catalizada por álcali del aceite refinado de la etapa (vi), separar los EMAG y purificarlos adicionalmente para obtener EMAG útiles para un motor de combustión.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 donde el lípido se extrae de un lecho de microalgas marinas que comprende *Microspora sp.* (Número de acceso de la ATCC PTA-12197) mediante la extracción con hexano, teniendo el lípido la composición analizada mediante GC-MS: 0,6 % de ácido graso 14:0, 9,4 % de ácido graso 16:0, 0,7 % de ácido graso 16:1, 3,7 % de ácido graso 18:0, 33,2 % de ácido graso 18:1, 50,4 % de ácido graso 18:2, 0,7 % de ácido graso 20:0, 1,3 % de ácido graso 22:0.

3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 donde el lípido se extrae de las microalgas marinas *Chlorella variabilis* (Número de acceso de la ATCC PTA 12198), mediante la extracción con hexano, teniendo el lípido la composición analizada mediante GC-MS: 0,4 % de ácido graso 14:0, 12,1 % de ácido graso 16:0, 1,0 % de ácido graso 16:1, 1,0 % de ácido graso 16:2, 4,2 % de ácido graso 18:0, 29,4 % de ácido graso 18:1, 45,7 % de ácido graso 18:2, 4,8 % de ácido graso 18:3, 1,4 % de ácido graso 22:0.

4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 donde el lípido se extrae del lecho de microalgas marinas que comprende *Chlorella sp* (Número de acceso de la ATCC PTA 12199) mediante la extracción con hexano, teniendo el lípido la composición analizada mediante GC-MS: 0,9 % de ácido graso 14:0, 0,4 % de ácido graso 15:0, 21,5 % de ácido graso 16:0, 1 % de ácido graso 16:1, 2,9 % de ácido graso 18:0, 21,2 % de ácido graso 18:1, 22,3 % de ácido graso 18:2, 0,5 % de ácido graso 20:0, 16,3 % de ácido graso 20:1, 0,4 % de ácido graso 22:0, 11,4 % de ácido graso 22:1, 0,7 % de ácido graso 24:0, 0,6 % de ácido graso 24:1.

5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 2, donde la fracción lipídica obtenida de *Microspora sp.* se refina y transesterifica para obtener un EMAG que tiene una composición analizada mediante GC-MS que comprende 9,92 % de ácido graso 16:0, 2,44 % de ácido graso 18:0, 28,27 % de ácido graso 18:1, 59,37 % de ácido graso 18:2, y 5-30 ppm de antioxidante BHT; opcionalmente en el que, el EMAG es un líquido de color amarillo transparente que tiene una densidad de 0,872 g/ml, viscosidad 4,5 cSt (a 40 °C), 0,1014 % de glicerol total y 0,0086 % de glicerol libre y el valor calorífico medido con el ensayo calorimétrico normalizado es de 9879 kcal/kg.

6. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 5-6 donde dicho EMAG se usa en un vehículo diésel normal sin modificar como una mezcla B20 en un estado de carga completa y cumpliendo los requisitos de emisiones.

7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 3, donde la fracción lipídica obtenida de *Chlorella variabilis* (Número de acceso de la ATCC PTA 12198) se refina y transesterifica para obtener un EMAG que tiene una composición analizada mediante GC-MS que comprende 6,9 % de ácido graso 16:0, 3,1 % de ácido graso 18:0; 32,6 % de ácido graso 18:1, y 57,3 % de ácido graso 18:2, y 5-30 ppm de antioxidante BHT; opcionalmente en el que, el mencionado EMAG es un líquido de color amarillo mostaza transparente que tiene una densidad a 25 °C y 40 °C de 0,8704 y 0,8591 g/cm³, respectivamente; viscosidad a 40 °C, 4,8 cSt; glicerina total, 0,15 %; glicerina libre, 0,02 %; CFPP, contenido de humedad, 0,029 %; -5 °C; fósforo, 5,1 ppm; estabilidad a la oxidación, 0,43 años (25 °C) y 0,12 años (40 °C) y el valor calorífico medido mediante el ensayo calorimétrico normalizado es de 9843 kcal/kg.

8. El proceso reivindicado en las reivindicaciones 8-9 donde dicho EMAG se usa en un vehículo diésel normal sin modificar como biodiésel B100 en condiciones de carga completa y cumpliendo los requisitos de emisiones.

9. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, 5-7 y 11 y donde el rendimiento lipídico con la extracción con hexanos de los lechos de *Microspora sp.* está en el intervalo del 5,22-16,32 %.

10. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1, 3, 8-10 y 12-13 donde el rendimiento lipídico con la extracción de hexanos de los lechos de *Chlorella variabilis* (Nº de acceso de la ATCC PTA 12198) cultivada está en el intervalo

ES 2 530 947 T3

del 11,11-11,21 %.

- 5 11. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1, 3, 8-10, 12-13 y 15 donde la velocidad de crecimiento y el rendimiento lipídico de *Chlorella variabilis* se ven afectados por la adición de 3-6 kg de bicarbonato de sodio, 1-2 kg de nitrato de sodio y 0,01-0,02 kg de sulfato ferroso por 1000 l de medio de cultivo de agua de mar.
- 10 12. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1, 3, 8-10, 12-13 y 15-16 donde se añade opcionalmente glicerol bruto procedente de las corrientes de subproductos del proceso EMAG para aumentar la productividad de la biomasa en un 50-200 %.
- 15 13. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-18, donde la biomasa residual tras la extracción del lípido mediante el disolvente se utiliza en la producción de biofertilizantes, suministro de agua, fuente de carotenoides y fuente de energía.
- 15 14. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-18, donde las corrientes de subproductos de glicerol bruto se utilizan para la productividad de algas mediante crecimiento mixotrófico y/o para la producción de biopolímeros biodegradables.