

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 578**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64	(2006.01)
C11B 1/02	(2006.01)
C11B 1/06	(2006.01)
D21C 3/04	(2006.01)
C12P 19/02	(2006.01)
C12P 19/14	(2006.01)
C13K 1/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2009 PCT/EP2009/007388**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.04.2010 WO2010046051**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2009 E 09743854 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2350300**

54 Título: **Procedimiento para la producción de lípidos a partir de biomasa**

30 Prioridad:

21.10.2008 IT MI20081863

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

21.06.2017

73 Titular/es:

**ENI S.P.A. (100.0%)
Piazzale E. Mattei 1
00144 Rome, IT**

72 Inventor/es:

**BIANCHI, DANIELE;
FRANZOSI, GIULIANA y
ROMANO, ANNA MARIA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 618 578 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 para la producción de lípidos a partir de biomasa

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de lípidos a partir de biomasa, que incluye al menos un polisacárido.

5 Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de lípidos a partir de biomasa que incluye al menos un polisacárido que comprende someter dicha biomasa a hidrólisis ácida, someter la mezcla obtenida de dicha hidrólisis ácida a hidrólisis enzimática, y someter los azúcares obtenidos de dicha hidrólisis a fermentación en presencia de al menos una levadura oleaginosas.

10 Los lípidos así obtenidos pueden usarse ventajosamente en la producción de biodiésel o diésel verde, que puede usarse como tal, o en una mezcla con otros combustibles para vehículos de motor.

15 Hablando en términos generales, una biomasa es cualquier sustancia con una matriz orgánica, vegetal o animal, que puede ser destinada a fines energéticos, por ejemplo como materia prima para la producción de biocombustibles, o de componentes que pueden añadirse a combustibles. La biomasa puede formar por lo tanto una fuente de energía renovable como alternativa a materias primas tradicionales de origen fósil usadas normalmente en la producción de combustibles. Para este fin, es particularmente útil la biomasa lignocelulósica.

La producción de azúcares a partir de biomasa, en particular biomasa lignocelulósica, se conoce en la técnica.

La biomasa lignocelulósica es una estructura compleja que comprende tres componentes principales: celulosa, hemicelulosa y lignina. Sus cantidades relativas varían según el tipo de biomasa lignocelulósica usada. En el caso de las plantas, por ejemplo, dichas cantidades varían según la especie y edad de la planta.

20 La celulosa es el mayor constituyente de la biomasa lignocelulósica, y está presente generalmente en una cantidad que varía de 30 % en peso a 60 % en peso con respecto al peso total de la biomasa lignocelulósica. La celulosa consiste en moléculas de glucosa (de aproximadamente 500 a 10.000 unidades) unidas unas a otras mediante un enlace β -1,4 glucósido. El establecimiento de enlaces de hidrógeno entre las cadenas causa la formación de dominios cristalinos que dan resistencia y elasticidad a las fibras vegetales. En la naturaleza, puede encontrarse solamente en su estado puro en plantas anuales tales como algodón y lino, mientras que en las plantas leñosas está acompañada siempre por hemicelulosa y lignina.

25 La hemicelulosa, que está presente generalmente en una cantidad que varía de 10 % en peso a 40 % en peso con respecto al peso total de la biomasa lignocelulósica, aparece como un polímero mixto, relativamente corto (de 10 a 200 moléculas) y ramificado, constituido tanto por azúcares con seis átomos de carbono (glucosa, manosa, galactosa) como también azúcares con cinco átomos de carbono (xilosa, arabinosa). Algunas propiedades importantes de las fibras vegetales son debidas a la presencia de hemicelulosa, de la que la principal propiedad es la de favorecer la imbibición de dichas fibras vegetales, cuando está presente agua, causando su hinchamiento. La hemicelulosa también tiene propiedades adhesivas, y por lo tanto tiende a cementar o desarrollar una consistencia una consistencia córnea, con la consecuencia de que dichas fibras vegetales se hacen rígidas y son embebidas más lentamente.

30 La lignina está presente generalmente en una cantidad que varía de 10 % en peso a 30 % en peso con respecto al peso total de la biomasa lignocelulósica. Su función principal consiste en unir y cementar las diversas fibras vegetales unas con otras dando a la planta compactación y resistencia, y también proporciona protección contra insectos, agentes patógenos, lesiones y luz ultravioleta. Se usa principalmente como combustible, pero en la actualidad también se usa ampliamente en la industria como dispersante, endurecedor, agente emulsionante, para laminados plásticos, envases de cartón y artículos de caucho manufacturado. También puede tratarse químicamente para producir compuestos aromáticos, del tipo de la vainillina, siringaldehído, p-hidroxibenzaldehído, que pueden usarse en química farmacéutica, o en la industria cosmética y alimentaria.

35 A fin de optimizar la transformación de la biomasa lignocelulósica en productos para uso energético, se conoce someter dicha biomasa a un tratamiento preliminar para separar la lignina e hidrolizar la celulosa y hemicelulosa a azúcares simples, tales como, por ejemplo, glucosa y xilosa. Estos azúcares pueden usarse como fuentes de carbono en procedimientos de fermentación en presencia de microorganismos para la producción de alcoholes y/o lípidos.

40 La solicitud de patente de EE.UU. 2008/0102176, por ejemplo, describe un método para la extracción de grasas vegetales que comprende: pulverizar la materia prima que contiene celulosa para obtener partículas con un diámetro de 1-2 mm; sumergir las partículas en ácido sulfúrico a una concentración igual a 1-2 % para acidificar dichas partículas a fin de aumentar la hidrólisis de la celulosa y ajustar el pH a un valor de $4,5 \pm 0,5$; retirar las partículas acidificadas por el ácido sulfúrico y añadir, en secuencia, celulosa y una levadura oleaginosas a las partículas acidificadas y someter a fermentación durante 8-9 días a una temperatura de 25-30 °C y una humedad de 85-90 %; añadir un hidrocarburo alifático, como disolvente, a los productos de fermentación a fin de extraer las grasas, obteniendo una mezcla de extracción; retirar las partículas acidificadas que permanecen en la mezcla de extracción

y separar las grasas del disolvente por destilación, obteniendo aceite bruto. La celulasa es preferiblemente *Trichoderma viride* y la levadura oleaginosa es *Rhodotorula glutinis*. Las grasas obtenidas pueden ser convertidas en biodiésel después de esterificación.

5 Dai et al. describen la producción de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas en el artículo: "Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity", publicado en "African Journal of Biotechnology" (2007), Vol. 6 (18), páginas 2130-2134. En dicho artículo, la biomasa lignocelulósica se muele y se somete a hidrólisis ácida en presencia de ácido sulfúrico. Los azúcares así obtenidos se usan como fuentes de carbono en un procedimiento de fermentación en presencia de una cepa seleccionada previamente de *Rhodotorula glutinis*, capaz de usar también pentosas, xilosa en particular, con el fin de obtener aceites que se extraen
10 posteriormente por extracción Soxhlet y se someten a transesterificación a fin de obtener biodiésel.

