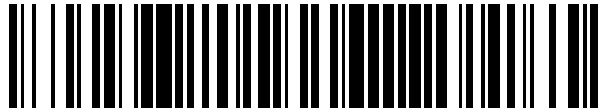


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 317**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/06** (2006.01)

**C12P 7/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2010 E 10760105 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2475776**

54 Título: **Procedimiento de producción integrada de etanol y savia de algas marinas a partir de *Kappaphycus alvarezii***

30 Prioridad:

**07.09.2009 IN DE18392009**

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

**25.01.2016**

73 Titular/es:

**COUNCIL OF SCIENTIFIC&INDUSTRIAL  
RESEARCH (AN INDIAN REGISTERED BODY  
INCORPORATED UNDER THE REGISTRATION  
OF SOCIETIES ACT (ACT XXXI OF 1860) (100.0%)  
Anusandhan Bhawan 2 Rafi Marg  
New Delhi 110001, IN**

72 Inventor/es:

**MODY, KALPANA, HARESH;  
GHOSH, PUSHPITO, KUMAR;  
SANA, BARINDRA;  
GNANASEKARAN, G.;  
SHUKLA, ATINDRA, DINKERRAY;  
ESWARAN, K.;  
BRAHMBHATT, HARSHAD, RAMANBHAI;  
SHAH, BHARATIBEN, GUNAVANTRAY;  
THAMPY, SREEKUMARAN y  
JHA, BHAVANATH**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 557 317 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

Procedimiento de producción integrada de etanol y savia de algas marinas a partir de *Kappaphycus alvarezii*

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento integrado para la producción de etanol y savia de algas marinas a partir de *Kappaphycus alvarezii*. Más específicamente, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de etanol a partir de algas marinas rojas ricas en ficocoloide, *Kappaphycus alvarezii*.

**Antecedentes de la invención**

10 Hoy día, el etanol es un producto importante por su alta demanda en el mercado de combustibles. Este mercado ha crecido desde menos de 1000 millones de litros en 1975 a más de 39.000 millones de litros en 2006 y se espera que alcance los 100.000 millones de litros en 2015 (Litch 2006). La producción global de etanol se ha más que doblado entre 2000 y 2005, mientras que la producción de biodiésel, partiendo de una base mucho más pequeña, se ha expandido casi cuatro veces. En contraste, la producción de petróleo mundial se ha incrementado únicamente un 7 % durante el mismo periodo. Menos del 4 % del etanol se produce sintéticamente a partir de petróleo, mientras que el resto se produce por fermentación a partir de fuentes biológicas. Ahora el etanol se produce a partir de dos grupos principales de fuentes biológicas: sustancias de azúcar y materiales amiláceos. Existe competencia entre estas dos materias primas para la producción de etanol combustible. Las sustancias de azúcar fueron la materia prima para más del 60 % de la producción del etanol combustible a comienzos de la década del 2000, pero su cuota se redujo al 47 % para 2006, cuando el grano supuso el 53 % de la producción (Licht 2006, "World ethanol markets: The outlook to 2015", Tunbridge Wells, informe especial Agra Europe, RU).

20 La producción y uso de biocombustibles ha entrado en una nueva era de crecimiento global. Los dos biocombustibles principales en uso hoy día son el etanol y el biodiésel. El etanol se mezcla fácilmente con gasolina, y el biodiésel se mezcla con diésel a base de petróleo para su uso en motores convencionales de combustible diésel. El etanol supone actualmente más del 90 % de la producción de biocombustibles totales, con el biodiésel que constituye el resto. El etanol tiene un mercado potencial tan grande como el mercado del petróleo. Potencialmente puede sustituir todo el mercado de combustible para la gasolina. El metanol o el etanol también se usan para la fabricación de biodiésel, durante el procedimiento de transesterificación.

30 Prácticamente, todo el etanol combustible se produce mediante fermentación de azúcar de maíz y desechos de caña de azúcar. Las cantidades de sustancias de azúcar y grano están limitadas en todo el mundo y son materias primas relativamente caras para la producción de etanol. La producción de bioetanol usando estas sustancias entra en competencia con el alimento humano que en el futuro puede dar lugar a un incremento en el precio del grano y el azúcar a niveles superiores. Los biocombustibles a base de etanol en general se obtienen de la fermentación de los carbohidratos presentes en el maíz y la soja, que son baratos de producir. No obstante, el cultivo de estas cosechas requiere grandes superficies de tierra que pueden desplazar la superficie cultivada necesaria para alimentos.

35 Debido a la disponibilidad limitada de tierra agrícola es esencial que no ignoremos el potencial del entorno marino como fuente de biomasa para la producción de etanol. Se sabe que las macroalgas se pueden cultivar fácilmente, crecen de forma prolífica y secuestran el carbono. Además, el acuicultura de algas marinas reduce la contribución a la eutroficación de los mares y por tanto se puede usar para mitigar los efectos de fuentes de agua residuales efluentes e industriales de residuos nitrogenados tales como los que tienen su origen en acuicultura de peces que contribuyen al mantenimiento o la mejora de la biodiversidad.

40 Las macroalgas, conocidas más habitualmente como "algas marinas", son un grupo diverso de plantas marinas de crecimiento rápido y aparecen como formas unidas a rocas tanto en aguas intermareales como en aguas submareales poco profundas. Estas plantas al ser autótrofas usan la energía del sol para combinar el agua con el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y producir carbohidratos y en última instancia biomasa. Esta biomasa se recoge por todo el mundo como fuente alimentaria así como materiales de exportación para la producción de ficocoloides. Las algas marinas se cultivan de forma comercial en diversos países asiáticos tales como China, Japón, Filipinas y Corea puesto que la demanda de algas marinas y productos a base de algas marinas supera la oferta a partir de fuentes silvestres. Además, el incremento de la demanda comenzó a espolear la investigación y desarrollo de procedimientos de cultivo así como de procedimientos de extracción para la producción y utilización sostenible de fuentes de algas marinas. Estas algas marinas se pueden cultivar a escala comercial en el mar en donde la superficie es ilimitada y se puede genera una cantidad enorme de biomasa sin prácticas agrícolas precisas.

50 Estas algas marinas se pueden usar para la producción de biocombustible, específicamente para la producción de bioetanol puesto que son más adecuadas para la producción de bioetanol en comparación con la producción de biodiésel por las razones siguientes:

1. El contenido de carbohidratos de algunas de las algas marinas es muy elevado.
2. El contenido de lípidos (aceites) en las algas marinas es inferior en comparación con el contenido de carbohidratos lo que las hace menos adecuadas para la producción de biodiésel.
3. Para la producción de etanol, se pueden usar algas marinas secas/semi-secas o frescas. No requieren

ningún pretratamiento como el secado.

4. La extracción de aceite es necesaria para la producción de biodiésel, para lo cual el material se debe secar, lo que supone un consumo energético.

5. El CO<sub>2</sub> generado mediante la fermentación de etanol se puede usar como materia prima de algas.

- 5 Las algas rojas son algas marinas importantes a nivel global con una alta velocidad de crecimiento. Son representativas de orígenes diversos; talos más complejos están formados de filamentos. Las algas rojas *Kappaphycus* y *Betaphycus* son hoy día las fuentes de carragenano más importantes usadas en la industria alimentaria. *Gracilaria*, *Gelidium*, *Pterocladia* y otras algas rojas se usan en la fabricación de agar, utilizado de forma generalizada como agente de gelificación en medios de crecimiento para microorganismos y para aplicaciones biotecnológicas. Estas paredes celulares de las algas están compuestas de polisacáridos de cadena larga como celulosa y agares/carragenanos con un uso comercial generalizado.

15 El carragenano es una familia de polisacáridos sulfatados lineales extraídos a partir de algas marinas rojas de *Kappaphycus* y *Betaphycus*. El carragenano está compuesto de ésteres de sulfato de sodio, potasio, magnesio y calcio de galactosa y unidades de 3,6-anhidrogalaactosa. Hay disponibles tres tipos básicos de carragenano, que difieren en el número y la localización del éster sulfatado. Estos polisacáridos son moléculas grandes y muy flexibles que se retuercen entre sí formando estructuras helicoidales dobles en presencia de cationes monovalentes y divalentes. Esto les proporciona la capacidad de formar una variedad de geles termorreversibles a temperatura ambiente. El contenido de carragenano varía entre el 25-35 % en base al peso seco en diferentes carragenofitas. El carragenano se usa de forma generalizada en las industrias alimentaria y farmacéutica como agentes espesantes, estabilizantes y de gelificación.

