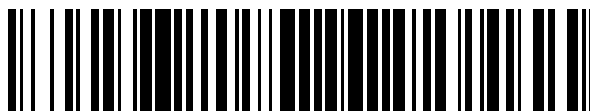


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 235**

51 Int. Cl.:

C11B 1/02 (2006.01)

C11B 1/10 (2006.01)

B01J 3/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2010** **E 10190307 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016** **EP 2450424**

54 Título: **Un método para la recuperación de aceite a partir de biomasa**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.09.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

AALTONEN, OLLI;
JAUHIAINEN, OLLI y
HUJANEN, MERVI

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 582 235 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

Un método para la recuperación de aceite a partir de biomasa

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para recuperar lípidos a partir de biomasa microbiana utilizando extracción.

10 Antecedentes de la invención

Los microorganismos tales como las algas, las bacterias o los hongos pueden contener triglicéridos hasta el 80 % de su contenido de materia seca total. Sin embargo, el aceite precedente de biomasa microbiana que es adecuado como precursor para la producción de combustible es escaso en el mercado. Esto se debe principalmente a la
15 carencia de métodos eficaces y económicos para proporcionar aceite de buena calidad a partir de biomasa microbiana.

Los métodos disponibles para la extracción de aceite o de lípidos a partir de biomasa microbiana normalmente necesitan que la biomasa se seque y/o que las células microbianas se rompan. El secado de la biomasa consume
20 mucha energía y se realiza, por ejemplo, calentando o liofilizando, o incluso se utiliza el secado por pulverización. El contenido de agua típico o el contenido de materia seca de la biomasa dependen del material microbiano utilizado. Normalmente, se pueden conseguir contenidos en materia seca desde el 15 % hasta el 40 % mediante técnicas de recolección de células tradicionales tales como centrifugación o filtración. Esencialmente, normalmente se desea un contenido de agua libre tan bajo como sea posible para maximizar los rendimientos de extracción.

Un método alternativo para obtener aceite a partir de biomasa es aplicar extractantes no selectivos, lo que normalmente produce aceite que contiene altas cantidades de impurezas. Las impurezas tales como metales, fósforo y aminoácidos provocan problemas por ejemplo en la producción catalítica de combustible, en forma de
25 venenos para el catalizador y/o de materiales corrosivos. Por lo tanto, con frecuencia se necesita utilizar el procesamiento posterior para la eliminación de estos componentes no deseados del producto de aceite extraído.

En general, los métodos disponibles adolecen de la carencia de selectividad para producir aceite de buena calidad o del mal rendimiento, lo cual se compensa mediante etapas de procesamiento adicionales o la selección de
35 condiciones de procesamiento no económicas.

Uno de los extractantes comúnmente utilizados para la recuperación de aceites a partir de materiales que contienen aceites es el dióxido de carbono en el estado subcrítico o preferentemente supercrítico. Desafortunadamente, el dióxido de carbono tiene una capacidad de disolución débil de lípidos neutros vegetales. Esta propiedad se ha
40 modificado mediante la incorporación de agentes de arrastre que presentan mejor disolución, tales como el propano o el butano. Los fluidos supercríticos tienen mejores capacidades de disolución pero necesitan altas presiones de operación. Además, los tiempos de extracción también tienden a mantenerse prolongados de manera antieconómica.

El documento CA-2165387 divulga una extracción selectiva de grasas y/o aceites con gases comprimidos a partir de
45 materiales naturales sólidos, tales como sólidos microbianos, como residuos de fermentación secados y sedimentados que tienen contenido de agua menor del 5 %. La extracción se lleva a cabo utilizando una mezcla de propano y un máximo del 50 % en peso de dióxido de carbono a temperaturas por debajo de 96 °C y presiones por debajo de 7,30 MPa (73 bar). Estos dos gases puros están cada uno en el estado subcrítico. En este método se lleva a cabo una etapa de secado que consume energía antes de la extracción.

El documento US-4331695 divulga un método para la extracción de grasas o aceites a partir de productos animales o vegetales, tales como copos de soja o maíz, poniendo en contacto al producto con un disolvente de hidrocarburo, tal como el propano, en la fase líquida y a una temperatura por debajo de la temperatura crítica, separando el
50 disolvente que contiene las grasas o el aceite extraídos del residuo del producto, y precipitando las grasas o el aceite extraídos a partir del disolvente calentando el disolvente por encima de la temperatura crítica del disolvente sin absorber el calor de vaporización. Las grasas o el aceite resultantes son adecuados para su uso en productos alimenticios sin procesamiento adicional para eliminar el disolvente. Las temperaturas del propano pueden ser de 0-100 °C durante la extracción y de 50-200 °C durante la precipitación del aceite o la grasa, y la presión puede ser la misma durante la extracción y la precipitación. El método divulgado no divulga ningún pretratamiento del material a
55 extraer y el método no incluye la extracción de biomasa microbiana.

En ocasiones, cuando se extrae aceite a partir de biomasa microbiana se ha utilizado ruptura, diseminación o triturado mecánico de las células de la biomasa o incluso ruptura con ayuda de microondas de las células de la biomasa para ayudar a aumentar el rendimiento del aceite extraído.

El documento US-2003/0143659 divulga un proceso para el aislamiento de compuestos tales como ácidos grasos poliinsaturados a partir de microorganismos, en cuyo proceso en primer lugar se granula la biomasa y posteriormente se seca antes de la extracción de la biomasa. La biomasa se puede pasteurizar en el medio de cultivo, es decir, calentar a 60-100 °C, normalmente preferentemente hasta 96 °C, hasta 90 minutos, para destruir los microorganismos y también para inactivar las enzimas que de otro modo podrían destruir los ácidos grasos. No se ha comunicado que la pasteurización tenga efecto sobre la extracción posterior.

El documento WO2006136539 divulga un proceso de extracción en donde los lípidos se obtienen a partir de biomasa húmeda. En este proceso antes de la extracción se añade un desecante a la biomasa húmeda para eliminar el agua en exceso. La biomasa se pasteuriza a 65 °C durante 1 h antes del proceso de extracción.