Greenwalt et al. (2000), Life Support & Biosphere Science, vol. 7, páginas 243-249, describe ozonización y tratamiento alcalino-peróxido como métodos de pretratamiento para la sacarificación enzimática y fermentación posterior de paja de trigo con la levadura oleaginosa *Cryptococcus curvatus*.

Los procedimientos anteriores, sin embargo, pueden tener diversos inconvenientes.

15 A fin de hidrolizar ambos componentes polisacáridos de la biomasa (p.ej., hemicelulosa y celulosa), por ejemplo, en particular en presencia de ácido sulfúrico diluido (p.ej., a concentraciones que varían de 0-5 % a 11 %) es necesario operar a altas temperaturas (p.ej., por encima de 160 °C). A dichas temperaturas, se produce la formación de subproductos que derivan de la deshidratación de los azúcares y de la despolimerización parcial de la lignina. Estos subproductos, e particular furfural, hidroximetilfurfural, compuestos fenólicos, pueden actuar como inhibidores del
20 crecimiento de los microorganismos usados normalmente en los procedimientos de fermentación de azúcares posteriores. Además, en presencia de ácido sulfúrico diluido, el rendimiento de azúcares, glucosa en particular, es normalmente bajo (p.ej., menor que 50 %).

Además, antes de someter los azúcares a fermentación, puede ser necesario neutralizar el ácido sulfúrico para
25 ajustar el pH a valores aceptables para la fermentación posterior. La neutralización se obtiene generalmente añadiendo óxidos y/o hidróxidos tales como, por ejemplo, óxido de calcio, hidróxido de calcio o hidróxido de bario, con la formación consiguiente de sales (p.ej., sulfato de calcio, sulfato de calcio dihidrato ("yeso"), sulfato de bario) que precipitan y deben ser separadas por lo tanto de los azúcares antes de que estos últimos sean sometidos a fermentación. Además, estas sales deben ser desechadas posteriormente por medio de un tratamiento adecuado, con un consiguiente aumento en el coste de producción. Además, es imposible recuperar y reutilizar dicho ácido
30 inorgánico.

El Solicitante ha encontrado ahora que la producción de lípidos a partir de biomasa, en particular a partir de biomasa que incluye al menos un polisacárido, puede ser realizada ventajosamente por medio de un procedimiento que comprende someter dicha biomasa a hidrólisis ácida en presencia de una disolución acuosa de al menos un ácido orgánico, a una temperatura menor que o igual a 160 °C, someter la mezcla obtenida de dicha hidrólisis ácida a
35 hidrólisis enzimática, y someter los azúcares obtenidos de estas hidrólisis a fermentación en presencia de al menos una levadura oleaginosa.

Se obtienen numerosas ventajas por medio de este procedimiento. Dicho procedimiento permite, por ejemplo, obtener un alto rendimiento de azúcares de pentosa y hexosa, que derivan de la hidrólisis ácida de dicha biomasa, que pueden usarse posteriormente como fuentes de carbono en procedimientos de fermentación para la producción
40 de lípidos. Dichos lípidos pueden usarse ventajosamente en la producción de biodiésel o diésel verde, que puede usarse como tal, o mezclarse con otros combustibles para vehículos de motor.

Además, la posibilidad de operar a temperaturas que no son altas, es decir, menores que o iguales a 160 °C, permite reducir la formación de subproductos, tales como, por ejemplo, furfural, hidroximetilfurfural, compuestos fenólicos, que pueden actuar como inhibidores del crecimiento de los microorganismos usados normalmente en los
45 procedimientos de fermentación de azúcares posteriores.

Otra ventaja relevante radica en el hecho de que dicho procedimiento permite recuperar el ácido orgánico, que puede ser reciclado después al procedimiento anterior, en particular, a la hidrólisis ácida de la biomasa. Dicha recuperación también permite evitar la etapa de neutralización y, por lo tanto, la producción de sales y su desecho posterior.

50 Una ventaja relevante adicional es que la fase sólida húmeda que comprende residuos celulares, en particular proteínas y polisacáridos contenidos en la membrana celular de las levaduras oleaginosas usadas, que se obtiene al final de la fermentación, puede ser recuperada y usada en el procedimiento mencionado anteriormente, en particular puede usarse en la hidrólisis ácida. La hidrólisis ácida de esta fase sólida húmeda permite obtener aminoácidos a partir de proteínas y azúcares a partir de polisacáridos, que se envían posteriormente a la etapa de fermentación, permitiendo, de esta manera, reducir la cantidad de nitrógeno que debe añadirse normalmente al medio de cultivo en
55 el que tiene lugar la fermentación, y proporcionar azúcares adicionales para la fermentación.

Un objeto de la presente invención se refiere por lo tanto a un procedimiento para la producción de lípidos a partir de

biomasa que incluye al menos un polisacárido, que comprende:

- 5 - someter dicha biomasa a hidrólisis ácida en presencia de una disolución acuosa de al menos un ácido orgánico seleccionado de ácidos alquil- o aril-sulfónicos que tienen de C₇ a C₂₀ átomos de carbono, preferiblemente de C₉ a C₁₅ átomos de carbono, a una temperatura que varía de 80 °C a 160 °C, preferiblemente de 100 °C a 150 °C, obteniendo una primera mezcla que comprende una primera fase sólida y una primera fase acuosa;
- someter dicha primera mezcla a hidrólisis enzimática obteniendo una segunda mezcla que comprende una segunda fase sólida y una segunda fase acuosa;
- 10 - someter dicha segunda fase acuosa a fermentación en presencia de al menos una levadura oleaginosa obteniendo una biomasa celular oleaginosa que comprende lípidos.

Para los fines de la presente descripción y de las siguientes reivindicaciones, la definición de los intervalos numéricos siempre incluye los extremos, a menos que se especifique lo contrario.

15 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho polisacárido puede seleccionarse de celulosa, hemicelulosa o mezclas de las mismas. La celulosa, o mezclas de hemicelulosa y celulosa, son particularmente preferidas.

De acuerdo con una realización preferida adicional de la presente invención, dicha biomasa es una biomasa lignocelulósica. Como se mencionó anteriormente, la biomasa lignocelulósica incluye tres componentes: hemicelulosa, celulosa y lignina.

Dicha biomasa lignocelulósica se selecciona preferiblemente de:

- 20 - productos de cultivos cultivados expresamente para uso energético (por ejemplo, miscanthus, mijo, caña común), incluyendo subproductos, residuos y desechos de dichos cultivos o de su procesamiento;
- productos de cultivos agrícolas, forestación y silvicultura, que comprenden madera, plantas, residuos y subproductos de procesamiento agrícola, forestación y silvicultura;
- subproductos de agri-alimentos destinados a alimentación humana o zootécnica;
- 25 - residuos, no tratados químicamente, de la industria del papel;
- productos de desecho que provienen de la recogida diferenciada de desechos sólidos urbanos (p.ej., desechos urbanos de origen vegetal, papel).

