

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 668**

51 Int. Cl.:

C11B 1/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2014 PCT/IB2014/066130**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15075630**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2014 E 14828280 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 3071680**

54 Título: **Procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas**

30 Prioridad:

19.11.2013 IT MI20131915

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

03.07.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MASSETTI, FELICIA;
CAPUANO, FEDERICO;
MEDICI, ROBERTO y
MIGLIO, ROBERTA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 674 668 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 extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas

La presente invención hace referencia a un procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas. La invención se define mediante las reivindicaciones.

5 Más en concreto, la presente invención hace referencia a un procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas que comprende producir una suspensión acuosa de biomasa de algas; llevar el pH de dicha biomasa de algas a un valor mayor o igual que 10; concentrar dicha suspensión acuosa de biomasa de algas mediante la adición de al menos un floculante aniónico; recuperar la biomasa de algas concentrada obtenida; someter dicha biomasa de algas concentrada a la extracción de lípidos; obtener: (i) una fase orgánica que
10 comprende lípidos; (ii) una fase semisólida que comprende un residuo de dicha biomasa de algas; someter dicha fase semisólida (ii) a la hidrólisis para obtener los azúcares.

Los lípidos así obtenidos se pueden utilizar ventajosamente para la producción de biodiésel o biocombustible que se puede utilizar tal cual o en una mezcla con otros combustibles para automóviles.

15 Los azúcares así obtenidos se pueden utilizar ventajosamente como fuente de carbono en los procedimientos de fermentación para la producción de lípidos y también para la producción de alcoholes (p. ej., etanol, butanol). Dichos alcoholes se pueden utilizar ventajosamente como biocarburantes para automóviles, o como componentes que se pueden añadir a los combustibles para automóviles.

20 Las algas, en concreto las microalgas, se cultivan en la actualidad para la producción de compuestos valiosos, tales como, por ejemplo, ácidos grasos poliinsaturados [por ejemplo, ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexanoico (DHA) y productos similares], vitaminas (por ejemplo, β -caroteno y productos similares) y gelificantes, que quedan incluidos en los campos nutricional, farmacéutico y cosmético.

25 El cultivo de microalgas para los sectores anteriores se caracteriza por una capacidad de producción más bien escasa (en el orden de cientos a miles de toneladas al año) y por el gran valor añadido de los compuestos obtenidos (cientos a miles de dólares por kilogramo). Esta es la razón por la que se pueden tolerar los sistemas de producción complejos y caros, sobre todo los sistemas de extracción y purificación que deben cumplir las normas estrictas de tipo sanitario y nutricional, típicas de los campos mencionados más arriba.

30 El cambio desde los campos mencionados más arriba del uso tradicional de las microalgas hacia el campo medioambiental/energético necesita el desarrollo de tecnologías que conduzcan a un incremento considerable de la capacidad de producción (desde cientos a miles de toneladas al año hasta millones de toneladas al año) y a una enorme reducción de los costes de producción debido al escaso valor añadido de los compuestos destinados al campo medioambiental/energético (cientos a miles de dólares por tonelada).

Los procedimientos que están relacionados con la extracción de compuestos a partir de la biomasa de algas están descritos en la técnica.

35 En la solicitud de patente internacional WO 2010/000416, a nombre del solicitante, por ejemplo, se describe un procedimiento para la extracción de ácidos grasos a partir de la biomasa de algas, que comprende: producir una suspensión acuosa de biomasa de algas; someter la suspensión acuosa de biomasa de algas a hidrólisis ácida y extracción mediante la adición de al menos un solvente orgánico apolar y de al menos un ácido inorgánico a dicha suspensión acuosa de biomasa de algas, para así obtener las siguientes tres fases: (i) una fase semisólida que comprende un residuo fangoso de biomasa de algas; (ii) una fase acuosa que comprende compuestos inorgánicos y compuestos orgánicos hidrófilos; (iii) una fase orgánica que comprende ácidos grasos y compuestos orgánicos hidrófobos diferentes a dichos ácidos grasos. Dichas fases (i) a (iii) se someten a más tratamientos para obtener: aceites pirolíticos, biodiésel o biocombustible, biogás.

45 En la solicitud de patente internacional WO 2010/089063, a nombre del solicitante, se describe un procedimiento para la extracción de lípidos a partir de la biomasa de algas, que comprende: producir una suspensión acuosa de biomasa de algas; añadir a dicha suspensión acuosa de biomasa de algas al menos un solvente orgánico inmiscible o sustancialmente inmiscible en agua con lo que se obtiene una mezcla acuosa orgánica; someter dicha mezcla acuosa orgánica a la evaporación del agua y a la extracción de lípidos; hacerla operar a una tal temperatura que se obtiene la retirada sustancialmente completa del agua de dicha mezcla acuosa orgánica, con lo que se obtiene: (i) una fase orgánica que comprende los lípidos y dicho solvente orgánico; (ii) una fase semisólida que comprende un residuo de dicha biomasa de algas. Dichas fases (i) y (ii) se someten a más tratamientos para obtener: aceites pirolíticos, biodiésel o biocombustible, biogás.

55 En la solicitud de patente de los EE. UU. US 2011/0086386 se describe un método de fraccionamiento de biomasa (por ejemplo, biomasa de algas) que comprende las etapas siguientes: acondicionar la permeabilidad de una biomasa suspendida en una solución acuosa de al menos un solvente, llevarla a un determinado pH (por ejemplo, un pH que oscile de 1 a 6,5 o un pH que oscile de 7,5 a 14), para formar una biomasa acondicionada; poner la biomasa

5 acondicionada en estrecho contacto con al menos un solvente apolar; separarlas para obtener una solución de solvente apolar y una solución polar de biomasa; recuperar los productos celulares de la solución del solvente apolar y de la solución polar de la biomasa; someter la solución polar de la biomasa al fraccionamiento para obtener componentes polares y componentes hidrosolubles. Dicho método permite la recuperación no sólo de los productos de interés (que pueden, a su vez, utilizarse en el campo nutricional o farmacéutico, o en el campo de los biocarburantes), sino también de los subproductos, así como el reciclaje de nutrientes y agua.

10 En la patente de los EE. UU. US 7.869.195 se describe un método para la extracción de lípidos y para deshidratar una biomasa húmeda, que comprende: centrifugar una biomasa de algas húmeda para incrementar el contenido sólido desde aproximadamente el 10% a aproximadamente el 40%, con lo que se obtiene una biomasa de algas centrifugada; mezclar la biomasa de algas centrifugada con un solvente anfipático, con lo que se obtiene una mezcla; calentar la mezcla, con lo que se obtiene una biomasa de algas deshidratada y sin grasas; separar el solvente anfipático a partir de la biomasa de algas deshidratada y sin grasas, con lo que se obtiene el solvente anfipático, agua y lípidos; evaporar el solvente anfipático desde el agua y los lípidos; y separar el agua de los lípidos. Dichos lípidos se pueden utilizar para producir biocarburantes y energía renovable.