El documento WO 2010/021753 divulga un método para la transformación hidrotérmica de algas en biocombustible utilizando agua casi crítica o supercrítica. En el método divulgado, la composición de algas se presuriza hasta una presión predefinida que está por arriba de la presión atmosférica y se calienta hasta una temperatura predefinida, de forma tal que el agua en la composición alcanza un estado casi crítico o supercrítico. La composición de algas se mantiene durante un periodo de tiempo a una o más de la/las temperatura(s) preseleccionada(s) y presión/presiones preseleccionada(s) de forma tal que se hidrolizan o extraen diversos tipos de lípidos, después de lo cual se deja enfriar el extracto de algas y deja que se separe en una fase acuosa, una fase sólida y una fase orgánica que comprende ácidos grasos y triglicéridos.

El documento US 4857329 divulga un método para la extracción de lípidos a partir de hongos del género *Mortierella*. En el método divulgado las células fúngicas se pretratan calentando a una temperatura de 150 a 200 °C y moliendo o moliendo las células en un disolvente alcohólico. Los lípidos se extraen de la masa celular pretratada con un disolvente seleccionado del grupo que consiste en un disolvente en un estado supercrítico, una mezcla disolvente del disolvente en un estado supercrítico y un alcohol alifático inferior y una mezcla disolvente del disolvente en un estado supercrítico y un hidrocarburo alifático saturado inferior. El hidrocarburo alifático saturado inferior se selecciona de un grupo que consiste en butano, pentano, hexano, heptano y ciclohexano.

Halim R *et al.*, Oil extraction from microalgae for biodiesel production, Bioresource Technology, vol. 102, n.º 1, pág. 178-185 divulga un método para la extracción de lípidos a partir de microalgas, en cuyo método la biomasa de algas se deshidrata utilizando una centrifuga de discos Westfalia hasta una concentración de sólidos del 30 % en peso y la biomasa deshidratada se extrae con hexano o con una mezcla de hexano e isopropanol.

El documento US 2010/0233761 divulga un método para el fraccionamiento de biomasa, cuyo método comprende etapas de suspensión de la biomasa en una solución de pH ajustado de por lo menos un disolvente polar con base acuosa, calentando la biomasa suspendida hasta una temperatura de 25 a 200 °C, poniendo en contacto la biomasa con por lo menos un disolvente no polar, tal como hexano, dividiendo para obtener una solución de disolvente no polar y una solución de biomasa polar, y recuperando productos celulares a partir de la solución disolvente no polar y de la solución de biomasa polar.

El documento WO 2006/085672 divulga un método para aislar uno o más compuestos a partir de una biomasa microbiana, comprendiendo el método las etapas de preparar masa celular húmeda que tenga un contenido de humedad promedio de entre el 30 % y el 80 %, someter la masa celular húmeda a un secado primario para obtener una masa celular seca primaria que tenga un contenido de humedad promedio de entre el 5 % y el 50 %, someter la masa celular seca primaria a un secado secundario para obtener una masa celular seca secundaria que tenga un contenido de humedad promedio de menos del 10 %, someter a la masa celular seca secundaria a extracción con hexano y separar el uno o más componentes de la solución de extracción.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método industrialmente factible para la obtención rápida y eficaz de lípidos utilizando una cantidad razonable de extractante. El rendimiento se puede potenciar mediante el ajuste del tiempo de extracción y la cantidad utilizada de extractante. Sin embargo, los aspectos económicos del proceso eventualmente determinarán la eficacia del rendimiento adecuada o deseada.

El objeto de la presente invención es proporcionar un método para la obtención de lípidos a partir de biomasa microbiana húmeda.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método selectivo para la adquisición de lípidos a partir de biomasa microbiana para producir aceite adecuado para el refinado de la producción de combustible como tal, especialmente para el refinado catalítico.

A su vez, un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método eficaz que obtenga lípidos a partir de biomasa microbiana con un alto rendimiento.

Sumario de la invención

Los inventores han encontrado que no es necesario secar la biomasa microbiana húmeda antes de la extracción. Aplicar un pretratamiento térmico a la biomasa antes de la extracción con propano líquido proporciona lípidos neutros con alta selectividad y buen rendimiento. El método de acuerdo con la presente invención proporciona así una capacidad de disolución muy alta y excelente selectividad dando como resultado un producto de lípidos con buen rendimiento y ninguna o poca necesidad de purificación posterior a la extracción. Se producen lípidos y/o aceite de buena calidad que pueden utilizarse para el suministro a procesos de refinado catalítico tales como para la producción renovable de diésel, biodiésel o lubricante. El producto de lípidos y/o aceite recuperado tiene un contenido de metales y fósforo bajo.

La presente invención proporciona un método para la recuperación de lípidos a partir de biomasa microbiana como ilustra la reivindicación 1.

Cuando se extrae biomasa microbiana, normalmente los fosfolípidos tienden a acumularse en la fase oleosa junto con los lípidos neutros. Sorprendentemente, aplicando un pretratamiento térmico antes de la extracción se obtiene aceite de buena calidad que contiene una baja cantidad de fósforo. Así, el producto extraído obtenido contiene principalmente grasas en forma de triglicéridos. El producto obtenido no contiene lípidos polares, tales como fosfolípidos u otros compuestos polares. Esto reduce significativamente la necesidad de tratamientos de purificación posteriores de los lípidos obtenidos.

El producto de lípidos obtenido mediante el proceso de acuerdo con la presente invención está también esencialmente libre de metales. A pesar de que muchos de los microorganismos contienen altas cantidades de diversos metales que normalmente se extraen en forma de sales, el producto de lípidos obtenido mediante el proceso de acuerdo con la invención esencialmente no contiene metales. Los metales y el fósforo provocan problemas significativos en los procesos catalíticos adicionales, tales como la producción de combustibles a partir del producto de lípidos y de otra forma se necesitaría etapas de purificación posteriores exhaustivas.

Además, la posibilidad de extraer la biomasa microbiana húmeda elimina la necesidad de la etapa adicional de eliminación de agua antes de la extracción, ahorrando así tiempo y costes de procesamiento. La duración del procesamiento para la extracción se mantiene corta y la extracción es eficaz. El agua se puede eliminar de la biomasa microbiana mediante decantación o filtración sin, por ejemplo, evaporación.