30 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha biomasa puede someterse a un procedimiento de molienda preliminar antes de ser sometida a hidrólisis ácida. Dicha biomasa se muele preferiblemente hasta que se obtienen partículas que tienen un diámetro que varía de 0,1 mm a 10 mm, más preferiblemente que varía de 0,5 mm a 4 mm. Las partículas que tienen un diámetro menor que 1 mm son particularmente preferidas.

35 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha biomasa está presente en la mezcla de reacción en una cantidad que varía de 5 % en peso a 40 % en peso, preferiblemente de 20 % en peso a 35 % en peso, con respecto al peso total de la mezcla de reacción.

Para los fines de la presente descripción y de las siguientes reivindicaciones, la expresión "mezcla de reacción" significa la mezcla que comprende la biomasa y la disolución acuosa de dicho al menos un ácido orgánico.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho al menos un ácido orgánico es soluble en agua y extraíble con un disolvente orgánico insoluble en agua.

40 Para los fines de la presente invención y de las siguientes reivindicaciones, la expresión "ácido orgánico soluble en agua" significa un ácido orgánico que tiene una solubilidad en agua destilada, a 25 °C, de al menos 0,5 g/100 ml de agua destilada, preferiblemente de al menos 2 g/100 ml de agua destilada.

45 Para los fines de la presente invención y de las siguientes reivindicaciones, la expresión "ácido orgánico extraíble con un disolvente orgánico insoluble en agua" significa un ácido orgánico que puede ser extraído con un disolvente orgánico insoluble en agua con un rendimiento de al menos 80 %, preferiblemente de al menos 90 %, calculándose dicho rendimiento con respecto a la cantidad total de ácido orgánico presente en la disolución acuosa.

Para los fines de la presente invención y de las siguientes reivindicaciones, la expresión "ácido orgánico insoluble en agua" significa un ácido orgánico que tiene una solubilidad en agua destilada, a 25 °C, menor que 4 % en volumen, preferiblemente menor que 2 % en volumen.

50 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dichos ácidos alquil- o aril-sulfónicos pueden

seleccionarse de: ácido dodecil-sulfónico, ácido para-tolueno-sulfónico, ácido 1-naftaleno-sulfónico, ácido 2-naftaleno-sulfónico, ácido 1,5-naftaleno-disulfónico, o mezclas de los mismos. El ácido para-tolueno-sulfónico, ácido 2-naftaleno-sulfónico, ácido 1,5-naftaleno-disulfónico, o mezclas de los mismos, son particularmente preferidos.

5 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho al menos un ácido orgánico está presente en la disolución acuosa en una concentración que varía de 0,1 % en peso a 5 % en peso, preferiblemente de 0,5 % en peso a 2,5 % en peso, con respecto al peso total de la disolución acuosa.

10 Dicho ácido orgánico actúa como catalizador para la hidrólisis ácida de dicha biomasa. En particular, cuando la biomasa de partida es una biomasa lignocelulósica, dicho ácido orgánico actúa específicamente como catalizador para la hidrólisis ácida de la hemicelulosa. Debe señalarse que el procedimiento objeto de la presente invención, cuando la biomasa de partida es una biomasa lignocelulósica, no sólo permite obtener la hidrólisis ácida de la hemicelulosa, sino también mejora la disposición de la celulosa, permaneciendo dicha celulosa sustancialmente no hidrolizada, para la hidrólisis enzimática posterior, gracias a una desestructuración mejorada de la biomasa de partida.

15 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha hidrólisis ácida puede llevarse a cabo durante un tiempo que varía de 20 minutos a 6 horas, preferiblemente de 30 minutos a 3 horas.

Dicha hidrólisis ácida puede llevarse a cabo en reactores conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, autoclaves, o extrusores.

20 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha primera fase sólida comprende lignina y celulosa y dicha primera fase acuosa comprende al menos un azúcar que tiene de C₅ a C₆ átomos de carbono y dicho al menos un ácido orgánico. Dicho azúcar es preferiblemente xilosa. Dicha xilosa deriva preferiblemente de la hidrólisis ácida de la hemicelulosa.

25 Dicha hidrólisis ácida permite obtener al menos un azúcar que tiene de C₅ a C₆ átomos de carbono, en particular xilosa que deriva de la hidrólisis ácida de la hemicelulosa, con un alto rendimiento. Más específicamente, dicha hidrólisis ácida permite obtener un rendimiento de xilosa más alto que o igual a 80 %, calculándose dicho rendimiento con respecto a la cantidad total de xilosa presente en la biomasa de partida.

Dicha hidrólisis ácida permite también obtener altos rendimientos de celulosa y lignina.

Para recuperar dicho al menos un ácido orgánico, dicha primera mezcla puede someterse a extracción con un disolvente orgánico soluble en agua.

30 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho procedimiento también comprende someter dicha primera mezcla a extracción con al menos un disolvente orgánico insoluble en agua. Preferiblemente, dicho disolvente orgánico insoluble en agua puede seleccionarse de: hidrocarburos halogenados tales como, por ejemplo, cloruro de metileno, monoclorobenceno, diclorobenceno, o mezclas de los mismos; hidrocarburos aromáticos tales como, por ejemplo, tolueno, xileno, o mezclas de los mismos; alcoholes alifáticos que tienen de C₄ a C₆ átomos de carbono tales como, por ejemplo, n-butanol, n-pentanol, o mezclas de los mismos; o mezclas de los mismos. Las mezclas de tolueno y n-butanol son particularmente preferidas.

35 Dicho disolvente orgánico insoluble en agua se evapora posteriormente obteniendo una fase sólida adicional que comprende dicho al menos un ácido orgánico.

40 Como se especificó anteriormente, el procedimiento objeto de la presente invención permite recuperar dicho al menos un ácido orgánico con un alto rendimiento, en particular, con un rendimiento de al menos 80 %, preferiblemente de al menos 90 %, calculándose dicho rendimiento con respecto a la cantidad total de ácido orgánico presente en dicha disolución acuosa. Dicho al menos un ácido orgánico, por lo tanto, puede reutilizarse posteriormente según el procedimiento objeto de la presente invención. Debe señalarse que, cuando la recuperación de dicho al menos un ácido orgánico es igual a 100 %, dicha primera fase acuosa estará exenta de dicho al menos un ácido orgánico.

45 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho procedimiento también comprende reutilizar dicho al menos un ácido orgánico en dicha hidrólisis ácida.