15 En la patente de los EE. UU. US 8.115.022 se describe un método para aislar clorofilas y aceite rico en ω -3 desde las algas, que comprende: (a) deshidratar células de algas sustancialmente intactas que están suspendidas en un medio líquido, con lo que se obtiene una biomasa de algas; (b) extraer (por ejemplo, por la adición de etanol) una fracción sustancialmente líquida que comprende lípidos neutros, carotenoides y clorofilas a partir de la biomasa de algas, en donde dichos lípidos neutros comprenden ácidos grasos ω -3; y (c) separar los carotenoides y las clorofilas de los lípidos neutros (por ejemplo, por medio de un material adsorbente o de una membrana de diafiltración). Dichos lípidos se pueden utilizar para producir biocarburantes.

Luciela Borges et al., en *Biomass and bioenergy* (2011), vol. 35, n.º 10, págs. 4449-4454 dan a conocer un procedimiento para la producción de lípidos que se pueden utilizar para producir biocarburantes.

25 También se sabe que la recogida de biomasa de algas es relativamente complicada y cara (puede, de hecho, suponer del 20% al 30% del coste total del procedimiento de producción de biomasa de algas).

En consecuencia, se han llevado a cabo estudios para mejorar el procedimiento de recogida de biomasa de algas.

30 Molina Grima E. et al., en *Biotechnology Advances* (2003), volumen 20, págs 491-515, por ejemplo, describen diferentes procedimientos para recoger biomasa de algas, tales como, por ejemplo, floculación, centrifugación, filtración. Con respecto a la floculación, se describe el uso de floculantes, como tales, por ejemplo: sales metálicas (p. ej., cloruro de hierro, sulfato de aluminio, sulfato de hierro); sales de metales polimerizados (p. ej., sulfato poliférrico); polímeros catiónicos (polielectrólitos); biofloculantes (p. ej., quitosano). O bien, dicha floculación se puede realizar al llevar el pH del caldo de cultivo de la biomasa de algas a un valor que oscila de 11,8 a 12.

35 Knuckey R. M. et al., en *Aquacultural Engineering* (2006), vol. 35, número 3, págs. 300-313, describen una técnica de floculación para microalgas marinas que comprende llevar el pH del caldo de cultivo de dichas microalgas a un valor que oscila de 10 a 10,6 mediante el uso de hidróxido de sodio (NaOH), añadir un polímero no iónico (Magnafloc LT-25) a una concentración final igual a 0,5 mg/l. El producto floculado que se obtiene se recupera y se neutraliza con un ácido para obtener un factor de concentración de dichas microalgas que oscile de 200 a 800 veces.

40 Brennan L. et al., en *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (2010), vol. 14, número 2, págs. 557-577, describen la producción de biocarburantes a partir de microalgas. Entre los diferentes procedimientos para la recuperación de las microalgas a partir del caldo de cultivo, se describe la floculación en presencia de sales metálicas (p. ej., cloruro de hierro, sulfato de aluminio, sulfato de hierro); polímeros no iónicos (p. ej., Magnafloc LT-25); biofloculantes (p. ej., quitosano). O bien, dicha floculación se puede llevar a cabo por medio de ultrasonidos.

45 En la solicitud de patente de los EE. UU. US 2009/0162919 se describe un método para la concentración de microalgas unicelulares, que comprende: a) poner en contacto, en un entorno acuoso, las microalgas que tienen un diámetro medio de las células sueltas de menos de 20 μ m, con un floculante inorgánico (p. ej., cloruro de aluminio, sulfato de aluminio, cloruro de polialuminio, aluminato de sodio) presente a una concentración por debajo del 10% con respecto a la biomasa de microalgas seca, con lo que se obtiene una solución que comprende microalgas floculadas en flóculos que tienen un diámetro medio de al menos 100 μ m; y b) separar los flóculos de microalgas a partir del entorno acuoso, con lo que se obtiene una biomasa de microalgas que tiene una concentración de al menos el 1%. Los flóculos que tienen un diámetro medio en el orden de milímetros se pueden obtener mediante la adición de más floculante a dicha solución, seleccionado de polímeros orgánicos catiónicos o no iónicos, o de biopolímeros tales como, por ejemplo, quitosano, arcillas.

Sin embargo, los procedimientos descritos más arriba pueden tener algunos puntos críticos.

55 Las reacciones que permiten la floculación de la biomasa de algas son, de hecho, sensibles a diferentes parámetros, tales como, por ejemplo, pH, temperatura, propiedades de la superficie celular de las algas utilizadas, concentración de las sustancias químicas utilizadas para el crecimiento de las algas, salinidad del medio de cultivo utilizado (en

concreto, en el caso de las algas que crecen en agua salada), valor de DQO (demanda química de oxígeno), especies contaminantes (p. ej., bacterias) que pueden estar presentes en el entorno en el que crecen las algas (en concreto, si se cultivan en estanques abiertos), fuerza iónica de la fase acuosa, pero, sobre todo, el estado vegetativo (vitalidad) del alga. De hecho, el estado vegetativo del alga varía significativamente durante el día por diferentes razones, tales como, por ejemplo: como consecuencia de la variación de la luz solar, con la inducción de los fenómenos de fotoaclimatación y la fotoinhibición; con respecto al método de cultivo, por lote, por semilote o en continuo; con respecto a las diferentes fases de crecimiento de las algas, a saber, la fase de crecimiento exponencial, la fase de maduración, la fase de ayuno. Las numerosas variables que influyen en el proceso de floculación hacen en consecuencia que sea imposible predecir las condiciones operativas que tienen una eficacia confirmada y hacen indispensable la realización de diferentes pruebas experimentales que, en cualquier caso, cuando se llevan a una escala industrial, podría resultar que no siempre serán eficaces.

Por lo tanto, el solicitante ha considerado que el problema de hallar un procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas, en el que el procedimiento de floculación es capaz de solventar los aspectos críticos de más arriba, es reproducible, y se puede aplicar a una escala industrial.