Una ventaja adicional es que no se necesita ruptura de la célula microbiana, tal como la trituración mecánica o similar, antes del procesamiento de la biomasa. Los lípidos en ella se vuelven disponibles para la extracción sin ninguna etapa de ruptura particular.

El método de acuerdo con la actual invención proporciona un proceso para la extracción de lípidos a partir de biomasa microbiana con excelente rendimiento eficaz. Un rendimiento de lípidos suficiente en el aspecto económico se obtiene en un tiempo de extracción corto utilizando una cantidad bastante baja de extractante, que necesita un aparato de extracción de volumen pequeño. La parte inicial de la curva de extracción muestra una fuerte subida, es decir, el valor del primer derivado es mayor de lo que se habría esperado.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una vista esquemática de la configuración del aparato utilizada en los ejemplos 1, 2 y 3.

La Figura 2 muestra los rendimientos de extracción para algas *Chlorella* con y sin el pretratamiento térmico.

La Figura 3 muestra los rendimientos de extracción para el hongo filamentoso *Mortierella isabellina* con y sin el pretratamiento térmico.

Descripción detallada de la invención

El término "lípidos" se refiere a una sustancia grasa, cuya molécula en general contiene, como una parte, una cadena de hidrocarburo alifático, que se disuelve en disolventes orgánicos no polares pero es poco soluble en agua. Los lípidos son un grupo esencial de moléculas grandes en las células vivas. Los lípidos comprenden, por ejemplo, grasas, aceites, ceras, ésteres de ceras, esteroides, terpenoides, isoprenoides, carotenoides, polihidroxicarboxilatos, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos, fosfolípidos, glucolípidos, esfingolípidos y acilglicerol, tales como monoglicéridos (monoacilglicerol), diglicéridos (diacilglicerol) o triglicéridos (triacilglicerol).

En la presente invención los lípidos que se desea recuperar en el producto incluyen grasas, aceites, ceras y ácidos grasos y sus derivados.

Por la expresión "biomasa microbiana" se entiende biomasa obtenida de, o que contiene, microorganismos que incluyen bacterias, cianobacterias, hongos tales como levaduras, hongos filamentosos y mohos, arqueas, protozoos,

plantas microscópicas tales como algas o microalgas, plancton o planarias. La mayoría de los microorganismos son unicelulares, es decir de una célula única, sin embargo algunos organismos multicelulares son también microscópicos. Los microorganismos acumulan lípidos fácilmente o se han modificado genéticamente para acumular lípidos o para mejorar la acumulación de lípidos.

En una realización preferente de la presente invención la biomasa microbiana que contiene lípidos se selecciona del grupo de bacterias, cianobacterias, hongos tales como levaduras, hongos filamentosos y mohos, arqueas, protozoos, plantas microscópicas tales como algas, microalgas, plancton y planarias, más preferentemente microalgas, bacterias, hongos tales como levaduras, hongos filamentosos y mohos.

En una realización preferente la biomasa microbiana comprende géneros de microalgas que comprenden *Dunaliella*, *Chlorella*, *Botryococcus*, *Brachiomonas*, *Chlorococcum*, *Cryptocodinium*, *Euglena*, *Haematococcus*, *Chlamydomonas*, *Isochrysis*, *Pleurochrysis*, *Pavlova*, *Prototheca*, *Phaeodactylum*, *Pseudochlorella*, *Parachlorella*, *Bracteococcus*, *Scenedesmus*, *Skeletonema*, *Chaetoceros*, *Nitzschia*, *Nannochloropsis*, *Navicula*, *Nannochloris*, *Scihizochytrium*, *Skeletonema*, *Thraustochytrium*, *Ulkenia*, *Tetraselmis* y *Synechocystis*. Se encontró que el método es particularmente eficaz con microalgas seleccionadas del grupo que consiste en *Nannochloropsis* sp., *Dunaliella* sp. tal como *Dunaliella tertiolecta*; *Phaeodactylum* sp. tal como *Phaeodactylum tricomutum* y *Chlorella* sp. tal como *Chlorella pyrenoidosa*, capaces de incorporar un alto contenido de lípidos.

En otra realización preferente la biomasa microbiana comprende especies de hongos filamentosos que pertenecen a los siguientes géneros, *Aspergillus*, *Mortierella*, *Chaetomium*, *Claviceps*, *Cladosporidium*, *Cunninghamella*, *Emericella*, *Fusarium*, *Glomus*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pythium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Zygorhynchus*, *Humicola*, *Cladosporium*, *Malbranchea*, *Ustilago*, en especial las especies capaces de acumular elevadas cantidades de lípidos y ácidos grasos esenciales. Preferentemente, la biomasa microbiana comprende *Mortierella isabellina*, *Mucor*, *Aspergillus* o *Rhizopus*.

En aún otra realización preferente la biomasa microbiana comprende levaduras oleaginosas que pertenecen a los siguientes géneros, *Clavispora*, *Deparyomyces*, *Pachysolen*, *Kluyveromyces*, *Galactomyces*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Waltomyces*, *Endomycopsis*, *Cryptococcus*, tal como *Cryptococcus curvatus*, *Rhodospiridium*, tal como *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula*, tal como *Rhodotorula glutinis*, *Yarrowia*, tal como *Yarrowia lipolytica*, *Pichia*, tal como *Pichia stipitis*, *Candida* tal como *Candida curvata*, *Lipomyces* tal como *Lipomyces starkeyi* y *Trichosporon* tal como *Trichosporon cutaneum* o *Trichosporon pullulans*, que acumulan fácilmente lípidos o se han modificado genéticamente para mejorar la acumulación de lípidos y/o la producción de lípidos. Las levaduras más preferentes comprenden *Lipomyces*, *Rhodospiridium* o *Cryptococcus*.