50 Para los fines del procedimiento objeto de la presente invención, dicha hidrólisis enzimática puede llevarse a cabo según técnicas conocidas en la técnica, como se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 5.628.830, 5.916.780 y 6.090.595, usando enzimas comerciales tales como, por ejemplo, Celluclast 1.5L (Novozymes), Econase CE (Rohm Enzymes), Spezyme (Genecor), Novozym 188 (Novozymes), usadas individualmente o mezcladas unas con otras.

Para ajustar el pH a valores que varían de 4 a 6, preferiblemente de 4,5 a 5,5, puede añadirse ácido acético glacial a dicha primera mezcla, antes de la hidrólisis enzimática, en una cantidad tal como para obtener el pH deseado.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha segunda fase sólida comprende lignina y

dicha segunda fase acuosa comprende al menos un azúcar que tiene de C₅ a C₆ átomos de carbono, preferiblemente xilosa, glucosa, celobiosa o mezclas de las mismas. En particular, dicha segunda fase acuosa comprende xilosa que deriva de la hidrólisis ácida de la hemicelulosa, glucosa y celobiosa que derivan de la hidrólisis enzimática de la celulosa.

- 5 En particular, esta hidrólisis enzimática permite obtener un alto rendimiento de glucosa, más específicamente un rendimiento de glucosa más alto que o igual a 90 %, calculándose dicho rendimiento con respecto a la cantidad total de glucosa presente en la biomasa de partida.

Las cantidades de azúcares contenidos en la biomasa de partida, así como también las cantidades de azúcares obtenidos después de la hidrólisis (hidrólisis ácida y/o enzimática), pueden ser determinadas por medio de técnicas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, Cromatografía Líquida de Alta Resolución - HPLC.

10 Dicha segunda fase sólida y dicha segunda fase acuosa pueden ser separadas por técnicas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, filtración, centrifugación. Dichas fases se separan preferiblemente por filtración.

Dicha segunda fase sólida, que comprende lignina, puede ser ascendida en calidad como combustible, por ejemplo como combustible para producir la energía necesaria para sostener los procedimientos de tratamiento de la biomasa.

15 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha fermentación puede llevarse a cabo a una temperatura que varía de 20 °C a 40 °C, preferiblemente de 25 °C a 35 °C.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha fermentación puede llevarse a cabo durante un tiempo que varía de 3 días a 10 días, preferiblemente de 4 días a 8 días.

20 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha fermentación puede llevarse a cabo a un pH que varía de 4,5 a 6,5, preferiblemente de 5 a 6. Para mantener el pH dentro de los intervalos deseados, puede añadirse una disolución acuosa de al menos una base inorgánica tal como, por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio o mezclas de los mismos, al medio de cultivo usado para la fermentación, en una cantidad que sea tal como para obtener el pH deseado.

25 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha levadura oleaginosa puede seleccionarse de: *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula gracilis*, *Rhodotorula graminis*, *Lypomices starkeyi*, *Lypomices lipofer*, *Trigonopsis variabilis*, *Candida kefyri*, *Candida curvata*, *Candida lipolytica*, *Pichia stipitis*, *Torulopsis sp.*.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha fermentación es una fermentación de lote alimentado.

30 Antes de usarse en dicha fermentación, dicha levadura oleaginosa se cultiva preferiblemente en un medio de cultivo que contiene xilosa, celobiosa, glucosa o mezclas de las mismas, en una concentración que varía preferiblemente de 1 % en peso a 2 % en peso con respecto al peso total de dicho medio de cultivo.

Dicha fermentación puede llevarse a cabo ventajosamente en fermentadores conocidos en la técnica, en presencia de medios de cultivo usados normalmente para este fin que comprenden nutrientes tales como, por ejemplo, nitrógeno, fosfato de potasio, magnesio, sales, vitaminas.

35 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho procedimiento comprende también someter dicha biomasa celular oleaginosa a tratamiento mecánico.

Dicho tratamiento mecánico puede realizarse usando equipos y técnicas que son conocidos en la técnica.

40 Dicho tratamiento mecánico puede realizarse ventajosamente, por ejemplo, usando homogeneizadores de alta presión, preferiblemente a una presión que varía de 30 MPa (300 bar) a 50 MPa (500 bar) (p.ej., homogeneizador Polytron), o usando una prensa de células French.

Un tratamiento mecánico se realiza preferiblemente usando una prensa de células French, que opera a una presión que varía de 137,9 MPa (20 Kpsi) a 344,7 MPa (50 Kpsi), preferiblemente de 241,3 MPa (35 Kpsi) a 310,3 MPa (45 Kpsi).

45 A fin de concentrar la biomasa celular oleaginosa, antes de ser sometida a tratamiento mecánico, dicha biomasa puede ser sometida a centrifugación. Dicha centrifugación puede realizarse durante un tiempo que varía de 5 minutos a 30 minutos, preferiblemente de 15 minutos a 25 minutos, a una velocidad de rotación que varía de 3.000 rpm a 9.000 rpm, preferiblemente de 4.000 a 8.000 rpm.

50 A fin de desactivar las enzimas lipolíticas (p.ej., lipasa), dicha biomasa celular oleaginosa, antes de ser sometida a tratamiento mecánico, puede ser sometida a tratamiento térmico. Dicho tratamiento térmico puede llevarse a cabo a una temperatura que varía de 70 °C a 90 °C, preferiblemente de 75 °C a 85 °C, durante un tiempo que varía de 30 minutos a 3 horas, preferiblemente de 1 a 2 horas.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho procedimiento comprende también someter dicha biomasa celular oleaginosa a centrifugación, después del tratamiento mecánico.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha centrifugación puede llevarse a cabo durante un tiempo que varía de 5 minutos a 30 minutos, preferiblemente de 10 minutos a 25 minutos, a una velocidad de rotación que varía de 3.000 rpm a 9.000 rpm, preferiblemente de 4.000 rpm a 8.000 rpm.

Al final de la centrifugación, se obtienen las siguientes fases:

- (i) una fase oleosa que comprende lípidos;
- (ii) una fase acuosa que comprende trazas de lípidos no separados y azúcares no fermentados;
- (iii) una fase sólida húmeda que comprende residuos celulares y trazas de lípidos no separados.

El procedimiento objeto de la presente invención permite recuperar los lípidos con un rendimiento que varía de 50 % a 90 %, preferiblemente de 55 % a 80 %, calculándose dicho rendimiento con respecto a la cantidad total de lípidos presentes en la biomasa celular oleaginosa obtenida después de la fermentación.

Los lípidos incluidos en dicha fase oleosa (i) son preferiblemente triglicéridos, más preferiblemente ésteres de glicerol con ácidos grasos que tienen de C₁₄ a C₂₀ átomos de carbono tales como, por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido α -linoleico, en una cantidad más alta que o igual a 80 % en peso, preferiblemente más alta que o igual a 90 % en peso, con respecto al peso total de los lípidos. Otros lípidos que pueden estar presentes en dicha fase oleosa son: fosfolípidos, monoglicéridos, diglicéridos, o mezclas de los mismos.