25 Hasta hace poco, la industria de las algas marinas en la India había dependido exclusivamente en la recolección de fuentes naturales. Principalmente, ésta se ha centrado en *Sargassum* (para alginatos y fertilizantes líquidos de algas marinas), *Gracilaria edulis* (para agar de baja calidad) y *Gelidiella acerosa* (para agar de calidad moderadamente superior). Todo esto ha experimentado un cambio drástico en los últimos cinco años. Por una parte, se adaptó *Kappaphycus alvarezii* en aguas de la India y se demostró que su cultivo era viable como consecuencia de una investigación de toda una década (patente de Estados Unidos n.º US6858430 con fecha de 22 de febrero de 2005). Posteriormente la tecnología fue licenciada por CSMCRI, que a su vez, ha espoleado el cultivo en Tamil Nadu por grupos de autoayuda y ONG con garantía de recompra del usuario final. En los últimos 20 años, se ha realizado el cultivo con éxito a gran escala de carragenofitas por todo el mundo incluyendo la India, y por tanto no hay escasez de algas marinas que produzcan carragenano. Dado que las algas marinas contienen más del 90 % de agua en base al peso fresco, CSMCRI inventó un procedimiento único (patente de Estados Unidos n.º 6.893.479) para licuar las algas marinas frescas sin añadir nada de agua. Mediante este procedimiento sencillo, se pueden recuperar dos productos de forma integrada, uno que es un residuo concentrado rico en carragenano y el otro que es la savia de la planta (fertilizante líquido de alga marina - LSF) rica en nutrientes primarios y secundarios de la planta. Para satisfacer la demanda agrícola, es necesaria una enorme cantidad de biomasa de *Kappaphycus alvarezii* que se pueda conseguir mediante el cultivo terrestre y marino. Después de la recuperación de la savia, se generará una gran cantidad de biomasa residual rica en carragenano. Una vez satisfecho el requerimiento de materia prima para k-carragenano, la biomasa residual se puede usar para la producción de bioetanol. Así, la recuperación de varios productos a partir de algas marinas haría el cultivo económicamente más viable. Unas buenas prácticas de cultivo pueden hacer de *Kappaphycus* una materia prima más barata para la producción de etanol. Estos desarrollos son de vital importancia desde el punto de vista de la expansión masiva de las industrias basadas en algas marinas mientras al mismo tiempo se centran en la sostenibilidad.

45 Una crítica importante a la que se enfrenta a menudo la producción de combustibles a gran escala usando cultivos alimentarios es que podría desviar la producción agrícola de cultivos alimentarios, en especial en países en desarrollo. El hecho es que los programas de cultivo de energía compiten con los cultivos de alimentos por el uso de tierra agrícola, agua, fertilizantes, mano de obra cualificada, etc., lo que da lugar a un incremento en el precio de los alimentos. Además, el cultivo de cosechas para la producción de biocombustible tendrá un impacto sobre la diversidad biológica. Por tanto, existe una necesidad urgente por identificar una fuente alternativa para la producción de bioetanol que supere todas las limitaciones. Las algas marinas son la opción ideal puesto que su crecimiento en el mar, en donde hay disponible una superficie enorme para su cultivo y debido a la alta velocidad de crecimiento, generan una cantidad enorme de biomasa sin prácticas agrícolas especiales, reduciendo así la presión sobre la tierra agrícola. Aparte de esto, son ricas en carbohidratos y por tanto una fuente ideal para la producción de bioetanol.

#### **Técnica anterior**

55 Se puede hacer referencia a la patente de Estados Unidos n.º 6.893.479 (2007) asignada a Eswaran y col., y titulada "Integrated method for production of carrageenan and liquid fertilizer from fresh seaweeds" que han desvelado un procedimiento integrado para obtener varios productos a partir de biomasa fresca de *Kappaphycus alvarezii* y así ha incrementado el valor de las algas marinas. Estos productos son i) savia, un biofertilizante líquido potencial y ii) un material residual rico en carragenano granular. Este material residual es la materia prima para la extracción de k-carragenano. El inconveniente de la patente es la utilización exclusiva de material residual para un producto, es decir, la preparación de k-carragenano. No se hace ninguna mención acerca de la utilización de material granular

rico en carragenano para la producción de etanol.

Los procedimientos para la producción de etanol a partir de algas marinas mediante hidrólisis ácida y posterior sacarificación se conocen de la técnica anterior (véase documento WO A 2009067771 y WOA 2008 105618).

5 Se puede hacer referencia a Maleszka y col., en su artículo titulado "Ethanol production from D-galactose and glycerol by *Pachysolen tannophilus*" en *Enzyme and Microbial Tech.* (1982) 4(5): 349-352 que han descrito la producción de etanol a partir de azúcares considerados previamente como no fermentables como la D-galactosa y el glicerol. Estudiaron la producción de etanol a partir de monosacáridos como la D-galactosa, D-glucosa, D-manosa o D-xilosa o glicerol. Han informado de que *Pachysolen tannophilus* convertía todos los monosacáridos principales mencionados anteriormente de la planta en etanol. También han indicado que la misma levadura tiene la capacidad de fermentar el glicerol derivado de algas en etanol. El inconveniente de este artículo es el uso de monosacáridos vegetales como sustratos para la producción de etanol. No se hace ninguna mención acerca del uso de algas marinas o polisacáridos de algas marinas para la producción de etanol.

15 Se puede hacer referencia a la patente de Estados Unidos n.º 5.270.175 (1993) asignada a M. Benjamin y titulada "Methods and compositions for producing metabolic products for algae", que desvela la formación y uso de células de macroalgas marinas transformadas para la producción de etanol. Seleccionaron *Enteromorpha sp.* en base a su rápido crecimiento y su capacidad para formar una alfombra densa en el estanque de crecimiento en dos meses. Prepararon protoplastos a partir de *Enteromorpha* y modificaron las células de las algas insertando el gen de la alcoholdehidrogenasa y/o piruvatodescarboxilasa bajo el control de un gen promotor de expresión elevada. Cultivaron transformantes que producen alcohol en 200 ml de medio de agua de mar e inundaron los cultivos con agua de mar cada 2-3 días durante cinco a siete veces en estanques poco profundos. Han informado de que la sobreexpresión de al menos una enzima en la vía metabólica de las células de alga dio lugar a la producción de productos metabólicos. Los inconvenientes de esta patente son a) el uso de algas marinas genéticamente modificadas en las que el almidón es el polisacárido principal, b) la transformación genética es un procedimiento complicado y requiere un seguimiento continuo, c) debido a la naturaleza transgénica de la planta, presenta unas normas regulatorias claras antes de su uso. No se hace ninguna mención acerca del uso de *Kappaphycus alvarezii* para la producción de etanol. Además no se produce etanol como subproducto.

30 Se puede hacer referencia a la patente de Estados Unidos n.º 5.578.472 (1996) asignada a Ueda y col., titulada "Process for the production of ethanol from microalgae" que han desvelado el procedimiento para la producción de etanol a partir de microalgas. Cultivaron *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX2247 capaz de acumular almidón en las células, recogieron las células de algas, concentraron la solución de cultivo de algas que contienen las células de algas crecidas para obtener una suspensión celular de algas y mantuvieron las células de algas concentradas en suspensión en oscuridad y atmósfera anaerobia para formar etanol a pH en el intervalo de 6,0 a 9,0. Sometieron la suspensión residual a la fermentación de metano, quemándolo para generar dióxido de carbono, que se usó en la etapa de cultivo de microalgas. Los inconvenientes son a) el uso de microalgas, b) el almidón, acumulado en las células de algas, era un sustrato para la producción de etanol, c) el procedimiento de fermentación se llevó a cabo en condiciones de oscuridad. No se hace ninguna mención acerca del uso de polisacáridos de macroalgas (ficocoloides) como sustratos para la producción de etanol.

40 Se puede hacer referencia a Hirano y col., en su artículo titulado "CO<sub>2</sub> fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation" en *Energy* (1997) 22: 137-142 que han examinado la productividad de etanol de microalgas. Después de aislar más de 200 cepas de microalgas a partir de algas marinas y seleccionarlas por su velocidad de crecimiento, contenido de almidón y productividad de etanol, se identificó *Chlorella vulgaris* (IAM C-534) como la más prometedora con respecto al contenido de almidón, es decir, 37 %. Extrajeron almidón de las células de *Chlorella*, sacarificaron el almidón, fermentaron con levaduras y obtuvieron el 65 % de conversión de etanol. También examinaron otro tipo de procedimiento de producción de etanol, es decir, la fermentación de almidón intracelular en oscuridad y condiciones anaerobias. Han informado de que todas las cepas sometidas a ensayo presentaban degradación de almidón intracelular y producción de etanol. Por último, concluyeron que la producción de etanol intracelular es más sencilla y de mayor consumo energético que el procedimiento de fermentación de etanol convencional. Los inconvenientes de este artículo son a) el uso de microalgas, b) el uso del componente extraído de las microalgas, el almidón, como sustrato; c) el uso de la fermentación de almidón intracelular en oscuridad y condiciones anaerobias. No se hace ninguna mención acerca del uso de las algas marinas o del material rico en carragenano obtenido a partir de algas marinas como sustrato para la producción de etanol.

55 Se puede hacer referencia a Ueno y col., en su artículo titulado "Ethanol production by Dark Fermentation in the Marine Green alga, *Chlorococcum littorale*" en *J. of Fermentation and Bioengineering* (1998) 86(1): 38-43 que han estudiado la fermentación en oscuridad en algas marinas verdes, *Chlorococcum littorale* poniendo énfasis en la producción de etanol. Han informado de que el 27 % del almidón celular se consumió en 24 horas a 25 °C en condiciones anaerobias en oscuridad mediante las cuales se produjo etanol, acetato, hidrógeno y dióxido de carbono como productos de fermentación. Han conseguido la máxima productividad de etanol de 450 µmol/g en peso seco a 30 °C. El inconveniente de este artículo es a) el uso de microalgas que tienen el almidón como carbohidrato; b) el procedimiento de fermentación se lleva a cabo en oscuridad y condiciones anaerobias para la producción de etanol. No usaron macroalgas, en particular algas marinas rojas. Tampoco se hace ninguna mención acerca del uso de

levaduras o bacterias para la fermentación.