El solicitante ha hallado en la actualidad un procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas en el que la floculación de dicha biomasa de algas se puede llevar a cabo ventajosamente por medio de un cambio de pH de la suspensión acuosa que contiene la biomasa de algas, obtenida del cultivo de las algas, a un valor básico (a saber, a un valor mayor o igual que 10) y la posterior adición de al menos un floculante. Dicho procedimiento permite una buena recogida de biomasa de algas, por lo que se obtiene una biomasa de algas concentrada que se puede someter a la extracción de los lípidos, con lo que se obtienen las fases siguientes: (i) una fase orgánica que comprende los lípidos que se recuperan, y (ii) una fase semisólida que comprende un residuo de la biomasa de algas que se ha sometido a hidrólisis, con lo que se obtienen azúcares. Además, al hacerlo operar de acuerdo con el procedimiento de más arriba, se obtiene una separación nítida de la biomasa de algas por floculación, con lo que se obtiene una fase acuosa transparente similar al agua utilizada para el cultivo de las algas que se puede volver a utilizar para dicho cultivo sin que haya que someterla a más tratamientos. Además, dicho procedimiento es particularmente útil en el caso de un procedimiento de cultivo de algas en continuo, más específicamente de algas que crecen en agua salada. Dicho procedimiento también se puede reproducir con facilidad y se puede aplicar a una escala industrial.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención hace referencia a un procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas, que comprende:

- producir una suspensión acuosa de biomasa de algas;
- llevar el pH de dicha suspensión de biomasa de algas a un valor mayor o igual que 10, que preferiblemente oscila de 10,2 a 12, y obtener una suspensión acuosa de biomasa de algas a pH básico;
- añadir al menos un floculante aniónico a dicha suspensión acuosa de biomasa de algas a pH básico, y obtener una biomasa de algas concentrada;
- recuperar dicha biomasa de algas concentrada;
- someter dicha biomasa de algas concentrada a la extracción de los lípidos, con lo que se obtiene:
 - (i) una fase orgánica que comprende lípidos;
 - (ii) una fase semisólida que comprende un residuo de dicha biomasa de algas;
- someter dicha fase semisólida (ii) a hidrólisis, con lo que se obtienen azúcares.

Para el objetivo de la presente descripción y de las reivindicaciones que le siguen, las definiciones de los márgenes numéricos siempre comprenden los extremos, a menos que se especifique de otra manera.

Para el objetivo de la presente descripción y de las reivindicaciones que le siguen, el término «que comprende» incluye los términos «que esencialmente consiste en» o «que consiste en».

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho procedimiento se puede llevar a cabo por lotes, por semilotes o en continuo, preferiblemente en continuo.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha suspensión acuosa de biomasa de algas procede del cultivo de algas, preferiblemente del cultivo de microalgas.

Dichas microalgas pueden crecer solas o en un consorcio con otros microorganismos, tanto en agua dulce como en agua que tiene una salinidad elevada, por ejemplo, en agua salobre con una concentración de sales que también es mayor que 5 g/l. En los ecosistemas naturales, las microalgas a menudo coexisten con otros microorganismos (por ejemplo, otras algas y bacterias) con las que pueden desarrollar interacciones que incrementan la estabilidad y la

supervivencia del consorcio.

Para el objetivo de la presente descripción y de las reivindicaciones que le siguen, el término «microalgas» hace referencia, incluso aunque no se especifique, a microorganismos vegetales y a procariontas fotótrofos y heterótrofos, o a consorcios de microorganismos cultivados específicamente que contienen las mismas microalgas. Se debe observar que para el objetivo de la presente invención, si se utilizan los consorcios de más arriba, en dichos consorcios deben predominar las microalgas.

Para el objetivo de la presente invención, dicha suspensión acuosa de biomasa de algas se obtiene preferiblemente a partir del cultivo de algas en estanques abiertos de tipo «estanque de rodadura con rueda de paletas» [en la figura 2 se muestra el esquema de un estanque de rodadura con rueda de paletas» (Estanque P-1)] cuya profundidad es mayor que 0,15 m y que oscila preferiblemente de 0,2 m a 0,3 m, y la superficie activa expuesta a la radiación solar o por medio de lámparas especiales, en el orden de unos pocos metros cuadrados para cada estanque abierto hasta 1000 m² a 2000 m² para cada estanque abierto en el caso de los estanques abiertos del tipo industrial, o a partir del cultivo de algas en contenedores, en concreto, en fotobiorreactores que tienen la superficie activa expuesta a la radiación solar o por medio de lámparas especiales, en el orden de unos pocos metros cuadrados para cada fotobiorreactor hasta 100 m² a 400 m² para cada fotobiorreactor en el caso de los fotobiorreactores de tipo industrial.

Ejemplos específicos de microalgas que se pueden utilizar ventajosamente para el objetivo de la presente invención son: *Nannochloropsis*, *Tetraselmis*, *Scenedesmus*, *Phaeodactylum*, *Chlorella*, *Amphipleura*, *Amphora*, *Chaetoceros*, *Cyclotella*, *Cymbella*, *Fragilaria*, *Navicula*, *Nitzschia*, *Achnantes*, *Dulaniella*, *Oscillatoria*, *Oocystis*, *Porphyridium* o combinaciones de las mismas.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho cultivo de algas se puede llevar a cabo en presencia de agua dulce o de agua salada que tienen un origen natural o artificial, tales como, por ejemplo, procesamientos industriales, preferiblemente agua salada.

Preferiblemente, dicha agua salada puede ser agua del mar o de tipo salobre, natural o artificial, también con una concentración de sales elevada que oscila, por ejemplo, de 5 g/l a 90 g/l.

Un ejemplo de agua salobre que se puede utilizar ventajosamente para el objetivo de la presente invención es agua que viene de los campos de producción de aceite, en particular, de los campos de producción de aceite en el área de África del Norte que están situados en un contexto de alta radiación solar, en zonas desérticas que no se pueden utilizar para el cultivo de alimento y que tienen una coproducción alta de agua que suele tener un volumen varias veces mayor que la correspondiente producción de aceite.

Si fuera necesario, el crecimiento de la biomasa de algas se puede favorecer mediante la alimentación con nutrientes que contengan nitrógeno, fósforo, oligoelementos, cuando ya no están presentes en el agua. Se suelen alimentar con soluciones de las sales orgánicas e inorgánicas hidrosolubles, tales como, por ejemplo, sales de amonio y fosfatos de metales alcalinos o metales alcalinotérreos (por ejemplo, fosfatos de sodio, potasio, calcio, magnesio) o fosfatos de amonio. Es más, junto con el agua, además de los nutrientes de más arriba, también se alimenta con un chorro de dióxido de carbono (CO₂), como fuente de carbono, a través de distribuidores especiales depositados en el fondo de los estanques abiertos o insertados idóneamente en los tanques de crecimiento (p. ej., fotobiorreactores). El dióxido de carbono contenido en los gases de combustión industrial (refinerías, plantas termoeléctricas, plantas de generación de hidrógeno, etc.) también se puede utilizar como dióxido de carbono (CO₂).