En aún otra realización preferente la biomasa microbiana comprende bacterias que pertenecen a los siguientes géneros, *Acinetobacter*, *Actinobacter*, *Alcanivorax*, *Aerogenes*, *Anabaena*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Escherichia*, *Flexibacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Rhodomicrobium*, *Rhodopseudomonas*, *Shewanella*, *Shigella*, *Streptomyces* y *Vibrio*. Las bacterias más preferentes comprenden *Rhodococcus opacus*, *Acinetobacter*, *Nocardia* o *Streptomyces*.

En el primer aspecto de la presente invención se proporciona un método para la recuperación de lípidos a partir de biomasa microbiana. El método se define la reivindicación 1.

La biomasa a procesar se puede obtener de forma directa a partir de un sistema de cultivo o crecimiento tal como un biorreactor. La biomasa a procesar, preferentemente biomasa de microalgas, se trata mediante métodos posibles generalmente conocidos, tales como filtración, decantación, flotación o sedimentación asistida por floculación, para eliminar el agua en exceso o la solución de crecimiento acuosa. Preferentemente, la biomasa de algas, mohos o levaduras se filtra o centrifuga antes del procesamiento. Por otro lado, se puede utilizar biomasa procedente de cultivo inmovilizado o similar, suspendiéndola en medio acuoso.

Por el término "húmedo" se entiende la biomasa microbiana que se origina a partir de una solución de cultivo acuosa y de la que se elimina el agua en exceso mediante procesos de eliminación de agua que consumen baja energía tales como filtración, centrifugación o sedimentación, o similares, y que no se seca de forma específica. Como alternativa, la biomasa microbiana seca sólida se puede suspender en una forma acuosa.

Después de la eliminación del agua en exceso de la biomasa tratar mediante el método de la presente invención, el contenido de materia seca de la biomasa está normalmente por debajo del 70 % en peso. Dependiendo de la biomasa microbiana acuosa a tratar, el contenido de materia seca puede ser menor, tal como el 4 %. Sin embargo, preferentemente el contenido de materia seca es por lo menos del 5 %, más preferentemente por lo menos del 15 %, muy preferentemente por lo menos del 19 %, tal como por encima del 20 %.

De acuerdo con la presente invención, la biomasa microbiana húmeda proporcionada a un recipiente a presión se pretrata de forma térmica antes de extraer los lípidos presentes en ella. Antes de iniciar el pretratamiento térmico, el volumen del recipiente a presión se elimina con gas inerte, preferentemente nitrógeno, para evitar o minimizar las posibles reacciones con el gas ambiental. La temperatura de pretratamiento es de 100 °C a 250 °C, preferentemente

de 150 °C a 250 °C, tal como de 160 °C a 220 °C. La presión dentro del recipiente de pretratamiento cerrado se establecerá de acuerdo con la presión de vapor de la biomasa microbiana húmeda a tratar.

Preferentemente, durante el pretratamiento térmico la mezcla de biomasa microbiana se agita de forma continua para permitir la temperatura uniforme a través de la mezcla.

La velocidad de aumento de la temperatura desde la temperatura de inicio hasta la temperatura del pretratamiento puede variar dependiendo de fuentes de calor utilizadas y de la biomasa microbiana a tratar. La velocidad de calentamiento adecuada, pero no optimizada, por lo menos para biomasa de algas, levaduras y mohos, es de 1 °C/min a 2 °C/min.

De acuerdo con una realización, el tiempo de pretratamiento térmico es menor de 180 min, preferentemente menor de 120 min, tal como aproximadamente 100 minutos.

En una realización preferente, después de la etapa de pretratamiento se permite que la biomasa se enfríe, preferentemente hasta una temperatura por debajo de 97 °C, más preferentemente por debajo de 80 °C, muy preferentemente por debajo de 65 °C tal como hasta la temperatura establecida por la etapa de extracción posterior, antes de que se inicie la extracción. El método de acuerdo con la invención pretende incluir el enfriamiento activo por medio de transferencia de energía así como el enfriamiento pasivo, es decir, dejando la temperatura de la biomasa disminuir lentamente hasta que se alcanza la temperatura ambiente. El término "enfriamiento" o "enfriado" se pretende que incluya todos los posibles modos de reducir la temperatura de la biomasa microbiana. Si la extracción se inicia antes del enfriamiento de la biomasa, se puede extraer algo de agua junto con la fase oleosa. La solubilidad de la fase acuosa en el extractante se aumenta cuando la temperatura se aumenta. La cantidad de agua coextraída es muy baja cuando la temperatura se disminuye lo suficiente, tal como hasta por debajo de 65 °C, después del pretratamiento térmico. Incluso, no será necesario purificar el producto recuperado a partir del agua residual después de la recuperación, cuando se tiene como objetivo utilizar el producto en el refinado catalítico de combustible.

Después del pretratamiento térmico la biomasa microbiana se somete a extracción utilizando un extractante que comprende propano líquido. La biomasa se pone en contacto con el extractante utilizando preferentemente la mezcla, para potenciar el contacto eficaz y uniforme. Los lípidos deseados se extraen y se separan a partir de las células de la biomasa microbiana. Preferentemente, el residuo de la biomasa se utiliza para forraje. La extracción se puede realizar de forma discontinua o continua.

De acuerdo con una realización preferente de la presente invención, la etapa de extracción se inicia inmediatamente después de que la biomasa microbiana húmeda se ha enfriado hasta una temperatura adecuada para la extracción, tal como por debajo de 97 °C.

En otra realización preferente, la etapa de extracción se inicia antes de que la temperatura de la biomasa microbiana húmeda haya alcanzado la temperatura ambiente, más preferentemente antes de que la temperatura se reduzca por debajo de 40 °C.

En aún otra realización, el pretratamiento térmico se consigue inmediatamente mediante la etapa de extracción en un flujo de proceso continuo.

El extractante de hidrocarburo líquido es principalmente insoluble en agua y comprende propano. Se encontró que el uso del propano es especialmente eficaz y selectivo en combinación con el pretratamiento térmico.