La cantidad de lípidos contenidos en la biomasa celular oleaginosa obtenida después de la fermentación, como también la cantidad de lípidos contenidos en dicha fase oleosa, puede determinarse por medio de técnicas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, el método colorimétrico que está basado en la reacción de lípidos con ácido fosfórico y fosfo-vainillina: pueden encontrarse detalles adicionales para este método, por ejemplo, en el siguiente artículo: "Chemical Basis of the Sulpho-phospho-vanillin reaction for Estimating Total Serum Lipids", J. A. Knight et al., publicado en "Clinical Chemistry" (1972), Vol. 18, No. 3, páginas 199-202.

Como ya se especificó anteriormente, la fase sólida húmeda (iii) que comprende residuos celulares, en particular proteínas y polisacáridos contenidos en la membrana celular de la levadura oleaginosa usada, puede ser recuperada y usada en el procedimiento objeto de la presente invención, en particular puede ser enviada a la hidrólisis ácida. Las proteínas y polisacáridos de la membrana son hidrolizados después a aminoácidos y azúcares simples (por ejemplo, glucosa, manosa) que pueden usarse después como fuente de nitrógeno y carbono en la fermentación posterior. Debe subrayarse el hecho de que la recuperación y uso de dicha fase sólida húmeda (iii) permite suministrar nitrógeno al medio de cultivo usado para la fermentación, reduciendo por consiguiente la cantidad de nitrógeno añadida normalmente al medio de cultivo en el que tiene lugar la fermentación y proporcionando azúcares adicionales para la fermentación.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho procedimiento comprende también enviar dicha fase sólida húmeda (iii) a hidrólisis ácida. En este caso, dicha primera fase acuosa, además de dicho al menos un azúcar que tiene de C₅ a C₆ átomos de carbono y dicho al menos un ácido orgánico, comprenderá aminoácidos y azúcares simples (por ejemplo, glucosa y manosa) que derivan de la hidrólisis ácida de las proteínas y de los polisacáridos de la membrana; mientras que dicha primera fase sólida comprenderá, además de celulosa y lignina, residuos celulares no hidrolizados.

Para obtener un rendimiento de lípidos más alto, es decir, un rendimiento más alto que 90 %, dicha fase acuosa (ii) y/o dicha fase sólida húmeda (iii) pueden someterse a extracción con un disolvente, o con una mezcla de alcohol/disolvente.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho procedimiento comprende también someter dicha fase acuosa (ii) y/o dicha fase sólida húmeda (iii) a extracción con al menos un disolvente que puede seleccionarse de hidrocarburos alifáticos que tienen de C₃ a C₁₀ átomos de carbono tales como, por ejemplo, pentano, n-hexano, octano o mezclas de los mismos; o con una mezcla que comprende al menos un alcohol alifático que tiene de C₃ a C₅ átomos de carbono que puede seleccionarse de, por ejemplo, isopropanol, n-butanol, o mezclas de los mismos, y al menos un hidrocarburo alifático que tiene de C₃ a C₁₀ átomos de carbono seleccionado de los descritos anteriormente. Dicho disolvente orgánico y/o dicha mezcla son evaporados posteriormente obteniendo una fase oleosa adicional que comprende lípidos, una fase acuosa adicional que comprende azúcares no fermentados y una fase sólida húmeda adicional que comprende residuos celulares.

Como se describió anteriormente para la fase sólida húmeda (iii), dicha fase sólida húmeda adicional obtenida después de dicha extracción también puede ser recuperada y enviada a la hidrólisis ácida.

Los lípidos obtenidos según el procedimiento de la presente invención pueden ser sometidos a esterificación en presencia de un alcohol que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, preferiblemente metanol, etanol, y de un catalizador

ácido o básico, a fin de producir glicerol y ésteres de alquilo, en particular ésteres de metilo o ésteres de etilo (biodiésel).

5 Alternativamente, dichos lípidos pueden ser sometidos a hidrogenación/desoxigenación en presencia de hidrógeno y un catalizador a fin de producir diésel verde. Los procedimientos de hidrogenación/desoxigenación son conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente europea EP 1.728.844.

La presente invención se describirá ahora mediante una forma ilustrativa con referencia a la Figura 1 proporcionada al final de la presente memoria.

10 Según una realización típica del procedimiento objeto de la presente invención, la biomasa (p.ej., biomasa lignocelulósica molida previamente) se somete a hidrólisis ácida en presencia de un ácido orgánico (p.ej., ácido 2-naftaleno-sulfónico), obteniendo una primera mezcla que comprende una primera fase acuosa que incluye xilosa que deriva de la hidrólisis de la hemicelulosa y dicho ácido orgánico, y una primera fase sólida que comprende lignina y celulosa.

15 Como se representa en la Figura 1, dicha primera mezcla se somete a extracción con un disolvente orgánico insoluble en agua (p.ej., una mezcla de tolueno y n-butanol) para recuperar dicho ácido orgánico y reciclarlo, después de la evaporación del disolvente, a dicha hidrólisis ácida.

Después de la extracción con el disolvente, dicha primera mezcla se somete a hidrólisis enzimática, en presencia de una enzima (p.ej., una disolución acuosa de Celluclast 1,5L y Novozym 188) obteniendo una segunda mezcla que comprende una segunda fase acuosa que incluye xilosa que deriva de la hidrólisis ácida de la hemicelulosa, glucosa y celobiosa que derivan de la hidrólisis enzimática de la celulosa, y una segunda fase sólida que incluye lignina.

20 Antes de ser sometida a hidrólisis enzimática, puede añadirse ácido acético glacial a dicha primera mezcla a fin de ajustar el pH a valores que varían de 4 a 6 (no representado en la Figura 1).

Dicha segunda fase acuosa y dicha segunda fase sólida se separan por filtración (no representado en la Figura 1).

Dicha segunda fase acuosa se somete a fermentación en presencia de una levadura oleaginosa (p.ej., *Lypomices starkey* NRRL 1389).

25 Al final de la fermentación, se obtiene una biomasa celular oleaginosa, que se somete a tratamiento mecánico (p.ej., por medio de una prensa de células French), y a centrifugación posterior obteniendo las siguientes tres fases:

- (i) una fase oleosa que comprende lípidos;
- (ii) una fase acuosa que comprende trazas de lípidos no separados y azúcares no fermentados;
- (iii) una fase sólida húmeda que comprende residuos celulares y trazas de lípidos no separados.

30 A fin de concentrar la biomasa celular oleaginosa, antes de ser sometida a tratamiento mecánico, dicha biomasa puede ser sometida a centrifugación (no representado en la Figura 1).

A fin de desactivar las enzimas lipolíticas (p.ej., lipasa), antes de ser sometida a tratamiento mecánico, dicha biomasa celular oleaginosa puede ser sometida a tratamiento térmico (no representado en la Figura 1).