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el pH de dicha suspensión acuosa se puede llevar a un valor mayor o igual que 10, por la adición de al menos un hidróxido de un metal alcalino, tal como, por ejemplo, hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH) o mezclas de los mismos; o de un metal alcalinotérreo, tal como, por ejemplo, hidróxido de calcio [Ca(OH)₂], hidróxido de magnesio [Mg(OH)₂] o mezclas de los mismos; o mezclas de los mismos. Dicho hidróxido de un metal alcalino o alcalinotérreo se puede utilizar tal cual o en solución acuosa, preferiblemente en solución acuosa.

Para el objetivo de la presente invención, dicho hidróxido de un metal alcalino o alcalinotérreo se añade en la cantidad necesaria para alcanzar el valor de pH deseado.

De acuerdo con una realización preferida adicional de la presente invención, el pH de dicha suspensión acuosa se puede llevar a un valor mayor o igual que 10, mediante el consumo completo del dióxido de carbono (CO₂) durante el crecimiento de la biomasa de algas.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho floculante aniónico se puede seleccionar de polímeros aniónicos de alta masa molecular, tales como, por ejemplo, poliacrilamidas, poliacrilatos, polimetacrilatos, policarboxilatos, preferiblemente poliacrilamidas.

Dichos polímeros aniónicos tienen preferiblemente una masa molecular que oscila de 1 MDa a 20 MDa, más que preferiblemente oscila de 2 MDa a 10 MDa.

Ejemplos de polímeros aniónicos que se pueden utilizar ventajosamente para el objetivo de la presente invención y que están disponibles en el mercado son los productos aniónicos Dryfloc® de SNF Acque Italia.

5 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho floculante aniónico puede estar presente en dicha suspensión acuosa de biomasa de algas a pH básico en una cantidad que oscila de 1 ppm a 20 ppm, que preferiblemente oscila de 2 ppm a 10 ppm.

Después de añadir dicho floculante aniónico, se recupera la biomasa de algas concentrada, obtenida por separación gravitatoria, que se suele llevar a cabo en los decantadores que se utilizan típicamente en las estaciones depuradoras de aguas (por ejemplo, decantadores laminares de placas).

10 La recuperación de dicha biomasa de algas concentrada se puede llevar a cabo de acuerdo con diferentes procedimientos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, filtración al vacío, centrifugación, prensas filtradoras o prensas de correa, preferiblemente prensas filtradoras o prensas de correa. Dichos procedimientos permiten que la biomasa de algas se concentre más hasta obtener una biomasa de algas concentrada, que tiene una concentración de biomasa de algas (peso seco) que oscila del 5% en peso al 30% en peso, más que preferiblemente oscila del 10% en peso al 25% en peso, con respecto al peso total de la biomasa de algas concentrada que se obtiene.

Para el objetivo de la presente descripción y de las siguientes reivindicaciones, el término «concentración de biomasa de algas (peso seco)» hace referencia a la cantidad de biomasa de algas seca presente en la biomasa de algas concentrada.

20 Se puede recuperar la mayor parte del agua liberada de la recuperación de la biomasa de algas concentrada y se puede reutilizarse en el procedimiento de más arriba, en la fase de producción de biomasa de algas (cultivo de algas) como aguas residuales industriales; o dicha agua se puede enviar a una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) para que se pueda someter a los tratamientos de purificación de acabado antes de ser vertidas en cumplimiento de las especificaciones legales.

Por otra parte, la biomasa de algas concentrada que se obtiene se somete a la extracción de lípidos.

25 De acuerdo con una realización de la presente invención, dicho procedimiento puede comprender el someter dicha biomasa de algas concentrada a la deshidratación, antes de extraer los lípidos, mediante la adición de al menos un solvente orgánico polar seleccionado de, por ejemplo, acetona, metanol, etanol, acetato de etilo, cetona metilética (MEK) o mezclas de los mismos, preferiblemente acetona, con lo que se obtiene una fase acuosa que comprende dicho solvente orgánico polar y agua, y una fase orgánica que comprende dicha biomasa de algas aún más concentrada.

Dicha deshidratación se lleva a cabo preferiblemente mediante el uso de una razón entre el volumen de agua en la suspensión acuosa de la biomasa de algas concentrada y el volumen del solvente orgánico polar, que oscila de 1:0,5 a 1:4, preferiblemente de 1:1 a 1:2,5, a temperatura ambiente (25 °C), durante un tiempo que oscila de 1 s a 10 min, que preferiblemente oscila de 2 s a 5 min.

35 Dicha deshidratación se puede llevar a cabo bien con equipamientos del tipo «decantador mezclador» (por ejemplo, Vortex) o con extractores de líquido y sólido a contracorriente. Al final de la deshidratación, la fase acuosa que comprende dicho solvente orgánico polar y agua, y la fase orgánica que comprende dicha biomasa de algas aún más concentrada se pueden separar por medio de diferentes técnicas, tales como, por ejemplo, filtración con filtros de tambor, prensas de correa, prensas filtradoras, centrifugadoras (por ejemplo, centrifugadoras del tipo decantador).

40 Dicha deshidratación ofrece una ventaja confirmada desde un punto de vista tecnológico, ya que la retirada de la mezcla de solvente orgánico/agua y la posterior recuperación del solvente orgánico (por ejemplo, por medio de evaporación) representa un ahorro de energía considerable con respecto a la retirada por evaporación del agua sola contenida en la biomasa de algas concentrada de partida (el calor latente de los solventes es, de hecho, igual a aproximadamente un cuarto del que tiene el agua). Además, la concentración adicional de la biomasa de algas permite una mejor extracción de los lípidos, gracias la presencia de una menor cantidad de agua. Dicha deshidratación, además, también permite retirar una parte del agua intracelular, lo que posibilita el uso de solventes apolares para la extracción de los lípidos, como es el caso habitual en la industria de los aceites vegetales. Una vez que se ha retirado el solvente, por ejemplo por evaporación, se puede retirar la mayor parte de la fase acuosa residual y se puede reutilizar en el procedimiento de más arriba, en la fase de producción de biomasa de algas

50 (cultivo de algas) como aguas residuales industriales; o dicha agua se puede enviar a una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) para que se pueda someter a los tratamientos de purificación de acabado antes de ser vertidas en cumplimiento de las especificaciones legales.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, dicho procedimiento puede comprender el someter dicha biomasa de algas concentrada a lisis celular, antes de la extracción de los lípidos o después de la deshidratación.