Hirayama y col., en su artículo titulado "Ethanol production from carbon dioxide by fermentative microalgae" en *Studies in Surface Science and Catalysis* (1998) 114: 657-660, han descrito la producción de etanol a partir de microalgas fermentativas que fijan el dióxido de carbono. Seleccionaron más de 200 cepas de microalgas a partir de agua de mar para la fijación de CO<sub>2</sub> y la producción de etanol por auto-fermentación. Los aislados también se sometieron a ensayo para su velocidad de crecimiento, contenido de almidón, y velocidad de conversión de almidón en etanol. Seleccionaron una de las cepas excelentes, *Chlamydomonas sp.* YA-SH-1 en base a su velocidad de crecimiento más alta (30 g de biomasa seca/m<sup>2</sup>-d), contenido de almidón (30 % en base al peso seco) y mayor tasa de conversión de almidón intracelular en etanol (50 %) en oscuridad y condiciones anaerobias. Cultivaron *Chlamydomonas sp.*, la recogieron y la dejaron reposar para su auto-fermentación. Por último, extrajeron el etanol del caldo de fermentación. El inconveniente de este artículo es a) el uso de microalgas que tienen un mayor contenido de almidón; b) el uso del procedimiento de auto-fermentación en condiciones de oscuridad. No se hace ninguna mención acerca del uso de macroalgas, en particular algas marinas rojas, que tengan polisacáridos distintos al almidón, para la producción de etanol y no produjeron etanol como subproducto.

Se puede hacer referencia a Svein Jarle Horn, por su tesis doctoral titulada "Bioenergy from brown seaweeds" enviada al departamento de biotecnología de la Universidad de ciencia y tecnología de Noruega (NTNU), Trondheim, Noruega en el año 2000, que realizó una investigación acerca del uso de *Laminaria hyperborea* y *Ascophyllum nodosum* para la producción de energía. En este trabajo usaron laminaran y manitol extraídos de frondas de *L. hyperborea* como sustrato para la producción de etanol. Usó *Zymobacter palmae* para la producción de etanol a partir de manitol, que no podía utilizar laminaran. No obstante, la levadura *Pichia angophorae* fue capaz de producir etanol a partir de ambos sustratos simultáneamente. Por último, ha producido metano y etanol a partir de algas marinas pardas. Según él, la producción de energía a partir de algas marinas sería rentable si los costes de recolección fuesen bajos. Se puede indicar que los residuos de las industrias del alginato se pueden considerar como materia prima sin coste para la producción de energía. El inconveniente de este trabajo es el uso de algas marinas pardas. No se hace ninguna mención acerca del uso de algas rojas como fuente de etanol y producción de etanol como subproducto.

Se puede hacer referencia a Horn y col., en su artículo titulado "Ethanol production from seaweed extract" en *J. of Industrial Microbiology and Biotechnology* (2000) 25: 249-254, que han informado de la producción de etanol a partir de extracto de algas marinas pardas. Prepararon un extracto acuoso a partir de frondas frescas de *Laminaria hyperborea* cultivada a pH 2,0 y 60 °C durante 1 hora. El extracto contenía manitol y laminaran con un rendimiento del 2 % en base al peso fresco. Se usaron cuatro microorganismos, una bacteria y tres levaduras, para la fermentación en cultivos discontinuos y continuos. Consiguieron un rendimiento de etanol de 0,43 g/g de sustrato en el cultivo en discontinuo. El inconveniente de este artículo es a) el sacrificio de toda la planta de algas pardas, *Laminaria hyperborea* y b) el uso de extracto de algas marinas constituido por manitol y laminaran como sustrato de azúcar. No usaron algas rojas para la producción de etanol. Además, no se hace ninguna mención acerca de la producción de etanol como subproducto.

Se puede hacer referencia a Matsumoto y col., en su artículo titulado "Saccharification of marine microalgal biomass for bioethanol production using marine bacteria" en *Appl. Biochemistry and Biotechnology* (2003) 105: 247-254, que han informado del procedimiento de sacarificación de polisacáridos de microalgas marinas usando bacterias marinas. De 191 cepas de bacterias marinas aisladas, se identificó *Pseudoalteromonas undina* como cultivo bacteriano con mayor potencial con respecto a la sacarificación en condiciones salinas. Se usó una microalga verde NKG 12070, que tiene la concentración más elevada de carbohidrato intracelular tal como almidón. Después de inocular *Pseudoalteromonas undina* en la suspensión celular de algas, debido a la producción de amilasa, se observó un incremento en la concentración de azúcares reductores. Los inconvenientes son a) el uso de microalgas como materia prima en las que el almidón es el carbohidrato principal; b) el uso de un procedimiento enzimático para la sacarificación. No se hace ninguna mención acerca del uso de algas marinas para la producción de etanol.

Se puede hacer referencia a la patente de Estados Unidos n.º 6.699.696 (2004) asignada a Woods y col., y titulada "Genetically modified cyanobacteria for the production of ethanol, the constructs and method thereof" que han desvelado el procedimiento de producción de etanol a partir de cianobacterias genéticamente modificadas, en particular *Synechococcus*. Construyeron fragmentos de ADN que codifican las enzimas piruvatodescarboxilasa y la alcoholdehidrogenasa obtenidas a partir de *Zymomonas mobilis* en el plásmido pLOI295. Estas dos enzimas son necesarias para la producción de etanol a partir de piruvato, un producto de la vía glicolítica. Las células cianobacterianas recogidas se modificaron mediante la incorporación de los constructos y se inocularon en placas que contienen ampicilina para la selección de las células cianobacterianas transformadas resistentes a ampicilina. Estas células de *Synechococcus* modificadas eran capaces de producir etanol en una cantidad recuperable de al menos 1,7 µmol de etanol por miligramo de clorofila y hora. El inconveniente de esta patente es a) el uso de microalgas, en particular *Synechococcus* genéticamente modificado que requiere unos conocimientos precisos y un seguimiento continuo. No se hace ninguna mención acerca del uso de algas marinas para la producción de alcohol.

Se puede hacer referencia a la patente de Estados Unidos n.º 7.135.308 (2006) asignada a Bush y col., y titulada "Process for the production of ethanol from algae" que han desvelado un procedimiento para la producción de etanol mediante la recolección de algas acumuladoras de almidón formadoras de filamentos o formadoras de colonias a

- partir de emplazamientos de aguas naturales para formar biomasa, iniciando la descomposición celular, la fermentación y el aislamiento del etanol a partir del caldo fermentado. Mantienen la biomasa de algas en oscuridad y condiciones anaerobias para el inicio de la descomposición de biomasa seguido por la inoculación de levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces uvarum* para formar una solución de fermentación a partir de la cual se separa el etanol generado. Los inconvenientes de la patente son a) el uso de un cultivo mixto de algas puesto que usan floraciones de microalgas naturales; b) el uso del componente de algas, el almidón, como sustrato. No usaron cultivos puros de microalgas puesto que los experimentos se realizaron con floraciones de algas. No se hace ninguna mención acerca de a) la hidrólisis del almidón en azúcares sencillos antes de la fermentación y b) el uso de macroalgas para la producción de etanol y el etanol no se produjo como producto adicional.
- Se puede hacer referencia a Jessica y col., (2008) en su artículo titulado "Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pretreatments" publicado en Journal of Applied Phycology (DOI 10.1007/s10811-008-9384-7) que describe el efecto del pretratamiento enzimático de algas sobre la producción de bioetanol usando un alga parda, *Saccharina latissima* (*Laminaria saccharina*). La laminarina y el manitol son los carbohidratos principales obtenidos a partir de las feofíceas, además del ácido algínico. La cantidad de los tres carbohidratos varía con la estación y el ciclo de vida de las plantas. La laminarina está constituida por residuos de glucosa unidos en  $\beta$ -1,3 con una pequeña cantidad de uniones  $\beta$ -1,6. El polisacárido se hidroliza fácilmente con laminarinasa a diferentes condiciones de pH y temperatura. No obstante, la máxima producción de etanol (0,49 %) se obtuvo con la muestra tratada con enzima a pH 6 a 23 °C. El inconveniente del artículo es a) el sacrificio del alga marina completa; b) la generación de un alto contenido salino en el hidrolizado durante el pretratamiento debido al ajuste del pH que impide la producción de etanol; c) el etanol no se produce como producto adicional.
- Se puede hacer referencia a investigadores de la Universidad de ciencias marinas y tecnología de Tokio, Instituto de investigación Mitsubishi, en [www.pinktentacle.com/2007/03/seaweed-as-biofuel](http://www.pinktentacle.com/2007/03/seaweed-as-biofuel), marzo de 2007, que revelaron detalles de una propuesta ambiciosa de producción a gran escala de bioetanol a partir de algas marinas cultivadas. Según ellos, las algas marinas han sido el centro de discusión desde hace mucho tiempo como posible fuente de bioetanol que normalmente se prepara a partir de cultivos tales como caña de azúcar y maíz, pero la idea nunca se ha cristalizado. Según ellos, el alga marina de sargazo será cultivada a gran escala debido a su mayor velocidad de crecimiento seguido por la sacarificación enzimática de los polisacáridos de las algas como el fucoidano y el ácido algínico y posteriormente su fermentación para la producción de etanol. Según ellos, además de la producción de etanol, las algas marinas ayudarían a limpiar el Mar del Japón reduciendo el exceso de nutrientes presentes en el mar. Los inconvenientes de la propuesta son 1. El uso de algas pardas para la producción de etanol; 2. El sacrificio de toda el alga marina para la producción de etanol; 3. La sustitución del cultivo de algas alimentarias como el nori y el wakame con algas pardas de sargazo; 4. La aplicación de un procedimiento de sacarificación enzimático que es relativamente lento. No mencionan el uso de algas rojas y no se hace ninguna mención acerca de la producción de etanol como subproducto.
- Se puede hacer referencia a The professional Journal engineer en su artículo titulado "Denmark looks to turn a common seaweed into biofuel" publicado en (<http://www.ambathen.um.dk/da/menu/OmOs/Klimaforandringer/DENMARKLOOKSTO TURNACOMMONSEAWEEDINTOBIOFUEL.htm?WBCMODE=Pre%2CPresentationU> con fecha del 7 de enero de 2008 que menciona la recaudación de fondos de un proyecto para evaluar el potencial de producción de bioetanol a partir de lechuga marina (algas marinas). Menciona que un alga verde, *Ulva lactuca*, tiene potencial para la producción de bioetanol. Apunta a la observación de Michael Bo Rasmussen del National Environmental Research Institute de la Universidad de Aarhus en donde menciona la lechuga marina como una posible fuente rica para la fabricación de bioetanol a partir de una fuente de biomasa no alimentaria en lugar de a partir de cultivos de cereales tales como el maíz.
- Se puede hacer referencia a Hiroshi Yamazaki, en su artículo titulado "Japan experiments with new biofuels" en [http://bioenergy.checkbiotech.org/news/2007-06-27/japan\\_experiments\\_with\\_new\\_biofuels/](http://bioenergy.checkbiotech.org/news/2007-06-27/japan_experiments_with_new_biofuels/) con fecha de 1 de junio de 2008 que informa de que empresas japonesas han comenzado a introducir combustible de bioetanol en el mercado con la esperanza de reducir significativamente las emisiones de CO<sub>2</sub>. Además añade que la producción doméstica de biocombustible, en particular a partir de materiales comestibles, parece ser un objetivo lejano. No obstante, la experimentación prometedora con nuevos materiales, incluyendo algas marinas y desechos de madera está acaparando la atención.
- Recientemente un artículo en <http://www.eurozone-invest.com/biofuel.html> describe el uso de algas marinas o algas para la producción de bioetanol y biodiésel. De acuerdo con este, el cultivo de algas para la producción de biodiésel es más difícil, ya que requieren un entorno específico para ser muy productivas y se pueden contaminar fácilmente por especies no deseables. Por otro lado, las algas y algas marinas son ricas en azúcares complejos como el almidón, cantidad de que es más alta que el aceite presente. Este polisacárido, mediante su conversión y fermentación, se transforma en etanol.
- Se puede hacer referencia a Aizawa y col., en su artículo titulado "Seaweed Bioethanol Production in Japan - The Ocean Sunrise Project" en Oceans 2007 afirma que el proyecto tiene como objetivo producir bioetanol de algas marinas mediante cultivo y recolección de *Sargassum horneri*, utilizando 4,47 millones de km<sup>2</sup> (sexto más grande en el mundo) de áreas no utilizadas de la zona económica exclusiva (ZEE) y cinturones marítimos de Japón. También