La extracción se realiza utilizando un extractante líquido, que comprende propano líquido. Esto significa que la presión del recipiente de extracción necesita ser tal que el extractante utilizado permanezca en forma líquida. Normalmente, la extracción se realiza por encima de la temperatura ambiente y por ejemplo, si el propano se utiliza a una temperatura de 60 a 95 °C, la presión necesita ser por lo menos de 2,00 y 4,30 MPa (20 y 43 bar), respectivamente. Dado que la extracción se realiza con un extractante en forma líquida, las temperaturas y las presiones no pueden ser tales que el extractante pudiera estar en el estado supercrítico. La temperatura debe ser menor de 97 °C para mantener el propano en estado líquido.

La extracción se realiza de una manera convencional. El rendimiento al que se apunta es un rendimiento eficaz que se determina mediante los aspectos económicos del proceso. La proporción del propano utilizado con respecto a la biomasa celular tratada debería estar dentro de los límites razonables. Preferentemente, esta proporción, de propano con respecto a la masa en peso seco de células es menor de 40, lo que establece una restricción al rendimiento total pero disminuye el consumo, es decir los costes del propano utilizado. La optimización de la eficacia total está dentro de las habilidades de un técnico en este campo, aplicando los resultados detallados en los ejemplos incluidos.

Después de extraer los lípidos deseado en el extractante, este líquido que contiene líquido se separa de la biomasa microbiana y forma el producto. El producto que contiene los lípidos se recupera y se utiliza adicionalmente como tal,

es decir, una mezcla de extractante y lípidos, o el extractante se puede eliminar de los lípidos reduciendo la presión, provocando que el extractante se evapore.

5 En una realización, los lípidos recuperados en la mezcla con el extractante se utilizan como tal para los procesos de refinado de aceite, siempre que dicho extractante sea esencialmente propano.

En otra realización el extractante gasificado se recicla y se hace circular de nuevo al proceso de extracción para la reutilización.

10 Una ventaja principal del uso del pretratamiento térmico antes de la extracción es que el rendimiento del lípido extraído se aumenta sustancialmente en comparación con la extracción húmeda sin el pretratamiento térmico. El pretratamiento claramente potencia la transferencia de lípidos de las células microbianas a la fase extractante. Además, proporcionar una cantidad mayor de extractante en contacto con la masa de células microbianas aumenta el rendimiento extraído eliminando el efecto del posible límite de solubilidad. Estas ventajas se ilustran
15 adicionalmente mediante los ejemplos y las figuras.

Además, el pretratamiento antes de la extracción claramente potencia la selectividad de los lípidos extraídos y recuperados. El producto de lípidos así obtenido contiene solo cantidades muy bajas de metales y de sales metálicas. Las impurezas nocivas típicas comprenden Al, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn y Mn. Preferentemente, el contenido
20 de metales total es menor de 1,5 ppm, más preferentemente menor de 1 ppm, indicando que los lípidos no polares se extraen de forma muy selectiva.

El bajo contenido de fósforo en los lípidos recuperados, menor de 10 ppm, preferentemente menor de 5 ppm, que es ya adecuado para los procesos catalíticos de refinado de combustible, más preferentemente menor de 1 ppm, muy
25 preferentemente menor de 0,5 ppm, sugiere que la cantidad de fosfolípidos coextraídos es muy baja. Los contenidos en fósforo por encima de 15 ppm normalmente necesitan etapas de purificaciones posteriores adicionales, tales como el desgomado antes de los procesos catalíticos de refinado de combustible. Los tratamientos posteriores se facilitan reduciendo la cantidad de fósforo incorporado en el producto.

30 También se describe un aparato para llevar a cabo el método de la invención. El aparato para su uso en el método descrito anteriormente comprende un recipiente a presión con medios de entrada para la introducción de la biomasa microbiana húmeda y del hidrocarburo no polar líquido, medios de salida para dicho hidrocarburo provistos de medios de regulación de la contrapresión que están conectados a un recipiente de recolección de extractante para la
35 recuperación de los lípidos extraídos o una mezcla de lípidos con hidrocarburo.

En la figura 1 se ilustra esquemáticamente una posible configuración del aparato.

El aparato comprende un recipiente a presión 1 equipado con medios para la agitación, tales como un agitador magnético. El recipiente a presión tiene medios de entrada y salida de rutina para la introducción y extracción
40 continua de biomasa húmeda o de residuos de la biomasa, respectivamente. Además, el recipiente a presión tiene medios de entrada 2 y de salida 3 para la introducción de propano líquido y la extracción de mezcla extractante-lípido, respectivamente. El medio de entrada de hidrocarburo está provisto con una válvula de presión 4 y el medio de salida está provisto con un medio de regulación de la presión 5. Además, el medio de salida de hidrocarburo está conectado con el recipiente de recolección 6 de extractante-lípido provisto del medio de salida 7 adicional, para la
45 recirculación o recuperación de extractante y/o de los lípidos extraídos.

El recipiente a presión es adecuado para soportar temperaturas de por lo menos 300 °C y presiones de por lo menos 15,00 MPa (150 bar). El material del recipiente a presión es resistente a la corrosión, preferentemente de acero inoxidable. Los recipientes de presión preferentemente se tratan para minimizar el crecimiento microbiano sobre la
50 superficie.

La selectividad del método de acuerdo con la presente invención se cree que se origina en la combinación ventajosa del pretratamiento térmico junto con el uso del propano líquido.

55 También se describe un método para la recuperación de lípidos y alcanos inferiores, preferentemente propano, o una mezcla de lípidos con alcanos inferiores, preferentemente propano. En este sistema la suspensión de biomasa microbiana húmeda, que preferentemente comprende levaduras, hongos filamentosos, mohos, algas o bacterias, se introduce de forma continua en un recipiente a presión en agitación de forma continua. La temperatura y la presión del recipiente se ajustan a valores adecuados para el pretratamiento térmico deseado mediante medios de ajuste de rutina. Después del periodo de pretratamiento térmico la temperatura se disminuye hasta la temperatura de extracción deseada mediante medios de ajuste de rutina. El alcano inferior líquido, preferentemente propano, se bombea dentro del recipiente mediante un tubo del cual la salida se extiende hasta debajo de la superficie de la suspensión. Cuando la presión del recipiente alcanza la presión de extracción deseada, se abre un conducto de salida conectado a la tapa del recipiente. El alcano inferior, preferentemente propano, se bombea preferentemente
60 de forma continua y a contracorriente a través del recipiente y a través de la suspensión de biomasa microbiana acuosa. El flujo de salida precedente del recipiente se conduce hasta una válvula reguladora de la contrapresión,
65

que mantiene la presión del recipiente constante a la presión de extracción deseada, y libera la presión del flujo hasta una presión menor, por ejemplo, la presión atmosférica. El flujo de salida procedente de la válvula de contrapresión se conduce hasta un recipiente de recolección de extractante-lípido en el que de forma opcional los lípidos extraídos se recolectan mientras que el alcano inferior evaporado, preferentemente propano, se separa de forma espontánea de los lípidos obtenidos y se ventila o se recircula. Preferentemente, la mezcla de alcanos inferiores, preferentemente propano, y lípidos, se utiliza como tal para el refinado de combustible, en especial para el refinado catalítico.