55 Dicha lisis celular se lleva a cabo preferiblemente en un homogeneizador, a una presión que oscila de 250 bar a 2000 bar, que preferiblemente oscila de 800 bar a 1600 bar, a temperatura ambiente (25 °C). Se debe señalar que,

si se utiliza un homogeneizador, dicha lisis celular tiene lugar en el orden de unos pocos milisegundos (a saber, el tiempo que tarda en atravesar el agujero de dicho homogeneizador).

5 De acuerdo con una realización más de la presente invención, dicho procedimiento puede comprender el someter dicha biomasa de algas concentrada, antes o después de la deshidratación, a la lisis celular y la extracción de los lípidos al mismo tiempo (lisis y extracción simultánea: LES), preferiblemente en un homogeneizador, en presencia de al menos un solvente orgánico polar, tal como, por ejemplo, acetona, metanol, etanol, acetato de etilo, cetona metilética (MEK) o mezclas de los mismos, preferiblemente acetona, con lo que se obtiene una mezcla que comprende dicha biomasa de algas concentrada, dicho solvente orgánico polar y agua.

10 De acuerdo con una realización más de la presente invención, dicho procedimiento puede comprender el someter dicha biomasa de algas concentrada, antes o después de la deshidratación, a la lisis celular y la extracción de lípidos al mismo tiempo (lisis y extracción simultánea: LES), preferiblemente en un homogeneizador, en presencia de al menos un solvente orgánico apolar seleccionado de, por ejemplo, hexano, *n*-octano, iso-octano, nonano, decano, isómeros de xileno, tolueno, benceno, clorobenceno, diclorometano, o mezclas de los mismos, cortes de refinería que comprenden mezclas que incluyen hidrocarburos alifáticos y aromáticos, mezclas de dichos hidrocarburos alifáticos y aromáticos, en concreto las mezclas conocidas como «lubricantes ligeros» (LCO), gasóleos, gasolinas alquiladas o mezclas de los mismos, y se obtiene una mezcla que comprende dicha biomasa de algas concentrada, dicho solvente orgánico apolar y agua.

15 La mezcla de más arriba, que comprende dicha biomasa de algas concentrada, dicho solvente orgánico polar o apolar y agua, se envía directamente a la separación que se puede llevar a cabo por medio de diferentes técnicas, tales como, por ejemplo, filtración con filtros de tambor, prensas de correa, prensas filtradoras, centrifugadoras (por ejemplo, centrifugadoras del tipo decantador), con lo que se obtienen las fases anteriores (i) y (ii).

20 Dicha lisis celular y extracción de lípidos al mismo tiempo (lisis y extracción simultánea: LES) se puede llevar a cabo preferiblemente con una razón entre el volumen de la suspensión acuosa de la biomasa de algas concentrada y el volumen del solvente orgánico polar o apolar que oscila de 1:1 a 1:2, preferiblemente 1:2, a una presión que oscila de 250 bar a 2000 bar, que preferiblemente oscila de 800 bar a 1600 bar, a temperatura ambiente (25 °C). Se debe señalar que, si se utiliza el homogeneizador, dicha lisis celular y la extracción de lípidos al mismo tiempo (lisis y extracción simultánea: LES) tiene lugar en el orden de unos pocos milisegundos (a saber, el tiempo que tarda en atravesar el agujero de dicho homogeneizador).

25 Dicha extracción de lípidos, cuando se realiza después de la lisis celular o de la deshidratación, se puede llevar a cabo mediante la adición de al menos un solvente orgánico apolar seleccionado de, por ejemplo, hexano, *n*-octano, iso-octano, nonano, decano, isómeros de xileno, tolueno, benceno, clorobenceno, diclorometano, o mezclas de los mismos, cortes de refinería que comprenden mezclas que incluyen hidrocarburos alifáticos y aromáticos, mezclas de dichos hidrocarburos alifáticos y aromáticos, en particular, mezclas conocidas como «lubricantes ligeros», gasóleos, gasolinas alquiladas o mezclas de los mismos.

30 Como alternativa, dicha extracción de lípidos, cuando se lleva a cabo después de la lisis celular o de la deshidratación, se puede realizar mediante la adición de al menos un solvente orgánico polar seleccionado de, por ejemplo, acetona, metanol, etanol, acetato de etilo, cetona metilética (MEK) o mezclas de los mismos, preferiblemente acetona.

35 Dicha extracción de lípidos, cuando se lleva a cabo después de la lisis celular o de la deshidratación, puede realizarse preferiblemente con una razón entre el volumen de la suspensión acuosa de la biomasa de algas concentrada y el volumen del solvente orgánico apolar o polar que oscila de 1:1 a 1:2, preferiblemente 1:1, a una temperatura que oscila de 20 °C a 100 °C, que preferiblemente oscila de 50 °C a 80 °C, durante un tiempo que oscila de 30 min a 4 h, que preferiblemente oscila de 1 h a 3 h.

40 Al final de la fase de extracción de lípidos, se obtienen las fases (i) y (ii) de más arriba, que se pueden separar por gravedad sin que se necesiten tratamientos de separación particulares, o se pueden separar por medio de procedimientos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, filtración, centrifugación. Dichas fases (i) y (ii) se recuperan posteriormente y se someten a tratamientos conocidos en la técnica para obtener los compuestos de interés.

45 La fracción lipídica presente en la biomasa de algas procedente del cultivo de microalgas suele comprender diferentes clases de moléculas lipídicas, tales como, por ejemplo: glicéridos, por ejemplo, mono-, di-, triacilglicéridos (compuestos por ácidos grasos y glicerol); ceras (compuestas por ácidos grasos más alcoholes y ácidos grasos más esteroides); hidrocarburos; ácidos grasos libres; esteroides; fosfolípidos, tales como, por ejemplo, diacilfosfoglicéridos, alquilacilfosfolípidos, alquenilacilfosfoglicéridos (compuestos por ácidos grasos más un grupo fosfórico), esfingofosfolípidos (compuestos por ácidos grasos más un grupo fosfórico y una base nitrogenada); glucolípidos (compuestos por ácidos grasos más glúcidos y una base nitrogenada); aminolípidos (compuestos por ácidos grasos y una base nitrogenada). Además de dichas moléculas lipídicas, se suelen presentar en dicha biomasa de algas otros compuestos orgánicos hidrófobos, tales como, por ejemplo, fitol y otros alcoholes hidrófobos de cadena larga, clorofilas, carotenoides, terpenos, tocoferoles.