añaden que mediante la producción de bioetanol a partir de algas marinas, el proyecto tiene como objetivo combatir el calentamiento global, aportando una energía alternativa a los combustibles fósiles. Este trabajo describe los resultados de la investigación de viabilidad del proyecto realizada por Tokyo Fisheries Promotion. El inconveniente de este artículo es a) el uso de *Sargassum horneri* para la producción de etanol. No llevan a cabo la producción de etanol y no se hace ninguna mención acerca de la extracción de galactosa a partir de compuesto intracelular de algas rojas.

El informe reciente titulado "seaweed biofuel developed" en <http://www.prensa-latinaenglish.com/article.asp?ID=%7B6392ED95-9842-486E-8B4E5-676A4FA23D61%7D> &language=EN con fecha de 2 de junio 2008 describe que el biocombustible elaborado a partir de algas marinas podría ser una alternativa al etanol, que obtenido a partir de cultivos alimentarios acarrea el aumento de los precios de los alimentos. En este artículo, Bernard Stroazzo, (presidente de Bio Fuel-System) afirma que la producción de biocombustibles a partir de algas marinas es prometedora y que el producto no afectaría al medio ambiente ni estaría en riesgo la alimentación de la población. Según él, las algas marinas tienen un sistema de fotosíntesis muy eficiente recuperando el 100 % de la energía solar en comparación con otros biocombustibles. Sin embargo, el mayor problema para los investigadores radica en la identificación de especies de algas marinas adecuadas a partir de las cuales sea posible la generación de gran cantidad de biocombustibles.

Ricardo Radulovich en su artículo titulado "Let's use seaweed as fuel" en la revista COSMOS (<http://www.cosmosmagazine.com/node/2040>) con fecha de 10 de junio de 2008 menciona que las algas marinas generalmente se utilizan como alimentos, fertilizantes y piensos para animales, pero también se pueden utilizar como combustible principal. También indica como ventajas del uso de algas marinas para la producción de biocombustibles el no requerir de suelo y agua.

Algenol, una empresa privada, se dedica a la investigación general y a esfuerzos de desarrollo de sistemas de producción a escala industrial para producir etanol a partir de algas en tierra desértica usando agua de mar y grandes cantidades de CO<sub>2</sub>. Algenol utiliza cianobacterias (algas verde azuladas) por selección natural, selección del medio ambiente, y herramientas de biología molecular para producir biocombustibles ambientalmente seguros y de bajo coste. Al igual que todas las plantas, las algas utilizan la fotosíntesis para convertir la energía solar en energía química almacenada en forma de aceites, carbohidratos y proteínas. La tecnología patentada de Algenol produce etanol a partir de cuatro fuentes renovables abundantes y prácticamente ilimitadas: Algas, luz solar, dióxido de carbono y agua de mar. Los resultados de este procedimiento son etanol, oxígeno, agua dulce y fertilizante agrícola. El procedimiento de Algenol tiene un balance energético muy positivo y no requiere de siembra, recolección, transporte de materias primas, fertilizantes basados en combustibles fósiles y no libera CO<sub>2</sub> durante el procedimiento de crecimiento o producción de etanol (<http://www.algenolbiofuels.com/default.html>). La empresa cree que su procedimiento basado en agua de mar puede generar 6000 galones por acre al año, en contraste con el maíz y la caña de azúcar que producen aproximadamente 360 y 890 galones por acre respectivamente. Durante el procedimiento, un alga consume luz solar y más del 90 por ciento del CO<sub>2</sub> del sistema a través de la fotosíntesis, en la que los azúcares se convierten en etanol. El etanol se bombea inmediatamente hacia fuera y se evapora en el biorreactor en el que se captura cada noche. El inconveniente de la invención es la utilización de las algas verdes azuladas y no de algas marinas. Además no se hace ninguna mención acerca de la producción de etanol como subproducto.

KBS World Radio publicó un informe titulado "Researchers produce bioethanol with seaweed" el 17 de junio de 2008. De acuerdo con este, el Instituto de investigación y desarrollo oceanográfico de Corea afirma que los investigadores del Instituto y la Universidad nacional de Gangwon produjeron bioetanol de forma conjunta utilizando un tipo de alga marina que se encuentra en la costa de la isla de Jeju. El instituto planea impulsar el seguimiento de la investigación para comercializar la tecnología.

De acuerdo con un informe publicado el 23 de junio de 2008, en <http://dsc.discovery.com/news/2008/06/23/ireland-seaweed-ethanol.html> de 23 de junio, citando a Discovery News en "Seaweed power: Ireland Taps new energy source", el científico irlandés Stephan Khan, jefe del Centro irlandés de algas marinas de la Universidad nacional de Irlanda en Galway, describe que Irlanda podría convertirse en un actor clave en la producción de biocombustibles a partir de algas marinas. Según él, las algas no tienen la imagen negativa de los recursos de biomasa terrestre, que se dice son responsables de los precios de los alimentos, que inciden en el uso de agua y la destrucción de las selvas tropicales. La Sociedad internacional de ficología aplicada está examinando los aspectos económicos y sociales del uso de algas marinas pardas para la producción de bioetanol.

Ray Ryan, corresponsal de agroindustria, escribió un artículo titulado "Seaweed offers bright future for biofuel industry", publicado en la página web de <http://www.examiner.ie/story/business/gbojqcwoj/rss2/> con fecha de 24 de junio de 2008. Con referencia a lo anterior, afirma que con sus ricos recursos de algas marinas sostenibles, Irlanda está a punto de convertirse en un actor importante en la próxima generación de la producción de biocombustibles.

Seaweedireland.com ha publicado un artículo sobre bio-combustible, bio-gas, electricidad y calor en <http://dezeewierwinkel.nl/bio-fuel.html> que describe que las algas marinas pueden ser descompuestas por microorganismos pequeños para producir diferentes tipos de alcohol.

**Objetivos de la invención**

El objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la producción integrada de savia de algas marinas y etanol a partir de *Kappaphycus alvarezii* que eluda los inconvenientes detallados anteriormente.

- 5 Otro objeto de la presente invención es la utilización de material residual después de la destilación de etanol, junto con  $\text{CaSO}_4$  generado durante la neutralización y descartes del procedimiento de ED que contiene  $\text{K}_2\text{SO}_4$  como sal soluble principal, como abono.