En una realización adicional, los lípidos recuperados producidos mediante los métodos ilustrados anteriormente se utilizan para la producción de biodiésel, diésel renovable, combustible de aviación, gasolina o componentes con base oleosa.

En una realización preferente, los lípidos recuperados a partir de la biomasa microbiana húmeda con el método de acuerdo con la invención, se utilizan como materia prima para la producción de biodiésel, diésel renovable, combustible para aviación, gasolina o componentes con base oleosa, y similares. Por el término "biodiésel" se entiende el diésel que consiste en ésteres alquílicos de ácidos grasos, y normalmente se produce mediante transesterificación. En la transesterificación, los acilglicerolos se transforman en ésteres alquílicos de ácidos grasos de cadena larga, tales como ésteres metílico, etílico o propílico. Por la expresión "diésel renovable" se entiende combustible que se produce mediante el tratamiento con hidrógeno de lípidos, tales como la hidrogenación, la hidrogenación o el hidrogenación. En el tratamiento de hidrógeno, los acilglicerolos se transforman en los alcanos correspondientes, es decir parafinas. Las parafinas se pueden modificar adicionalmente mediante isomerización o mediante otros procesos alternativos. Los procesos de diésel renovable se utilizan de forma opcional para producir combustible para aviación y/o gasolina. Además, se puede realizar la ruptura de lípidos para producir biocombustibles. Además, en determinadas aplicaciones los lípidos preferentemente se utilizan como biocombustibles de forma directa sin ningún tratamiento adicional.

Los siguientes ejemplos no limitantes se divulgan simplemente para ilustrar adicionalmente la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

En un recipiente a presión de 200 ml se pesan 90,2 g de suspensión acuosa de biomasa microbiana que contiene células, obtenida del cultivo de algas *Chlorella*. La suspensión de células tiene un contenido de materia seca del 23,8 % (determinado mediante secado a 105 °C en horno). Se hace salir el aire del recipiente con gas nitrógeno. Después se calienta el recipiente a 165 °C durante 100 minutos e inmediatamente después se permite que se enfríe hasta aproximadamente 60 °C (etapa 1).

La suspensión de células se agita de forma continua en el recipiente a presión con un agitador magnético. El propano líquido se bombea en el recipiente mediante un tubo que se extiende hasta debajo de la superficie de la suspensión. Cuando la presión del recipiente alcanza los 6,00 MPa (60 bares) a 60 °C, se abre un conducto de salida conectado a la tapa del recipiente. El propano se bombea de forma continua través del recipiente y a través de la suspensión de células a 4,9 g/minuto (etapa 2). El flujo de salida procedente del vaso se conduce hasta una válvula reguladora de la contrapresión, que mantiene la presión del recipiente constante a 6,00 MPa (60 bares) y libera la presión de flujo hasta la atmosférica. El flujo de salida procedente la válvula de contrapresión se conduce hasta una botella en donde los lípidos extraídos se recolectan mientras que el propano gasificado se separa de forma espontánea de los lípidos recolectados y se ventila.

En la Figura 1 se ilustra de forma esquemática la configuración experimental.

La velocidad de extracción se controla pesando la botella de recolección de extracto a intervalos adecuados. En la Figura 2 (■) se muestra un ejemplo de una curva de extracción en términos de rendimiento de extracción (% en peso), calculado a partir de la cantidad de lípidos extraídos recuperada frente al peso seco de la biomasa de algas húmeda en función del propano utilizado por peso seco de biomasa de algas húmeda.

El extracto es claro con una tenue coloración naranja. Contiene el 92 % de ácidos grasos en la forma de triglicéridos.

Ejemplo 2

Las especies de células microbianas en la suspensión acuosa se varían utilizando la configuración experimental y las condiciones descritas en el ejemplo 1. Las especies, el contenido de materia seca de cada suspensión pretratada de forma térmica y los rendimientos de extracción obtenidos muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Especies microbianas	Contenido en % de materia seca del microbio	% del rendimiento de extracción en materia seca
Algas <i>Nannochloropsis</i>	22,5	2,3
Bacterias <i>Rhodococcus</i>	58,1	74,0
Levadura <i>Lipomyces</i>	20,7	26,0
Hongo filamentoso <i>Mortierella isabellina</i>	19,0	18,0

La curva similar en comparación con la de la Figura 2 (■) obtenida ahora del hongo filamentoso *Mortierella isabellina* extraído con el pretratamiento térmico y un experimento de extracción comparativo sin el pretratamiento térmico se muestran en la Figura 3 (▲) y (●), respectivamente. Los rendimientos globales de las distintas especies microbianas no son comparables. Diversas especies microbianas contienen diversas cantidades de lípidos extraíbles.

Ejemplo 3

La biomasa microbiana, las temperaturas y tiempos del pretratamiento térmico se varían en comparación con los valores utilizados en el ejemplo 1, pero los experimentos se realizan con la misma configuración experimental de la figura 1.

La suspensión de bacterias *Rhodococcus* al 24,4 % de contenido de materia seca se calienta hasta 220 °C durante un tiempo de 80 minutos. La temperatura se mantiene a 220 °C durante 40 minutos y después se enfría. La suspensión obtenida se extrae después como se describe en el ejemplo 1. El rendimiento de extracción de *Rhodococcus* pretratadas de forma térmica es del 60 % de la materia seca de la suspensión de células original.