La fase orgánica (i) comprende preferiblemente, además de los lípidos, compuestos orgánicos hidrófobos diferentes de los lípidos, tales como, por ejemplo, fitol y otros alcoholes.

La fase orgánica (i) que comprende lípidos y el solvente orgánico se somete preferiblemente a la evaporación para recuperar el solvente orgánico que se puede reutilizar en el procedimiento de más arriba y los lípidos extraídos. Después de la evaporación del solvente orgánico, los lípidos extraídos se pueden someter a la esterificación en presencia de un alcohol que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, preferiblemente metanol, etanol y un catalizador, preferiblemente un catalizador ácido, para producir glicerol y ésteres de alquilo, en concreto ésteres de metilo o ésteres de etilo (biodiésel).

Como alternativa, después de la evaporación del solvente orgánico, los lípidos extraídos se pueden someter a la hidrogenación o desoxigenación en presencia de hidrógeno y de un catalizador con el objetivo de producir biocombustible. Los procedimientos de hidrogenación o desoxigenación se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente europea EP 1.728.844.

Como alternativa, dicha fase orgánica (i) que comprende lípidos y el solvente orgánico se puede someter directamente a la esterificación o a la hidrogenación o desoxigenación. En este caso, se evita, así pues, la etapa de evaporación del solvente orgánico.

El biodiésel o biocombustible que se producen tal y como está descrito más arriba se pueden utilizar tal cual o en una mezcla con otros combustibles para automóviles.

La fase semisólida (ii) que comprende un residuo de la biomasa de algas, a saber, biomasa de algas residual empapada en el solvente orgánico (desecho), contiene preferiblemente casi todos los glúcidos y proteínas presentes desde el inicio en la biomasa de algas.

Dicha fase semisólida (ii) se puede someter a la hidrólisis de los polisacáridos para producir azúcares simples fermentables.

Dicha hidrólisis se puede llevar a cabo en presencia de al menos un ácido diluido, tal como, por ejemplo, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, presente en una cantidad que oscila del 1% en peso al 5% en peso con respecto al peso total de dicha fase semisólida (ii) que se hace operar, por ejemplo, a una temperatura que oscila de 110 °C a 160 °C, durante un tiempo que oscila de 1 h a 6 h: al operar en dichas condiciones y a concentraciones elevadas de la biomasa de algas en dicha fase semisólida (ii), por ejemplo, a una concentración de biomasa de algas que oscila del 20% en peso al 30% en peso con respecto al peso total de dicha fase semisólida (ii), la concentración de los azúcares en el producto hidrolizado obtenido se puede mantener relativamente alta (p. ej., concentración >50 g/l), una característica fundamental para optimizar el rendimiento de las fermentaciones en presencia de microorganismos, a las cuales se enviarán posteriormente. Por otra parte, cuando se hace operar en el punto de ebullición del agua, se puede obtener una hidrólisis completa al cabo de unas pocas horas de tratamiento: al operar en dichas condiciones, se reduce al mínimo (<50 ppm) la concentración de inhibidores (furfurales) que proceden de la degradación térmica de los azúcares, lo que permite la acumulación de los azúcares fermentables que contienen una cantidad de inhibidores del crecimiento de los microorganismos utilizados posteriormente en la fermentación que no interfiere con su crecimiento.

Como alternativa, se puede obtener una hidrólisis de los polisacáridos presentes en dicha fase semisólida (ii) mediante el tratamiento de la misma con vapor de agua a una temperatura y presión altas, optativamente acompañadas de una etapa para la liberación súbita de la presión (conocido en la técnica como el método de «explosión de vapor»). Dicho tratamiento se puede llevar a cabo sin ácidos exógenos, porque ya están presentes, en el medio de reacción, tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido sulfúrico, que proceden de los componentes celulares y de los azúcares acetilados o sulfonados presentes en la biomasa de algas contenida en dicha fase semisólida (ii). Optativamente, para mejorar aún más el rendimiento de las hidrólisis, es posible en cualquier caso añadir al menos un ácido, tal como, por ejemplo, ácido sulfúrico, a una concentración baja, preferiblemente a una concentración <1% en peso con respecto al peso total de dicha fase semisólida (ii), para mejorar adicionalmente el rendimiento de las hidrólisis.

Tras la reacción de hidrólisis, la solución de los azúcares simples obtenida se separa del residuo (por ejemplo, por medio de filtración, centrifugación, evaporación) para obtener una solución que contiene la concentración más alta posible de azúcares (por ejemplo, >150 g/l). Para incrementar la concentración de azúcares, dicha solución de azúcares simples se puede tratar por medio de membranas selectivas que, además de concentrar dichos azúcares simples, se pueden utilizar también para reducir el contenido de sales o ácidos disueltos en la misma: la solución concentrada de azúcares así obtenida se puede utilizar a continuación para las fermentaciones, mientras que el residuo sólido obtenido tras la hidrólisis, rico en material proteico, se puede tratar por separado.

La solución de azúcares simples (monoméricos y/u oligoméricos) se puede utilizar para la fermentación de los microorganismos, tales como, por ejemplo, levaduras, bacterias. Dicha solución de azúcares comprende principalmente glucosa, manosa y xilosa, otros azúcares, tales como, por ejemplo, manitol, ácido glucurónico, y es particularmente rica en azúcares que tienen seis átomos de carbono (C6) que se fermentan con facilidad o se

pueden utilizar como fuente de energía para los microorganismos. En concreto, si se ha de incrementar la producción de los lípidos, se utilizan levaduras oleaginosas, que son capaces de crecer en la solución de azúcares procedentes de la hidrólisis de dicha fase semisólida (ii). En una situación de estrés metabólico (por ejemplo, cuando falta nitrógeno), dichos azúcares se pueden utilizar como fuente de energía para acumular lípidos (principalmente triglicéridos) como fuente de energía complementaria: la concentración de lípidos puede superar el 50% en peso de la biomasa oleaginosa. Después de romper la pared celular de las levaduras por medio de los procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, centrifugación y tratamiento térmico optativo), dichos lípidos se pueden recuperar cuantitativamente por medio de tratamientos de extracción con solvente (que se suele reciclar), o por medio de tratamientos que simultáneamente lisan las células de la biomasa oleaginosa y extraen los lípidos. Dichos lípidos se pueden agrupar con los obtenidos mediante la extracción directa de la biomasa de algas, lo que incrementa significativamente el rendimiento global de todo el procedimiento.