**Sumario de la invención**

Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento integrado para la producción de etanol y savia de algas marinas a partir de *Kappaphycus alvarezii*, dicho procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- 10 (a) recolección de algas rojas cultivadas del mar;  
 (b) extracción de la savia de *Kappaphycus* fresco para liberar el nutriente vegetal líquido que deja material granular residual rico en carragenano;  
 (c) lavado de los gránulos residuales para eliminar la sal y los sedimentos;  
 15 (d) hidrólisis de los gránulos ricos en polisacáridos usando ácido sulfúrico diluido en el intervalo del 0,5-5 % y calentamiento de la solución en el intervalo de 80-200 °C durante 30-90 minutos para obtener un hidrolizado rico en azúcar reductor;  
 (e) recuperación de la solución por filtración o centrifugación en el intervalo de 5000-7000 rpm durante 15 minutos;  
 (f) aumento de la concentración de azúcar en el hidrolizado mediante la adición de gránulos frescos de  
 20 *Kappaphycus alvarezii* a la solución filtrada y repetición de la etapa (d) y (e) hasta que la concentración de azúcar se encuentre en el intervalo del 2 al 10 %;  
 (g) ajuste del pH del hidrolizado en el intervalo de 4,5 a 8,0 con hidróxido de calcio;  
 (h) separación de las sales insolubles por filtración o centrifugación en el intervalo de 5000-7000 rpm durante 15 minutos;  
 25 (i) desalar el hidrolizado, para eliminar las sales solubles, por electro-diálisis;  
 (j) enriquecer el hidrolizado con fuentes de nitrógeno como peptona, extracto de levadura e hidrolizados de proteínas de pasta de *Jatropha* en el intervalo del 0,2-2,0 % y a continuación su esterilización a 121 °C durante 15 minutos;  
 (k) inoculación de *Saccharomyces cerevisiae*, n.º de cultivo NCIM 3455 (ATCC 26602) al hidrolizado enriquecido e incubación a 25-35 °C durante un periodo en el intervalo de 24 a 96 h;  
 30 (l) seguimiento de la producción de etanol;  
 (m) separación del etanol del caldo fermentado por destilación;  
 (n) concentración del etanol por destilación.

- 35 Para la producción de etanol se usan macroalgas que producen carragenano pertenecientes a la clase *Rhodophyta* y al género *Kappaphycus*, donde aparte de la savia de las algas marinas, se produce etanol como producto adicional a partir de gránulos ricos en carragenano.

- 40 En una realización de la presente invención, la etapa de sacarificación comprende la hidrólisis ácida de gránulos ricos en carragenano a temperatura elevada, en la que el polisacárido se hidroliza parcialmente a azúcares simples tales como galactosa con ácido sulfúrico diluido en el intervalo del 0,5 % al 5,0 % a una temperatura en el intervalo de 80 a 200 °C durante un periodo en el intervalo de 30-60 minutos.

En otra realización adicional de la presente invención, la concentración de azúcar reductor del hidrolizado final se incrementa del 2,0 % al 10 % mediante hidrólisis repetida de gránulos frescos en la misma solución.

En otra realización adicional de la presente invención, la solución de azúcar se mantiene en el intervalo del 2 % al 10 %.

- 45 En otra realización adicional de la presente invención, la solución de azúcar recuperada tiene un pH en el intervalo de 0,6 a 1,0.

En otra realización adicional de la presente invención, el  $\text{CaSO}_4$  insoluble generado durante el procedimiento de neutralización se elimina por filtración al vacío o centrifugación a 7000 rpm durante 15 minutos, mientras que las sales solubles se eliminan por el procedimiento de electrodiálisis.

- 50 En otra realización adicional de la presente invención, el hidrolizado se enriquece con fuentes de nitrógeno como peptona y extracto de levadura o hidrolizado de proteína de pasta de *Jatropha* a una concentración en el intervalo del 0,2-2,0 %.

- 55 En otra realización adicional de la presente invención, el cultivo activo de levadura de cerveza convencional, es decir, *Saccharomyces cerevisiae*, cultivo número NCIM 3455 (ATCC 26602) se inocula en el hidrolizado tratado en autoclave.



En otra realización adicional de la presente invención, el hidrolizado de algas marinas inoculadas se incuba en el intervalo de 25-35 °C durante un periodo en el intervalo de 24 a 96 horas en condiciones aerobias y anaerobias por fermentación de azúcar en etanol.

En otra realización adicional de la presente invención, el bioetanol se separa del caldo fermentado por destilación.

- 5 En otra realización adicional de la presente invención, el caldo fermentado restante después de la destilación, junto con el CaSO<sub>4</sub> insoluble generado durante la neutralización y los descartes del procedimiento de electrodiálisis se usan como abono.

En otra realización adicional de la presente invención, el hidrolizado final contiene galactosa como monosacárido, oligosacáridos parcialmente hidrolizados y carragenano sin hidrolizar.

- 10 En otra realización adicional de la presente invención, se usa hidróxido de calcio para ajustar el pH del hidrolizado en el intervalo de 4,5 a 8,0.

En otra realización adicional de la presente invención, el sulfato de calcio precipitado se elimina por filtración o centrifugación.

- 15 En otra realización adicional de la presente invención, el hidrolizado se desala para eliminar las sales solubles usando el procedimiento de electrodiálisis.

En otra realización adicional de la presente invención, el hidrolizado final se enriquece con peptona y extractos de levadura o hidrolizado de proteína de pasta de *Jatropha* para proporcionar una fuente de nitrógeno a los organismos fermentadores.

- 20 En otra realización adicional de la presente invención, se inocula *Saccharomyces cerevisiae*, cultivo número NCIM 3455 (ATCC 26602) en el caldo de fermentación y se incuba a 30 °C inicialmente en condiciones aerobias y a continuación en condiciones anaerobias durante un periodo que oscila entre 24-96 horas.

En otra realización adicional de la presente invención, la producción de etanol durante la fermentación se controla mediante GC-MS.

- 25 En otra realización adicional de la presente invención, el etanol se concentra y se destila a partir del caldo de fermentación.

### **Breve descripción del dibujo**

Figura 1. Diagrama de flujo esquemático del procedimiento de electrodiálisis.

### **Descripción detallada de la invención**

- 30 El objetivo de la presente invención es producir bioetanol y más específicamente es proporcionar un procedimiento para la producción de etanol mediante la fermentación de biomasa de macroalgas. La presente invención se refiere al desarrollo de un procedimiento para la producción de bioetanol usando algas rojas mediante la utilización de ficocoloides de algas rojas como material fuente. En la presente invención, por primera vez, se produce bioetanol a partir de *Kappaphycus alvarezii* como subproducto. Las algas marinas rojas son plantas marinas de crecimiento rápido que están compuestas de polisacáridos degradables, principalmente agar o carragenano.

- 35 El procedimiento del bioetanol en general está comprendido de sacarificación y fermentación. La sacarificación normalmente se realiza mediante hidrólisis ácida concentrada/diluida e hidrólisis enzimática seguida de fermentación usando bacterias o levaduras. La sacarificación se realiza sometiendo la biomasa de algas a hidrólisis ácida diluida usando ácido sulfúrico en el intervalo del 0,5 % al 5,0 % en el intervalo de 80-200 °C durante un periodo en el intervalo de 30-90 minutos. Esto da lugar a la conversión de carragenano en galactosa con la generación simultánea de sales solubles debido al alto contenido de sulfato del carragenano. La concentración de azúcares reductores del hidrolizado recuperado se incrementa al tratar la biomasa fresca en la misma solución en condiciones similares. El procedimiento se repite de 3 a 5 veces para conseguir la concentración deseada de azúcares reductores en el intervalo del 2 al 10 % que se controla espectrofotométricamente usando el procedimiento de Nelson. El incremento en la concentración de azúcar produjo un aumento en la concentración de sal soluble en el hidrolizado final. El pH del filtrado resultante se ajusta en el intervalo de 4,5 a 8,0 usando hidróxido de calcio. Los precipitados insolubles de sulfato de calcio generados durante el procedimiento de neutralización se eliminan por filtración o centrifugación en el intervalo de 5000-7000 rpm durante 15 minutos, mientras que las sales solubles se eliminan mediante el procedimiento de electrodiálisis. En este procedimiento, una pila de electrodiálisis se llenó con 5 pares de celdas de membranas de intercambio de cationes y aniones de tipo interpolimérico preparadas en este laboratorio. En la pila se empleó un flujo en paralelo. El área individual efectiva de la membrana de la pila era de 80 cm<sup>2</sup>. El hidrolizado de algas marinas se hizo circular a través de los compartimentos del producto (diluato) de la pila de ED. Al mismo tiempo se hizo circular agua a través de los compartimentos del concentrado. Todos los experimentos se realizaron con un caudal de circulación de 3,0 l/h para cada una de las corrientes de producto y de concentrado usando bombas adecuadas. Se hizo circular una solución diluida de sulfato sódico a través de los compartimentos de dos
- 50

electrodos al final para expulsar los productos de la electrodiálisis. Se aplicó un potencial eléctrico (7,5 V) entre los dos electrodos por medio de un rectificador AC/DC. Se prosiguió con la circulación de las corrientes de diluato y de concentrado hasta que el rechazo de sal disuelta total alcanza el 90-95 % de la cantidad inicial. A intervalos de corriente regulares se registró la tensión y el TDS. Al final del experimento, se analizaron muestras de ensayo de la corriente de diluato y de concentrado para el TDS, la conductividad, el pH, cloruro, sulfato, dureza, sodio, potasio, etc.

Después del procedimiento de electrodiálisis, el hidrolizado final, que contiene monosacárido, oligosacáridos parcialmente hidrolizados y polisacáridos sin hidrolizar se enriquece con fuentes de nitrógeno como peptona, extracto de levadura o hidrolizado de proteínas de pasta de *Jatropha* en el intervalo del 0,2 al 2,0 %, se introduce en autoclave y se somete a fermentación mediante la inoculación con un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*, n.º NCIM 3455 (ATCC 26602) e incubándolo a 25-35 °C durante un periodo en el intervalo de 24 a 96 h para convertir su azúcar sencillo en etanol. La producción de etanol se controla a intervalos regulares usando GC-MS (Shimadzu GC: 2010) acoplado a GC-MS (QP 2010) mediante el analizador del espacio de cabeza (AOC-5000) en el que se mide como azúcar reductor de la solución fermentada para determinar la eficacia de la fermentación. Por último, el etanol generado se separa del caldo fermentado por destilación y el material residual se usa como abono.