Como se representa en la Figura 1, dicha fase sólida húmeda (iii) se envía a hidrólisis ácida.

35 A fin de obtener un alto rendimiento de lípidos, dicha fase acuosa (ii) y dicha fase sólida húmeda (iii) pueden ser sometidas a extracción en presencia de una mezcla que comprende al menos un alcohol alifático y al menos un hidrocarburo alifático (p.ej., una mezcla de isopropanol y n-hexano) (no representado en la Figura 1).

Se proporcionan algunos ejemplos ilustrativos y no limitantes para una mejor comprensión de la presente invención y para su realización.

40 Ejemplos

Ejemplo 1

Hidrólisis ácida de la biomasa

Se añadieron 300 g de madera de conífera molida previamente (diámetro de partículas < 1 mm) a una disolución de 20 g de ácido 2-naftalenosulfónico en 1 l de agua.

45 La composición de la biomasa de partida fue la siguiente: 50 % en peso de celulosa, 25 % en peso de hemicelulosa, 25 % en peso de lignina, con respecto al peso total de la biomasa de partida.

La mezcla de reacción así obtenida se mantuvo, bajo agitación, en un autoclave, a 140 °C, durante 1 hora,

obteniendo una primera mezcla que comprendía 225 g (peso seco) de una primera fase sólida (que comprendía celulosa y lignina) y 1.095 g de una primera fase acuosa (que comprendía xilosa que derivaba de la hidrólisis de la hemicelulosa y ácido 2-naftalenosulfónico).

5 Después de enfriar hasta 25 °C, dicha primera mezcla se sometió a extracción con 1 l de una mezcla de tolueno y n-butanol (3/1 en volumen).

La mezcla de tolueno y n-butanol se separó y evaporó posteriormente, a presión reducida, obteniendo una fase sólida adicional que comprendía 19,6 g (peso seco) de ácido 2-naftalenosulfónico (rendimiento de recuperación 98 % calculado con respecto a la cantidad total del ácido presente en la disolución acuosa).

10 Después de la separación del ácido, se añadió ácido acético glacial a dicha primera mezcla hasta que se obtuvo un pH de dicha primera fase acuosa igual a 5.

Se añadió posteriormente una disolución acuosa de la enzima Celluclast 1,5L (Novozymes) correspondiente a 1485 FPU (Unidades de Papel de Filtro) y la enzima Novozym 188 (de Novozymes) correspondiente a 18.000 BGU (Unidades de Beta Glucanasa). La suspensión así obtenida se mantuvo bajo agitación, durante 72 horas, a 45 °C.

15 Al final de la hidrólisis enzimática, se separaron por filtración 90 g (peso seco) de una segunda fase sólida que comprendía lignina (75 g - peso seco) y celulosa no hidrolizada (15 g - peso seco) y 1.200 g de una segunda fase acuosa que comprendía glucosa (152 g - peso seco) y xilosa (72 g - peso seco).

Fermentación

20 Se diluyeron adecuadamente con agua destilada 250 ml de dicha segunda fase acuosa obtenida como se describió anteriormente, que contenía 200 g/l de azúcares, hasta que se obtuvo una disolución que tenía una concentración final de azúcares igual a 50 g/l.

25 Se añadieron los siguientes nutrientes a esta disolución: sulfato de amonio 0,1 %, KH_2PO_4 0,1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 %, NaCl 0,001 %, CaCl_2 0,001 %, extracto de levadura 0,1 %. El caldo de fermentación (medio de cultivo) así obtenido se inoculó en un fermentador con células de levadura (*Lypomices starkey* NRRL 1389) (inóculo igual a 2,5 g/l – peso seco) para un volumen de fermentación igual a 1 litro, y se mantuvo el pH en 5,5 mediante la adición de una disolución acuosa de NaOH 0,1 M.

Se cultivaron las células de levadura, bajo agitación a 500 rpm, a 30 °C, aireación 0,5 l/min de aire estéril.

Se añadieron al fermentador 250 ml adicionales de dicha segunda fase acuosa obtenida de la hidrólisis de la biomasa, que contenía 200 g/l de azúcares, diluida adecuadamente con agua destilada para obtener una disolución que tenía una concentración final de azúcares igual a 50 g/l.

30 Después de 150 horas, se recogieron las células de levadura y se centrifugaron a 7.000 rpm, durante 20 minutos, obteniendo 52 g (peso seco) de biomasa celular oleaginoso.

Recuperación de los lípidos

La biomasa celular oleaginoso así obtenida se mantuvo a 80 °C, durante dos horas, a fin de inhibir las enzimas lipolíticas, y después se resuspendió en 200 ml de agua.

35 La suspensión así obtenida se sometió a tratamiento mecánico por medio de una prensa de células French, que operaba a una presión de 269 MPa (39 Kpsi) obteniendo un lisado celular.

Dicho lisado celular se centrifugó a 7.000 rpm durante 20 minutos obteniendo tres fases: una fase oleosa insoluble en agua, una fase acuosa y una fase sólida húmeda.

40 La fase oleosa insoluble en agua se separó y se secó en una estufa a 60 °C, obteniendo 19 g (peso seco) de un residuo oleoso que comprendía lípidos.

45 La fase acuosa que comprendía trazas de lípidos no separados y azúcares no fermentados y la fase sólida húmeda que comprendía residuos celulares y trazas de lípidos no separados, se extrajeron con 50 ml de una mezcla que comprendía n-hexano e isopropanol en una proporción de 3:1. La mezcla de disolventes se separó y evaporó, a presión reducida, obteniendo 12,2 g (peso seco) de un residuo oleoso adicional que comprendía lípidos, una fase sólida húmeda adicional y una fase acuosa adicional.

La cantidad total de lípidos obtenida es por lo tanto igual a 31,2 g (peso seco) (rendimiento de recuperación de 60 % calculado con respecto a la cantidad total de la biomasa celular oleaginoso obtenida después de la fermentación).

Los lípidos se determinaron por medio del método colorimétrico, que está basado en la reacción de los lípidos con ácido fosfórico y fosfo-vainillina.

50 La fase sólida húmeda adicional, obtenida después de la extracción de los lípidos, que comprendía agua y residuos

celulares, que incluía 42 % en peso (peso seco) de polisacáridos y 45 % en peso de proteínas (peso seco), se separó por centrifugación de la fase acuosa adicional que comprendía azúcares no fermentados.

Ejemplo 2

5 La fase sólida húmeda adicional, obtenida después de la extracción de los lípidos como se describe en el Ejemplo 1, se envió a hidrólisis ácida, operando bajo las condiciones indicadas a continuación.

Se añadieron 42 g (peso seco) de dicha fase sólida húmeda adicional y 260 g de madera de conífera molida previamente (diámetro de partículas < 1 mm) a una disolución de 20 g de ácido 2-naftalenosulfónico en 1 l de agua.