La combinación de lípidos obtenida de la biomasa de algas y de la biomasa oleaginosa (aceite) se puede someter a la esterificación en presencia de un alcohol que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, preferiblemente metanol, etanol, y de un catalizador, preferiblemente un catalizador ácido, para producir glicerol y ésteres de alquilo, en concreto ésteres de metilo o ésteres de etilo (biodiésel). Como alternativa, dichos lípidos se pueden someter a la hidrogenación o desoxigenación en presencia de hidrógeno y de un catalizador para producir biocombustible. Los procedimientos de hidrogenación o desoxigenación se conocen en la técnica y están descritos, por ejemplo, en la solicitud de patente europea EP 1.728.844. El biodiésel o biocombustible que se produce tal y como está descrito más arriba se puede utilizar tal cual o en mezcla con otros combustibles para automóviles.

Como alternativa, la solución de azúcares obtenida de la hidrólisis de dicha fase semisólida (ii) se puede utilizar para la fermentación de levaduras o de bacterias productoras de alcohol (por ejemplo, etanol, butanol), de manera análoga al caso de la producción de alcoholes a partir de los azúcares procedentes de la biomasa lignocelulósica.

La solución de azúcares obtenida por la hidrólisis de dicha fase semisólida (ii) se puede utilizar también para la fermentación de microorganismos, seleccionados idóneamente o modificados genéticamente, para la producción de intermedios, tales como, por ejemplo, intermedios para la síntesis de compuestos químicos, monómeros para la síntesis de polímeros (por ejemplo, hidroxialcanoatos), gomas o materiales plásticos (por ejemplo, dioles).

El residuo sólido obtenido de la hidrólisis de dicha fase semisólida (ii), caracterizada por una concentración alta de proteínas (>50%), se puede utilizar de diferentes maneras, entre ellas, por ejemplo, como aditivo proteico para la nutrición animal (piensos para animales) o como fuente de nitrógeno y fuente de otros nutrientes esenciales, tales como, por ejemplo, fósforo, y/o sales y/o metales para el crecimiento y/o la fermentación de microorganismos productores de biocombustibles.

Como alternativa, dicho residuo se puede utilizar para producir metano tal y como se describe, por ejemplo, en Briand X et al., en *Journal of Applied Phycology* (1997), vol 9 (6), págs. 511-524, o de hidrógeno tal y como describen, por ejemplo, Yang et al. en *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (2011), vol 86, número 3, págs. 454-460, por medio de la digestión anaerobia.

Como alternativa, dicho resto sólido se puede someter a pirólisis para obtener aceite pirolítico y gas de síntesis («sintegás»). Como alternativa, antes de someterse a la pirólisis, dicho residuo se puede someter a la retirada del solvente orgánico, que se puede llevar a cabo tal y como se describe a continuación. En particular, dicho resto, después de someterse a la retirada del solvente, se puede someter a la pirólisis a temperatura elevada, por ejemplo, a una temperatura que oscila de 500 °C a 600 °C, para obtener predominantemente una fase oleosa y una fase gaseosa («sintegás») y un residuo sólido (cenizas) para desechar.

Como alternativa, dicho resto sólido se puede hacer que lo digieran anaeróticamente los microorganismos en ausencia de oxígeno para obtener biogás.

Se debe señalar que, en el caso de la producción de biogás, dicho resto se debe someter a la retirada del solvente orgánico, que se puede llevar a cabo por medio de técnicas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, el lavado con el solvente recién preparado y el posterior secado en un horno regulado con termostato o en secadores industriales, filtración o evaporación. Después de la retirada del solvente orgánico, el residuo de la biomasa de algas que se obtiene se puede resuspender en agua para obtener una suspensión acuosa de biomasa de algas para someterla a la digestión anaerobia. El solvente orgánico recuperado se puede reutilizar en dicho procedimiento.

La presente invención se ilustrará a continuación con más detalle por medio de la figura 1 dada a conocer más adelante, que indica diferentes realizaciones de la presente invención.

La suspensión acuosa de biomasa de algas (Microalgas), obtenida del cultivo de las algas, preferiblemente microalgas, que se puede llevar a cabo de manera cómoda en estanques abiertos (por ejemplo, del tipo «estanque de rodadura con ruedas de paletas»), en agua salada, se envía a la fase de recogida (Separación/desecación) llevada a cabo mediante la adición de al menos un hidróxido de un metal alcalino o metal alcalinotérreo para obtener una biomasa de algas a pH básico (no está representado en la figura 1), la adición de al menos un floculante aniónico (Floculantes), la recuperación de la biomasa de algas concentrada (por ejemplo, por medio de una prensa

filtradora) (Biomasa de algas húmeda).

El agua separada (Agua) se recupera y se reutiliza en el procedimiento de más arriba (no está representado en la figura 1), o se envía a una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) (no está representada en la figura 1), mientras que la biomasa de algas concentrada que se obtiene (Biomasa de algas húmeda) se puede someter a varias clases de tratamiento.

De acuerdo con lo que se representa en 1, dicha biomasa de algas concentrada (Biomasa de algas húmeda) se somete a la lisis celular y la extracción de los lípidos al mismo tiempo («lisis y extracción simultánea»: LES) (Lisis/extracción) (por ejemplo, en un homogeneizador) en presencia de al menos un solvente orgánico polar (por ejemplo, acetona), con lo que se obtiene una mezcla que comprende la biomasa de algas concentrada, el solvente orgánico polar y agua, que se envía a la separación (S1) (por ejemplo, mediante una centrifugadora), con lo que se obtiene la fase (i) [Extracto (fase orgánica)] y la fase (ii) (Desecho) de más arriba. Dicha fase (i) [Extracto (fase orgánica)] se somete a otra separación (S2) (por ejemplo, mediante evaporación), y se obtiene el solvente orgánico polar que se reutiliza en el procedimiento de más arriba y se utilizará bien en la fase de extracción de los lípidos (Extracción de lípidos) o en la fase de la lisis celular y la extracción de los lípidos (Extracto de lípidos) al mismo tiempo («Lisis y extracción simultánea»: LES) (Lisis/extracción), que se someten a los tratamientos descritos más arriba para obtener biodiésel o biocombustible (no indicado en la figura 1). Se debe señalar que, si determinadas mezclas conocidas (ya indicadas más arriba) tales como «lubricantes ligeros» (LCO), gasóleos, gasolinas alquiladas o mezclas de las mismas, se utilizan como solvente de extracción de los lípidos, dichos lípidos (Extracto de lípidos) se pueden enviar directamente a los procedimientos de refinería para producir biodiésel o biocombustible sin que haya que someterlos a ninguna separación más (S2).