El bioetanol se recupera del caldo fermentado por destilación, y aunque el etanol recuperado no es de grado combustible, se puede convertir en grado combustible concentrándolo por procedimientos tales como destilación, purificación con membrana, secado químico, o una combinación de procedimientos.

Por último, la presente invención describe la producción de bioetanol como subproducto usando galactosa de algas marinas rojas.

Las etapas de la invención adoptadas en la presente invención son i) desarrollo de un procedimiento integrado para la producción de savia de algas marinas y etanol a partir de algas marinas rojas; ii) generación de etanol como subproducto; iii) uso de algas marinas rojas como materia prima para la producción de etanol; iv) uso de polisacáridos sulfatados de materia prima rica en carragenano de algas marinas rojas como fuente de etanol; v) hidrólisis de materia prima rica en carragenano con ácido sulfúrico para la conversión del polisacárido en monosacáridos; vi) incremento de la concentración de azúcar del hidrolizado mediante hidrólisis repetida de gránulos frescos en la propia solución; vii) uso de hidróxido de calcio para la neutralización; viii) eliminación del CaSO<sub>4</sub> insoluble generado mediante filtración o centrifugación; ix) desalación de las sales solubles del hidrolizado mediante un procedimiento de electrodiálisis; x) enriquecimiento del hidrolizado con fuentes de nitrógeno; xi) fermentación del caldo con un cultivo de levadura crecido de forma activa de *Saccharomyces cerevisiae*, n.º NCIM 3455 (ATCC 26602); xii) recuperación del etanol por destilación y; xiii) uso de los descartes de electrodiálisis, que contienen sulfato de potasio y sulfato sódico como fertilizante, en combinación con CaSO<sub>4</sub> generado durante la neutralización y material residual después de la destilación de etanol.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración.

#### Ejemplo 1

Después de recuperar la savia líquida a partir de *Kappaphycus* fresco, los gránulos residuales se lavaron y se secaron. El peso conocido de gránulos secos se sacarificó con ácido sulfúrico diluido a temperatura elevada durante un periodo específico. Los azúcares totales y azúcares reductores se midieron en el hidrolizado mediante el procedimiento de fenol-ácido sulfúrico y el procedimiento de Nelson, respectivamente. Las condiciones usadas para la sacarificación y el azúcar generado durante la sacarificación se detallan en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1:

Gránulos de carragenano (g)	Ácido sulfúrico (%) / vol	Temperatura (°C) / Tiempo	Azúcar total (%)	Azúcar reductor (%)
10	0,3/200 ml	121 °C/15 min	2,51	1,02
	0,5/200 ml	121 °C/15 min	2,96	1,21
	0,7/200 ml	121 °C/15 min	3,34	1,37
10	0,7/200 ml	121 °C/5 min	2,33	0,95
		121 °C/10 min	2,94	1,20
		121 °C/15 min	3,28	1,34
10	0,7/200 ml	37 °C/1 día	1,32	0,31
		37 °C/2 días	1,42	0,58
		60 °C/1 día	2,66	1,09
		60 °C/2 días	3,38	1,38
10	0,5/200 ml	100 °C/1 h	2,12	0,61

Tabla 2:

Gránulos de carragenano (g)	Ácido sulfúrico (%) / vol	Temperatura (°C) / Tiempo	Azúcar reductor (%)
3	0,5/100 ml	80/1 h	0,55
3	1,0/100 ml	80/1 h	0,52
3	2,0/100 ml	80/1 h	0,55
3	0,5/100 ml	100/1 h	0,73
3	1,0/100 ml	100/1 h	0,68
3	2,0/100 ml	100/1 h	0,76
3	0,5/100 ml	100/2 h	0,81

Como se describe en el Ejemplo 1, la menor concentración de ácido y un tiempo de extracción de materia prima rica en carragenano produjo una baja concentración de azúcar en el hidrolizado. Para conseguir una alta concentración de azúcar en el hidrolizado se realizó la extracción repetida con materia prima fresca como se describe en el Ejemplo 2.

### Ejemplo 2

Para conseguir la máxima concentración de azúcar reductor en el hidrolizado, se extrajeron 20 g de gránulos lavados y secos de *Kappaphycus alvarezii* en 1000 ml de ácido sulfúrico a 0,5 %. El hidrolizado se filtró y se añadió la misma cantidad de gránulo nuevo fresco al filtrado del ciclo anterior y se hidrolizó en condiciones similares. De forma similar, los ciclos se repiten tres veces. La concentración de azúcar obtenida durante cada ciclo se proporciona en la Tabla 3.

Tabla 3

Nº de ciclos	Peso de los gránulos (g)	Volumen de ácido/hidrolizado y concentración	Tiempo (h) / Temperatura (°C)	Vol (ml) de hidrolizado recuperado	Azúcar reductor (%)
1	20	1000 ml/0,5 %	1/100	925	0,403
2	20	925 ml	1/100	875	0,910
3	20	875 ml	1/100	840	1,6

En este caso se recuperan 13,44 g de azúcar reductor total a partir de 60 g de gránulos, que es equivalente a 48 g de carragenano (después de la eliminación de humedad y del contenido de fibras (20 %)). Así, el 28 % del carragenano se convierte en azúcar simple.

Para incrementar la eficacia de la hidrólisis y la concentración de azúcar, se usó una mayor concentración de ácido y se repitió la extracción, lo que produjo una mejor conversión de polisacárido en azúcares simples como se describe en el Ejemplo 3.

### Ejemplo 3

Para conseguir la máxima concentración de azúcar reductor en el hidrolizado, se extrajeron 50 g de gránulos frescos en 1000 ml de ácido sulfúrico al 2,5 % y se añadieron gránulos frescos al filtrado del ciclo anterior y se hidrolizaron en condiciones similares. De forma similar, los ciclos se repitieron tres veces. La concentración de azúcar obtenida durante cada ciclo se proporciona en la Tabla 4.

Tabla 4

Nº de ciclos	Peso de los gránulos (g)	Volumen de ácido/hidrolizado y concentración	Tiempo (h) / Temperatura (°C)	Vol (ml) de hidrolizado recuperado	Azúcar reductor (%)
1	50	1000 ml/2,5 %	1/100	975	1,5
2	50	975 ml	1/100	900	3,3
3	50	900 ml	1/100	850	5,2

En este caso se recuperan 44,2 g de azúcar reductor total a partir de 150 g de gránulos, que es equivalente a 120 g de carragenano (después de la eliminación de humedad y del contenido de fibras (20 %)). Así, el 36,8 % del carragenano se convierte en azúcar simple.

### Ejemplo 4

La solución sacarificada obtenida después de la hidrólisis ácida de gránulos de *Kappaphycus alvarezii* es de naturaleza ácida, cuyo pH se ajusta a 5,5-6,5 con hidróxido de calcio sólido. Los precipitados resultantes se eliminan por filtración y el filtrado se usa para la fermentación después enriquecerlo con el 0,5 % de peptona y el 0,5 % de extracto de levadura, sometiéndolo a autoclave e inoculándolo con levadura de panadería, adquirida en un mercado local y purificada sobre agar de extracto de levadura de glucosa. Los caldos inoculados (caldo 1 y caldo 2) que tienen una concentración inicial de azúcar diferente se incuban en una agitadora durante 24 horas para proporcionar, inicialmente, condiciones aerobias y a continuación se incuban adicionalmente en condiciones anaerobias y estáticas durante los siguientes dos días. Se mide la formación de etanol cada 24 horas usando GC-MS. Además, se confirma la utilización de galactosa usando HPLC cuando se deduce la desaparición del pico de galactosa en el caldo fermentado con el tiempo de incubación. La conversión de azúcar reductor, obtenido a partir de gránulos de *Kappaphycus alvarezii*, en etanol se explica en la Tabla 5. Se usó etanol convencional (0,1 %) como referencia para la medición cuantitativa. Como se muestra en la Tabla 5, solo se convierte el 17-23 % del azúcar inicial en etanol.

Tabla 5

Muestra	Conc. de azúcar inicial en el caldo (%) (A)	Producción teórica de etanol	Producción real de etanol (%) en el caldo	% de conversión en base a (A)
Caldo-1	0,5	0,25	0,056	22,4
Caldo-2	1,6	0,8	0,14	17,4

### Ejemplo 5

La solución sacarificada obtenida después de la hidrólisis ácida de gránulos de *Kappaphycus alvarezii*, que tiene una concentración inicial de azúcar diferente, es de naturaleza ácida, cuyo pH se ajusta a 5,5-6,5 con hidróxido de calcio sólido. Los precipitados resultantes eliminan por centrifugación o filtración y el filtrado se usa para la fermentación después enriquecerlo con el 0,5 % de peptona y el 0,5 % de extracto de levadura, sometiéndolo a autoclave e inoculándolo con levadura de panadería. El caldo inoculado se incubaba en una agitadora durante 24 horas para proporcionar, inicialmente, condiciones aerobias y a continuación se incubaba adicionalmente en condiciones anaerobias y estáticas durante los siguientes dos días. Se mide la formación de etanol y la utilización de azúcar reductor cada 24 horas usando GC-MS y el procedimiento de Nelson, respectivamente. La conversión de azúcar reductor en etanol se presenta en la Tabla 6.

Tabla 6

Muestra	Conc. de azúcar inicial en el caldo (%) (A)	Producción teórica de etanol	Azúcar utilizado (%) (B)	Concentración de etanol (%) en el caldo	% de conversión en base a (A)	% de conversión en base a (B)
Caldo de fermentación 1	2,3	1,15	0,96	0,184	16,0	38,0
Caldo de fermentación 2	2,82	1,41	1,1	0,1812	12,9	32,9

En este caso, solo el 32-38 % del azúcar utilizado se convierte en etanol puesto que también se producen muchos otros productos junto con el etanol, tal como butanol, metil butanol, isobutanol, acetato de etilo, éster etílico del ácido propiónico, etc. que aparecen como subproductos durante la fermentación de azúcares.