La composición de la biomasa de partida fue la siguiente: 50 % en peso de celulosa, 25 % en peso de hemicelulosa, 25 % en peso de lignina, con respecto al peso total de la biomasa de partida.

10 La mezcla de reacción así obtenida se mantuvo, bajo agitación, en un autoclave, a 140 °C, durante 1 hora, obteniendo una primera mezcla que comprendía 198 g (peso seco) de una primera fase sólida húmeda (que comprendía celulosa, lignina y residuos celulares) y 1.100 g de una primera fase acuosa (que comprendía xilosa que derivaba de la hidrólisis de la hemicelulosa, glucosa, manosa y aminoácidos que derivaban de la hidrólisis de los polisacáridos y de las proteínas de la membrana incluidas en los residuos celulares y ácido 2-naftalenosulfónico).

15 Después de enfriar hasta 25 °C, dicha primera mezcla se sometió a extracción con 1 l de una mezcla de tolueno y n-butanol (3/1 en volumen).

La mezcla de tolueno y n-butanol se separó y evaporó posteriormente, a presión reducida, obteniendo una fase sólida adicional que comprendía 19,5 g (peso seco) de ácido 2-naftalenosulfónico (rendimiento de recuperación 98 % calculado con respecto a la cantidad total del ácido presente en la disolución acuosa).

20 Después de la separación del ácido, se añadió ácido acético glacial a dicha primera mezcla hasta que se obtuvo un pH de dicha primera fase acuosa igual a 5,0.

Se añadió posteriormente una disolución acuosa de la enzima Celluclast 1,5L (Novozymes) correspondiente a 1400 FPU (Unidades de Papel de Filtro) y la enzima Novozym 188 (de Novozymes) correspondiente a 18.000 BGU (Unidades de beta Glucanasa). La suspensión así obtenida se mantuvo bajo agitación, durante 72 horas, a 45 °C.

25 Al final de la hidrólisis enzimática, se separaron por filtración 80 g (peso seco) de una segunda fase sólida que comprendía lignina (65 g – peso seco), celulosa no hidrolizada (13 g – peso seco) y residuos celulares (2 g – peso seco) y 1.220 g de una segunda fase acuosa que comprendía glucosa (139 g – peso seco), manosa (9 g – peso seco), xilosa (67 g – peso seco) y aminoácidos (20 g – peso seco).

Dicha segunda fase acuosa puede ser sometida a fermentación operando como se describe en el Ejemplo 1.

30

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de lípidos a partir de biomasa que incluye al menos un polisacárido, que comprende:
 - 5 - someter dicha biomasa a hidrólisis ácida en presencia de una disolución acuosa de al menos un ácido orgánico seleccionado de ácidos alquil- o aril-sulfónicos que tienen de C₇ a C₂₀ átomos de carbono, a una temperatura que varía de 80 °C a 160 °C, obteniendo una primera mezcla que comprende una primera fase sólida y una primera fase acuosa;
 - someter dicha primera mezcla a hidrólisis enzimática obteniendo una segunda mezcla que comprende una segunda fase sólida y una segunda fase acuosa;
 - 10 - someter dicha segunda fase acuosa a fermentación en presencia de al menos una levadura oleaginosa obteniendo una biomasa celular oleaginosa que comprende lípidos.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en donde dichos ácidos alquil- o aril-sulfónicos tienen de C₉ a C₁₅ átomos de carbono.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en donde dicha temperatura varía de 100 °C a 150 °C.
- 15 4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho polisacárido se selecciona de celulosa, hemicelulosa o sus mezclas.
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha biomasa es una biomasa lignocelulósica.
6. El procedimiento según la reivindicación 5, en donde dicha biomasa lignocelulósica se selecciona de:
 - 20 - productos de cultivos cultivados expresamente para uso energético incluyendo subproductos, residuos y desechos de dichos cultivos o de su procesamiento;
 - productos de cultivos agrícolas, forestación y silvicultura, que comprenden madera, plantas, residuos y subproductos de procesamiento agrícola, forestación y silvicultura;
 - subproductos de agri-alimentos destinados a alimentación humana o zootécnica;
 - 25 - residuos, no tratados químicamente, de la industria del papel;
 - productos de desecho que provienen de la recogida diferenciada de desechos sólidos urbanos.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha biomasa se somete a un procedimiento de molienda preliminar antes de ser sometida a hidrólisis ácida.
- 30 8. El procedimiento según la reivindicación 7, en donde dicha biomasa se muele hasta que se obtienen partículas que tienen un diámetro que varía de 0,1 mm a 10 mm.
9. El procedimiento según la reivindicación 8, en donde dicha biomasa se muele hasta que se obtienen partículas que tienen un diámetro menor que 1 mm.
10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha biomasa está presente en la mezcla de reacción en una cantidad que varía de 5 % en peso a 40 % en peso con respecto al peso total de la mezcla de reacción.
- 35 11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho al menos un ácido orgánico es soluble en agua y extraíble por medio de un disolvente orgánico insoluble en agua.
12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dichos ácidos alquil- o aril-sulfónicos se seleccionan de: ácido dodecil-sulfónico, ácido para-tolueno-sulfónico, ácido 1-naftaleno-sulfónico, ácido 2-naftaleno-sulfónico, ácido 1,5-naftaleno-disulfónico o sus mezclas.
- 40 13. El procedimiento según la reivindicación 12, en donde dicho al menos un ácido orgánico se selecciona de ácido para-tolueno-sulfónico, ácido 2-naftaleno-sulfónico, ácido 1,5-naftaleno-disulfónico, o sus mezclas.
14. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho al menos un ácido orgánico está presente en la disolución acuosa en una concentración que varía de 0,1 % en peso a 5 % en peso con respecto al peso total de la disolución acuosa.
- 45 15. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha hidrólisis ácida se lleva a cabo durante un tiempo que varía de 20 minutos a 6 horas.

16. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha primera fase sólida comprende lignina y celulosa.
17. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha primera fase acuosa comprende al menos un azúcar que tiene de C₅ a C₆ átomos de carbono y dicho al menos un ácido orgánico.
- 5 18. El procedimiento según la reivindicación 17, en donde dicho al menos un azúcar es xilosa.
19. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha primera mezcla se somete a extracción con un disolvente orgánico insoluble en agua.
20. El procedimiento según la reivindicación 19, en donde dicho disolvente orgánico insoluble en agua se selecciona de: hidrocarburos halogenados; hidrocarburos aromáticos; alcoholes alifáticos que tienen de C₄ a C₆ átomos de carbono; o mezclas de los mismos.
- 10 21. El procedimiento según la reivindicación 20, en donde dicho disolvente orgánico insoluble en agua se selecciona de mezclas de tolueno y n-butanol.
22. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en donde dicho disolvente orgánico insoluble en agua se evapora obteniendo una fase sólida adicional que comprende dicho al menos un ácido orgánico.
- 15 23. El procedimiento según la reivindicación 22, en donde dicho procedimiento comprende reutilizar dicho al menos un ácido orgánico en dicha hidrólisis ácida.
24. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha segunda fase sólida comprende lignina.
- 20 25. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha segunda fase acuosa comprende al menos un azúcar que tiene de C₅ a C₆ átomos de carbono.
26. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha segunda fase acuosa comprende xilosa, glucosa y celobiosa.
27. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha fermentación se lleva a cabo a una temperatura que varía de 20 °C a 40 °C.
- 25 28. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha fermentación se lleva a cabo durante un tiempo que varía de 3 días a 10 días.
29. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha fermentación se lleva a cabo a un pH que varía de 4,5 a 6,5.
- 30 30. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha levadura oleaginosa se selecciona de: *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula gracilis*, *Rhodotorula graminis*, *Lypomices starkeyi*, *Lypomices lipofer*, *Trigonopsis variabilis*, *Candida kefyf*, *Candida curvata*, *Candida lipolytica*, *Pichia stipitis*, *Torulopsis sp.*.
31. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha fermentación es una fermentación de lote alimentado.
- 35 32. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha biomasa celular oleaginosa se somete a tratamiento mecánico.
33. El procedimiento según la reivindicación 32, en donde dicho tratamiento mecánico se lleva a cabo usando una "prensa de células French", que opera a una presión que varía de 137,9 MPa (20 Kpsi) a 344,7 MPa (50 Kpsi).
- 40 34. El procedimiento según la reivindicación 32 o 33, en donde dicha biomasa celular oleaginosa se somete a centrifugación después del tratamiento mecánico.
35. El procedimiento según la reivindicación 34, en donde dicha centrifugación se lleva a cabo durante un periodo de tiempo que varía de 5 minutos a 30 minutos.
36. El procedimiento según la reivindicación 34 o 35, en donde dicha centrifugación se lleva a cabo a una velocidad rotacional que varía de 3.000 rpm a 9.000 rpm.
- 45 37. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 34 a 36, en donde al final de la centrifugación se obtienen las siguientes tres fases:
- (i) una fase oleosa que comprende lípidos;

- (ii) una fase acuosa que comprende trazas de lípidos no separados y azúcares no fermentados;
- (iii) una fase sólida húmeda que comprende residuos celulares y trazas de lípidos no separados.

38. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha fase sólida húmeda (iii) se transporta hacia la hidrólisis ácida.

- 5 39. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha fase acuosa (ii) y/o dicha fase sólida húmeda (iii) se someten a extracción con al menos un disolvente que se selecciona de hidrocarburos alifáticos que tienen de C₃ a C₁₀ átomos de carbono; o con una mezcla que comprende al menos un alcohol alifático que tiene de C₃ a C₅ átomos de carbono y al menos un hidrocarburo alifático que tiene de C₃ a C₁₀ átomos de carbono.

10

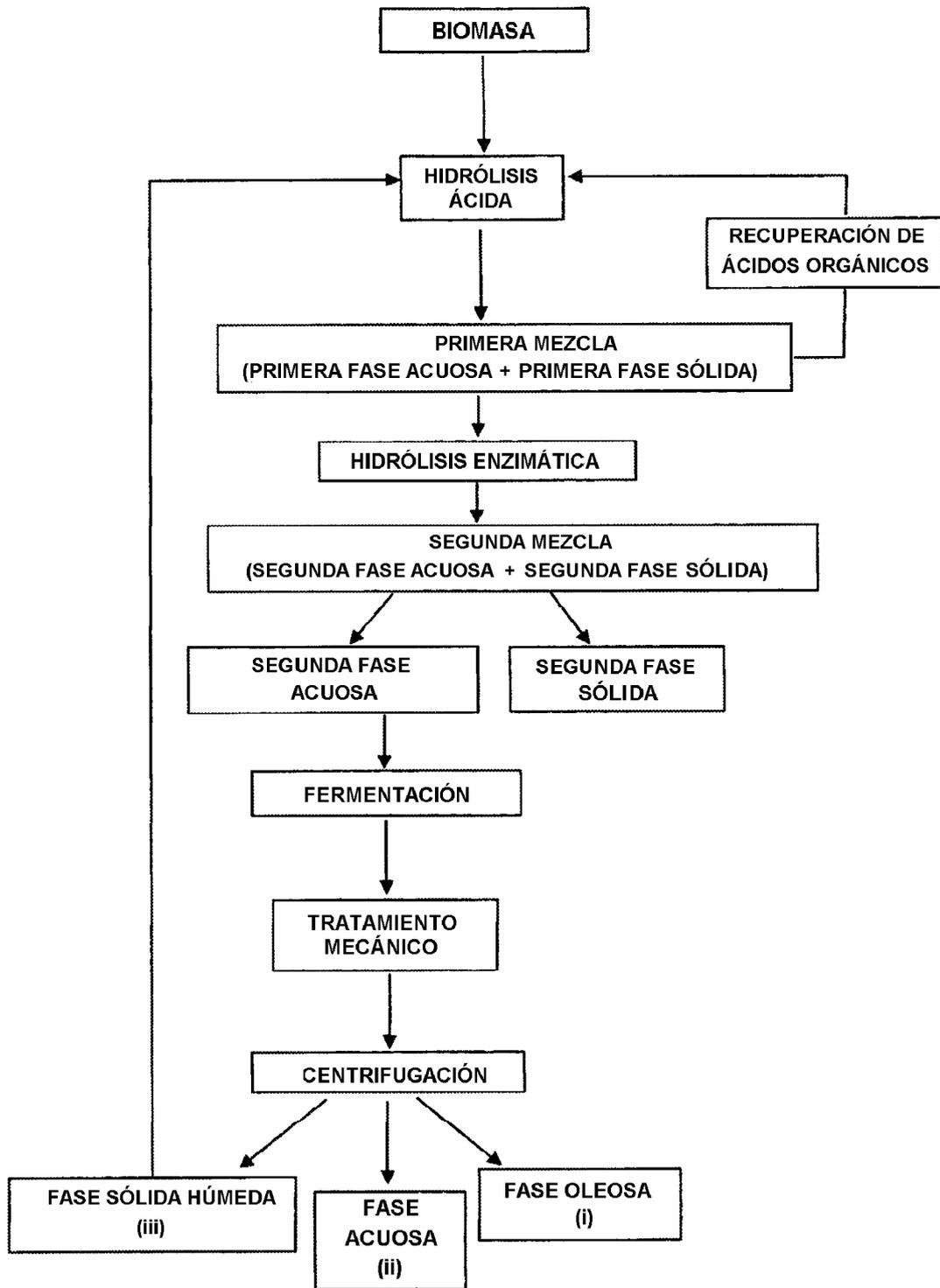


FIG. 1