En un experimento comparativo la suspensión de bacterias *Rhodococcus* respectiva se extrae sin utilizar ningún pretratamiento térmico (véase el ejemplo comparativo 1). El rendimiento de extracción obtenido en este caso es solo del 10 %.

Ejemplo 4

La suspensión de *Chlorella* se pretrata de forma térmica y después se extrae con propano de acuerdo con la configuración experimental del ejemplo 1.

El producto de aceite obtenido se analiza de acuerdo con el método según la norma ASTM D5188 y se obtienen los siguientes resultados:

Componente	Concentración en aceite
	mg / kg
Al	< 0,1
Cr	< 0,1
Cu	0,3
Fe	< 0,1
Na	< 0,5
Ni	< 0,1
Pb	< 0,4
Si	21,9
V	< 0,1
Ba	< 0,1
Ca	0,2
Mg	< 0,1
P	< 0,5
Zn	< 0,1
Mn	< 0,1

El signo "<" indica que la concentración fue menor que el límite de detección para el componente específico.

Ejemplo comparativo 1

En un recipiente a presión de 200 ml se pesan 90,1 g de suspensión de biomasa microbiana acuosa obtenida del cultivo de algas *Chlorella*, de forma similar al ejemplo 1.

5 La suspensión tiene un contenido de materia seca del 22,0 % (105 °C, horno). El recipiente se aclara con gas nitrógeno y se calienta a 60 °C con agitación continua de la suspensión de células, con un agitador magnético.

10 Se bombea el propano líquido dentro del recipiente mediante un tubo que se extiende hasta debajo de la superficie de la suspensión. Cuando la presión del recipiente alcanza los 6,00 MPa (60 bares) a 60 °C, se abre un conducto de salida conectado a la tapa del recipiente. El propano se bombea de forma continua a través del recipiente y a través de la suspensión de células a una velocidad de 5,7 g/minuto.

15 La velocidad de extracción se controla pensando la botella de recolección de extracto a intervalos adecuados. La curva de extracción obtenida se muestra en la Figura 2 (▲).

Ejemplo comparativo 2

20 La suspensión de algas *Nannochloropsis* cultivadas se diluye con agua hasta el 10 % en contenido de materia seca. Después, se bombea la suspensión a través de dos unidades de microfluidizador para romper las células microbianas. En la primera unidad el diámetro del canal es de 200 micrómetros y en la segunda es de 100 micrómetros. La suspensión se bombea a través de la unidad de microfluidizador a una presión conductora de 120,00 MPa (1200 bares) y la suspensión se hace circular a través de las unidades durante 10 minutos.

25 La microscopía muestra que las células de *Nannochloropsis* se rompen de forma completa hasta fragmentos en el intervalo de micrómetros.

30 La suspensión de células rotas se extrae después con propano, como se describe en el ejemplo comparativo 1. El rendimiento de extracción obtenido es solo del 0,53 % de la materia seca de la biomasa original, el cual es mucho menor que el rendimiento discutido en el ejemplo 1 utilizando el pretratamiento térmico antes de la extracción.

El resultado de esta prueba demuestra que el rendimiento potenciado debido al pretratamiento térmico no es consecuencia de la ruptura de las células de la biomasa.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la recuperación de lípidos a partir de biomasa microbiana que comprende las etapas de
 - 5 (i) proporcionar biomasa microbiana húmeda para el pretratamiento térmico en un recipiente a presión a una temperatura de 100 °C a 250 °C, y
 - (ii) someter dicha biomasa microbiana pretratada de forma térmica a extracción utilizando un extractante que comprende propano líquido, y
 - 10 (iii) posteriormente, recuperar un producto que contiene lípidos.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el contenido de materia seca de la biomasa húmeda es menor del 70 % en peso y por lo menos el 5 %, preferentemente por lo menos el 15 %, más preferentemente por lo menos el 19 %, tal como más del 20 %.
- 15 3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha biomasa microbiana húmeda se selecciona del grupo de bacterias, cianobacterias, hongos preferentemente levaduras, hongos filamentosos y mohos, arqueas, protozoos, plantas microscópicas tales como algas, microalgas, plancton y planarias, más preferentemente microalgas, bacterias, hongos preferentemente levaduras, hongos filamentosos y mohos.
- 20 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la temperatura de dicho pretratamiento térmico es de 150 °C a 250 °C, muy preferentemente de 160 °C a 220 °C.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha biomasa pretratada de forma térmica se enfría o se deja enfriar antes de la extracción.
- 25 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho enfriamiento se realiza en una temperatura por debajo de 97 °C, preferentemente por debajo de 80 °C, más preferentemente por debajo de 65 °C, muy preferentemente de 40 °C a 65 °C.
- 30 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dichos lípidos recuperados se separan de dicho extractante reduciendo la presión para evaporar el extractante.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dichos lípidos recuperados mezclados con el extractante se utilizan como tal para procesos de refinado de aceite.
- 35 9. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho extractante se hace circular de nuevo a la etapa de extracción (ii).