La levadura de panadería, usada para el experimento podría no ser adecuada para la fermentación de etanol y por tanto se obtuvieron dos cultivos de levadura convencionales de *Saccharomyces cerevisiae* en NCIM, NCL, (Pune, India) y los experimentos se realizaron usándolas para identificar la levadura prometedora que se describe en el Ejemplo 6.

### Ejemplo 6

La solución sacarificada obtenida después de la hidrólisis ácida de gránulos de *Kappaphycus alvarezii*, que tiene una concentración inicial de azúcar diferente, se ajusta a pH 5,5-6,5 con hidróxido de calcio sólido. Se usa la solución clara obtenida después de la eliminación de los precipitados para la fermentación después de enriquecerla con fuentes de nitrógeno tal como el 0,5 % de peptona y el 0,5 % de extracto de levadura, someterla a autoclave e inocularla con dos cultivos de levadura convencionales de *Saccharomyces cerevisiae*, cultivo número NCIM 3455 (ATCC 26602) y NCIM 3090 (ATCC 9763) obtenidos en NCL, Pune, India. El caldo inoculado se incubaba en una agitadora durante 24 horas para proporcionar, inicialmente, condiciones aerobias al cultivo y a continuación se incubaba adicionalmente en condiciones anaerobias y estáticas durante los siguientes tres días. Se mide la formación

de etanol después de cuatro días usando GC-MS junto con la medición del azúcar sin utilizar. La conversión de azúcar reductor en etanol se presenta en la Tabla 7.

Tabla 7

Tiempo	NCIM 3455				NCIM 3090		
	Conc. de azúcar inicial (%)	Azúcar utilizado (%)	Conc. de etanol (%)	% de conversión de etanol en base al azúcar utilizado	Conc. de azúcar inicial (%)	Conc. de etanol (%)	% de conversión de etanol en base al azúcar utilizado
96 horas	2,3	1,33	0,35	52,6	0,420	0,049	23,3
En este caso, se comprueba que la cepa NCIM 3455 es superior con respecto a la formación de etanol.							

### 5 Ejemplo 7

Se lleva a cabo la producción de bioetanol usando gránulos de *Kappaphycus alvarezii*. 50 g de biomasa se hidrolizan con 1000 ml de ácido sulfúrico al 2,5 % a 100 °C durante una hora. El extracto se filtra y se añaden 50 g de biomasa de algas marinas frescas al filtrado y se repite la hidrólisis en condiciones similares para incrementar la concentración de azúcar. Así, la extracción se repite tres veces usando 150 g totales de materia prima. La concentración de azúcar reductor se mide en los extractos de los tres ciclos (Tabla 8). Las soluciones sacarificadas obtenidas después de tres ciclos se neutralizan a pH 5,5-6,0 con hidróxido de calcio sólido. La solución clara obtenida después de la eliminación de los precipitados de sulfato de calcio se usa para la fermentación después de enriquecerla con fuentes de nitrógeno tal como el 0,5 % de peptona y el 0,5 % de extracto de levadura, sometiéndola a autoclave e inoculándola con cultivos prometedores de levadura convencional de *Saccharomyces cerevisiae*, cultivo número NCIM 3455 (ATCC 26602). El caldo inoculado se incuba en una agitadora durante 24 horas para proporcionar, inicialmente, condiciones aerobias y a continuación se incuba adicionalmente en condiciones anaerobias y estáticas durante los siguientes dos días. Se mide la formación de etanol cada 24 horas usando GC-MS junto con la medición del azúcar sin utilizar. La conversión del azúcar reductor en etanol se explica en la Tabla 9. Los resultados indican que la mayoría del azúcar utilizado se convierte en etanol.

Después de tres ciclos, se obtienen 36,82 g de azúcar reductor a partir de 150 g de gránulos que son equivalentes a 120 g de carragenano. Así, el 30 % de carragenano se convierte en azúcar reductor.

Tabla 8: Concentración de azúcar de extractos de gránulos de *Kappaphycus alvarezii*

Nº de ciclos	Peso de gránulos de <i>Kappaphycus alvarezii</i>	Volumen del extracto resultante (ml)	Concentración de azúcar (%)
1	50	875	1,86
2	50	740	3,26
3	50	620	5,94

Tabla 9: utilización de azúcar y formación de etanol usando gránulos de *Kappaphycus alvarezii*

Día de fermentación	<i>Kappaphycus alvarezii</i>			
	Azúcar en el hidrolizado (%)	Azúcar utilizado (%) (A)	Producción de etanol (%)	% de conversión en base a (A)
0	5,94		-	-
1	4,4	1,54	0,99	100
2	4,2	1,74	0,89	92,78
3	4,0	1,94	0,90	83,92

En este caso, la mayor parte del azúcar utilizado se convierte en etanol. No obstante, la eficiencia de utilización del azúcar es muy lenta debido a la presencia de sales solubles en el hidrolizado, que interfieren con la eficiencia de fermentación del cultivo. Para superar este problema, se usó un procedimiento de electrodiálisis para reducir el contenido de sales solubles en el hidrolizado.

**Ejemplo 8**

Se lleva a cabo la producción de bioetanol usando gránulos de *Kappaphycus alvarezii*. 50 g de biomasa se hidrolizan con 1000 ml de ácido sulfúrico al 2,5 % a 100 °C durante una hora. El extracto se filtra y se añaden 50 g de biomasa de algas marinas frescas al filtrado y se repite la hidrólisis en condiciones similares para incrementar la concentración de azúcar. Así, la extracción se repite cinco veces usando 250 g totales de materia prima. La concentración de azúcar reductor se mide en el hidrolizado final. Las soluciones sacarificadas obtenidas después de cinco ciclos se neutralizan a pH 5,5-6,0 con hidróxido de calcio sólido. Las sales insolubles generadas durante el procedimiento de centralización se eliminan por filtración o centrifugación a 6500 rpm durante 15 minutos mientras que las sales solubles generadas durante el procedimiento de hidrólisis y neutralización se eliminan mediante el procedimiento de electrodiálisis (ED). Una pila de electrodiálisis se llenó con 5 pares de celdas de membranas de intercambio de cationes y aniones de tipo interpolimérico preparadas en este laboratorio. En la pila se empleó un flujo en paralelo. El área individual efectiva de la membrana de la pila era de 80 cm<sup>2</sup>. El hidrolizado de algas marinas se hizo circular a través de los compartimentos del producto (diluato) de la pila de ED. Al mismo tiempo se hizo circular agua a través de los compartimentos del concentrado. Todos los experimentos se realizaron con un caudal de circulación de 3,0 l/h para cada una de las corrientes de producto y de concentrado usando bombas adecuadas. Se hizo circular una solución diluida de sulfato sódico a través de los compartimentos de dos electrodos al final para expulsar los productos de la electrodiálisis. Se aplicó un potencial eléctrico (7,5 V) entre los dos electrodos por medio de un rectificador AC/DC. Se prosiguió con la circulación de las corrientes de diluato y de concentrado hasta que el rechazo de sal disuelta total alcanza el 90-95 % aproximadamente de la cantidad inicial. Se registró la tensión y el TDS a intervalos de corriente regulares. Al final del experimento, se analizaron muestras de ensayo de la corriente de diluato y de concentrado para el TDS, la conductividad, el pH, cloruro, sulfato, dureza, sodio, potasio, etc. La solución clara obtenida después de la ED se usa para la fermentación después de enriquecerla con fuentes de nitrógeno tal como el 0,5 % de peptona y el 0,5 % de extracto de levadura, sometiéndola a autoclave e inoculándola con cultivos prometedores de levadura convencional de *Saccharomyces cerevisiae*, cultivo número NCIM 3455 (ATCC 26602). El caldo inoculado se incubó a 30 ± 2 °C en una agitadora durante 24 horas y se mide la formación de etanol usando GC-MS junto con la medición del azúcar sin utilizar. El efecto de la electrodiálisis sobre la producción de etanol se estudia comparándolo con los resultados obtenidos con el mismo hidrolizado sin ED. El análisis del hidrolizado tratado por ED se presenta en la Tabla 10 mientras que los datos comparativos sobre la producción de etanol a partir del hidrolizado tratado por ED y el hidrolizado no tratado por ED se presentan en la Tabla 11.

Tabla 10: Análisis del hidrolizado tratado por ED preparado a partir de gránulos de *Kappaphycus alvarezii*

Muestra	Volumen (ml)	TDS (ppm)	Azúcar (%)	Conductividad (mS)	Cloruro (g/l)	pH
Hidrolizado tratado por ED	440	3800	8,6	6,3	0,38	6,72
Descarte 1	500	31000	3,5	40,3	7,36	8,65
Descarte 2	550	6000	0,18	10,3	1,20	8,18

Tabla 11. Efecto de la ED sobre la producción de etanol en *Kappaphycus alvarezii*

Muestra	Azúcar inicial (%)	Azúcar restante en el caldo fermentado (%)	Azúcar utilizado (%)	Producción teórica de EtOH (%)	Producción real de EtOH (%)	Eficiencia de conversión (%)
Sin ED	8,8	6,2	2,8	1,4	0,175	12,5
Tratada por ED	8,6	4,1	4,5	2,25	2,05	87,8

Debido al alto contenido de sulfato del carragenano, los procedimientos repetidos de hidrólisis ácida y neutralización producen la generación de una alta concentración de sales solubles que interfieren con el procedimiento de fermentación. La eliminación de sales solubles hasta el 90 % usando el procedimiento de electrodiálisis mejoró significativamente la utilización de azúcar y su conversión en etanol.

**Ejemplo 9**

Se obtiene una solución sacarificada después de la hidrólisis ácida de gránulos de *Kappaphycus alvarezii*, que tiene una concentración inicial de azúcar diferente en la que el pH se ajusta a 5,8 con hidróxido de calcio sólido. La solución clara obtenida después de la eliminación de los precipitados por filtración o centrifugación a 7000 rpm durante 15 minutos se somete a electrodiálisis para su desalación y a continuación se usa para la fermentación después de enriquecerla con una fuente de nitrógeno tal como hidrolizado de proteínas preparado a partir de pasta de *Jatropha* que tiene el 1,25 % de proteína, en lugar del 0,5 % de peptona y el 0,5 % de extracto de levadura, sometiéndola a autoclave e inoculándola con cultivos de levadura convencional de *Saccharomyces cerevisiae* NCIM

3455 (ATCC 26602). El caldo inoculado se incubó a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  en una agitadora durante 24 horas, inicialmente, en condiciones aerobias al cultivo y a continuación se incubó adicionalmente en condiciones anaerobias y estáticas durante los siguientes tres días. Se mide la formación de etanol después de cuatro días usando GC-MS junto con la medición del azúcar sin utilizar. Después de la incubación, la utilización de azúcar era de hasta el 84 % del azúcar total disponible en el hidrolizado, no obstante, el porcentaje de conversión de azúcar en etanol era de tan solo el 13,5 %.

**Ventajas de la presente invención**

1. La explotación de biomasa de macroalgas para la producción de etanol integrado con la producción de biofertilizante en donde el etanol se genera como subproducto
2. Después de la producción de carragenano, se usan gránulos excedentes ricos en carragenano como fuente de azúcar, para la producción de etanol
3. La obtención de múltiples productos a partir de las mismas algas marinas hace que su cultivo comercial sea económicamente más viable
4. Hay una vasta superficie disponible en el mar para el cultivo comercial de algas marinas potenciales
5. No hay competencia por tierras agrícolas y el agua y con los cultivos alimentarios
6. No son necesarias prácticas agrícolas precisas para el cultivo de algas marinas
7. Sin uso de fertilizantes o pesticidas y por tanto es un procedimiento de cultivo respetuoso con el medio ambiente
8. Uso de un procedimiento de electrodiálisis en la eliminación de las sales solubles presentes en el hidrolizado
9. Uso de productos de desecho, generados durante la neutralización y la electrodiálisis y después de la destilación de etanol, como abono.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción integrada de etanol y savia de algas marinas a partir de *Kappaphycus alvarezii* que comprende las etapas de:
- 5 (a) sacarificación que consiste en la hidrólisis de gránulos ricos en carragenano lavados, obtenidos después de la extracción de savia de *Kappaphycus alvarezii*, usando ácido sulfúrico diluido en el intervalo del 0,5-5 %, seguido de calentamiento de la solución en el intervalo de 80-200 °C durante un periodo en el intervalo de 30-90 minutos para obtener un hidrolizado rico en azúcares reductores;
  - (b) recuperación del hidrolizado que se obtiene en la etapa (a) por filtración o centrifugación en el intervalo de 5000-7000 rpm durante 15 minutos para obtener un hidrolizado;
  - 10 (c) incremento de la concentración de azúcar en el hidrolizado que se obtiene en la etapa (b) mediante la adición de gránulos frescos de *Kappaphycus alvarezii* a la solución filtrada seguido por la repetición de las etapas (a) y (b) hasta que se obtiene una concentración de azúcar en el intervalo del 2 al 10 %;
  - (d) ajuste del pH del hidrolizado que se obtiene en la etapa (c) en el intervalo de 4,5 a 8,0 usando hidróxido de calcio para generar una sal insoluble de CaSO<sub>4</sub>;
  - 15 (e) separación de las sales insolubles que se obtienen en la etapa (d) por filtración o centrifugación en el intervalo de 5000-7000 rpm para obtener un hidrolizado;
  - (f) desalación del hidrolizado que se obtiene en la etapa (e), para eliminar las sales solubles mediante electrodiálisis;
  - 20 (g) enriquecimiento del hidrolizado que se obtiene en la etapa (f) con una fuente de nitrógeno en el intervalo del 0,2-2,0 % seguido de esterilización a 121 °C durante 15 minutos;
  - (h) inoculación del cultivo de levadura de *Saccharomyces* al hidrolizado que se obtiene en la etapa (g) y su incubación en el intervalo de 25-35 °C durante un periodo en el intervalo de 24 a 96 horas para obtener etanol;
  - (i) separación del etanol que se obtiene en la etapa (h) a partir de un caldo fermentado por destilación;
  - (j) concentración del etanol que se obtiene en la etapa (i) por destilación para obtener el producto deseado.
- 25 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de sacarificación comprende la hidrólisis ácida de gránulos ricos en carragenano a temperatura elevada, en el que el polisacárido se hidroliza parcialmente a azúcares simples tales como galactosa mediante ácido sulfúrico diluido en el intervalo del 0,5 % al 5,0 % a una temperatura en el intervalo de 80 a 200 °C durante un periodo en el intervalo de 30-90 minutos.
- 30 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la concentración de azúcares reductores del hidrolizado final se incrementa desde el 2,0 % al 10 % mediante la hidrólisis repetida de gránulos frescos en la misma solución.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el CaSO<sub>4</sub> insoluble generado durante el procedimiento de neutralización se elimina por filtración al vacío o centrifugación en el intervalo de 5000-7000 rpm durante 15 minutos mientras que las sales solubles se eliminan por el procedimiento de electrodiálisis.
- 35 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el hidrolizado se enriquece con fuentes de nitrógeno tales como peptona y extracto de levadura o hidrolizado de proteínas de pasta de *Jatropha* a una concentración en el intervalo del 0,2-2,0 %.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cultivo activo de *Saccharomyces cerevisiae* se inocula en el hidrolizado tratado en autoclave.
- 40 7. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 7, en el que el hidrolizado de algas marinas inoculado se incuba en el intervalo de 25-35 °C durante un periodo en el intervalo de 24 a 96 horas en condiciones aerobias y anaerobias para la fermentación del azúcar en etanol.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el bioetanol se separa del caldo fermentado por destilación.
- 45 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se usan como abono el caldo fermentado restante después de la destilación, en combinación con el CaSO<sub>4</sub> insoluble generado durante la neutralización y los descartes del procedimiento de electrólisis.



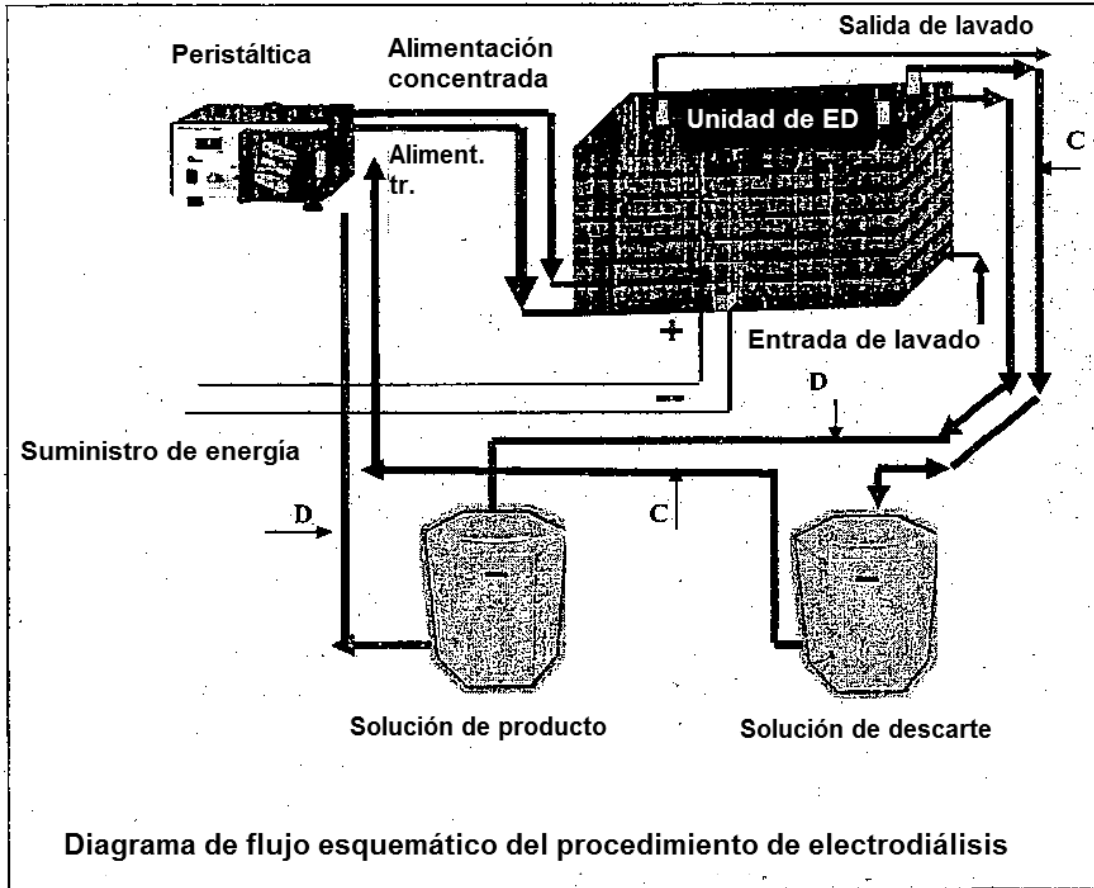


Fig.1