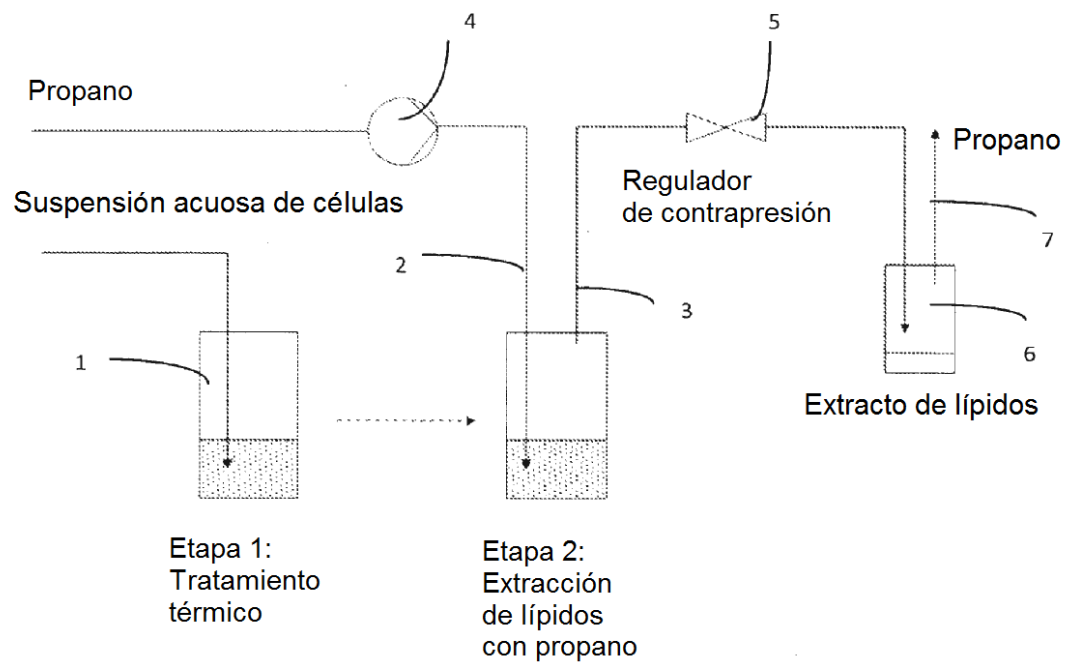


Figura 1.

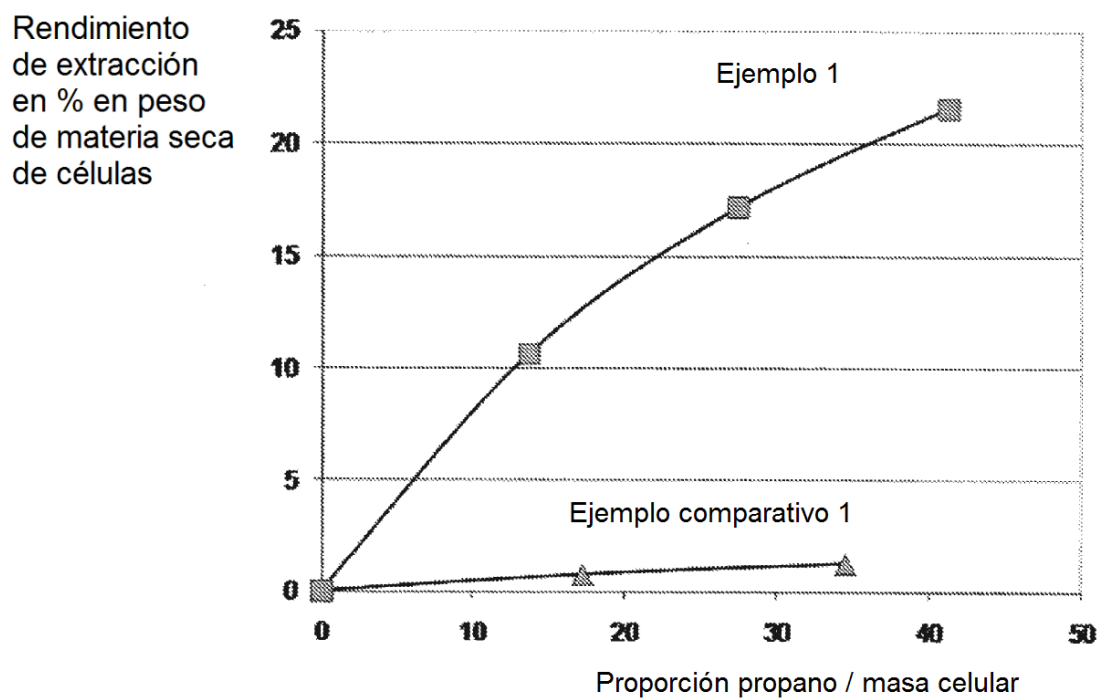


Figura 2.

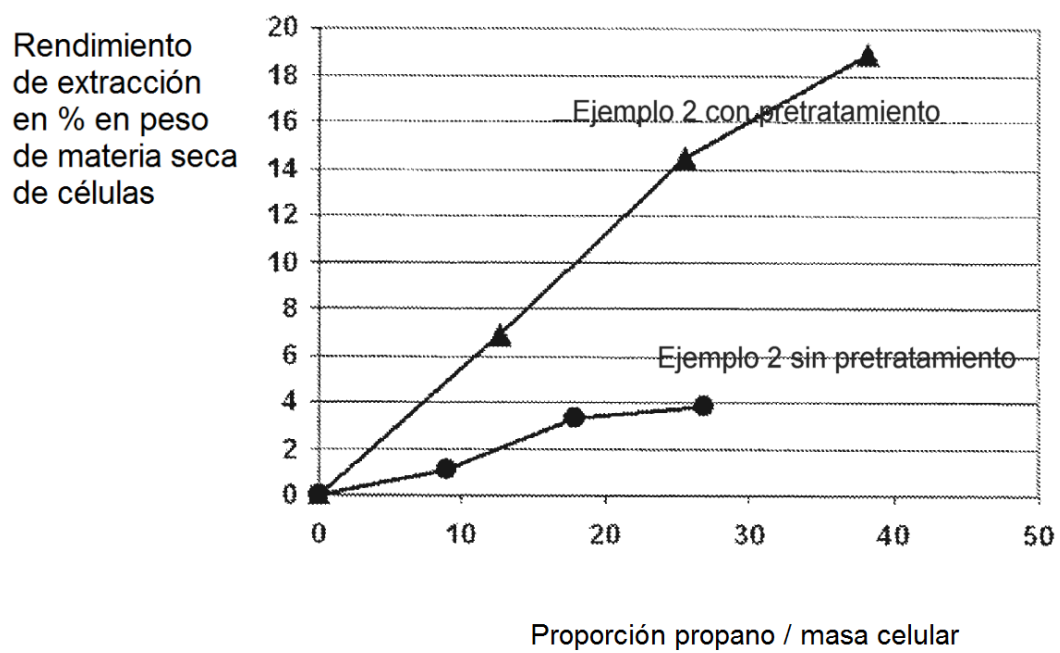


Figura 3.