Dicha fase (ii) (Desecho) se somete a la hidrólisis (Rotura de los polisacáridos) (por ejemplo, en presencia de ácidos diluidos), con lo que se obtiene una solución de azúcares y un residuo sólido que se envían a la separación (S5) (por ejemplo, por medio de filtración o centrifugación), con lo que se obtiene un residuo que comprende predominantemente proteínas (Residuo proteico) que se puede utilizar en la zootecnia (Pienso para animales) o que se puede enviar a los tratamientos para la producción de energía (Enriquecimiento energético), tal como, por ejemplo, la pirólisis a temperatura elevada, para obtener gas de síntesis (Sintegás) y aceite pirolítico (Aceite), y una solución de azúcares (Azúcares simples) que se envía a la fermentación (Fermentación A) en presencia, por ejemplo, de levaduras oleaginosas (Levaduras), con lo que se obtienen lípidos, que se añaden a la biomasa de algas concentrada que se obtiene de la fase de separación/desecación [Reciclaje de (lípidos)], o a la fermentación (Fermentación B) en presencia de microorganismos capaces de producir etanol (Etanol).

De acuerdo con lo que se representa en 2, dicha biomasa de algas concentrada (Biomasa de algas húmeda) se somete a la lisis celular (Lisis) (por ejemplo, por medio de la homogeneización a presión elevada) y la posterior extracción de los lípidos que se lleva a cabo tal y como está descrito más arriba (Extracción de lípidos), con lo que se obtiene la fase (i) (Extracto de lípidos) y la fase (ii) (Desecho) de más arriba, que se tratan tal y como está descrito más arriba.

De acuerdo con lo que se representa en 3, dicha biomasa de algas concentrada (Biomasa de algas húmeda) se somete a la deshidratación (Deshidratación), por ejemplo, mediante la adición de un solvente polar (Solvente polar) y se obtiene una fase acuosa que comprende dicho solvente orgánico polar y agua, y una biomasa de algas más concentrada. Dicha biomasa de algas más concentrada se envía a la separación (S3) (por ejemplo, por medio de una prensa filtradora), con lo que se obtiene una fase acuosa que comprende el solvente orgánico polar y agua. Dicha fase acuosa se envía a la separación (S4) (por ejemplo, por medio de la evaporación), con lo que se obtiene agua que se envía a otro tratamiento (Tratamiento de aguas) y el solvente orgánico polar (Solvente polar) que se reutiliza en la fase de deshidratación, y una fase orgánica que comprende la biomasa de algas concentrada que se envía a la extracción de los lípidos llevada a cabo tal y como está descrito más arriba (Extracción de lípidos), con lo que se obtiene la fase (i) (Extracto de lípidos) y la fase (ii) (Desecho) de más arriba, que se tratan tal y como está descrito más arriba.

Se dan a conocer algunos ejemplos ilustrativos y no limitantes para un mejor conocimiento de la presente invención y para su realización.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de la biomasa de algas

En los ejemplos que vienen a continuación se utilizó la cepa de alga *Nannochloropsis sp.*, de recogida interna, que normalmente crece en agua de mar. El procedimiento de cultivo adoptado se describe a continuación.

El inóculo a introducir en el estanque abierto donde se hace crecer tal y como se indica a continuación, se preparó de la siguiente manera:

- una muestra de monocultivo de algas anteriormente conservado a $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una solución de glicerina al 10% se descongeló dejándola a temperatura ambiente, y a continuación se sometió a centrifugación para retirar el sobrenadante, con lo que se obtuvo una pasta de células;
- 5 - la pasta de células así obtenida se inoculó en tres matraces de 250 ml que contenían 50 ml de la solución que comprende los nutrientes, con lo que se obtiene un cultivo de algas;
- dicho cultivo de algas se hizo crecer en una cámara iluminada y climatizada a una temperatura constante de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, en presencia de dióxido de carbono (CO_2) al 0,5% en el aire;
- 10 - después de aproximadamente una semana, el matraz alcanzó una concentración de 0,3 g/l, este cultivo se utilizó como inóculo para tres matraces de 1 litro que contienen 500 ml de la solución que comprende nutrientes y se colocó en la cámara climatizada;
- al cabo de 2 días, el cultivo tenía una concentración de 0,5 g/l y este cultivo se utilizó, tal y como está mencionado más arriba, como inóculo para un crecimiento en el estanque abierto de laboratorio que tiene un volumen de 35 litros.
- El inóculo, preparado tal y como está descrito más arriba, se hizo crecer en el medio de cultivo F/2, descrito en la bibliografía para el cultivo de microalgas. Las condiciones de crecimiento utilizadas fueron las siguientes:
- 15 Agua: agua de mar artificial (salinidad: 33 g/l);
- NaNO_3 : 75 mg/l;
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 5 mg/l;
- $\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$: 30 mg/l;
- Na_2EDTA : 4,36 mg/l;
- 20 $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,01 mg/l;
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,01 mg/l;
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 3,15 mg/l;
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0,18 mg/l;
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,006 mg/l;
- 25 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,022 mg/l;
- Hidrocloruro de tiamina: 0,1 mg/l;
- Biotina: 0,0005 mg/l;
- B12: 0,0005 mg/l;
- pH operativo: 7,8.
- 30 Inóculo a hacer crecer en el estanque abierto: 10% en volumen del cultivo de más arriba en el medio F/2.
- El estanque abierto para crecimiento se iluminó desde el exterior con 17.500 Lux con lámparas de tungsteno y se mantuvo a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por medio de la circulación de agua regulada con termostato. Dicho estanque abierto también se alimentó con una mezcla de aire y dióxido de carbono (CO_2) al 10% en el aire, a una velocidad de flujo de 200 litros/hora con control de pH (el pH se ajustó a 7,0).
- 35 El cultivo así preparado tenía una concentración de algas igual a 0,5 g/l y se utilizó para inocular estanques abiertos del tipo «estanque de rodadura con ruedas de paletas», colocados en el exterior, que tienen una superficie igual a $2,5\text{ m}^2$, una profundidad igual a 0,15 cm y un volumen igual a 375 l. Los estanques abiertos de tipo «estanque de rodadura con ruedas de paletas» estaban equipados con una hélice circular para mantener el cultivo de microalgas en constante agitación (velocidad de 30 cm/s) y tenían una división longitudinal para crear, mediante la agitación de la hélice, un flujo circular continuo. Dichos estanques abiertos estaban equipados con sensores para monitorizar la temperatura, el pH y la concentración del oxígeno disuelto.
- 40 La fuente de carbono consistía en dióxido de carbono (CO_2) gaseoso, que se introdujo directamente en los reactores y se reguló en función del pH medido. Tal y como ya se indicó más arriba, la figura 2 muestra el esquema de un estanque abierto del tipo «estanque de rodadura con ruedas de paletas».

Una vez que los cultivos que han crecido en los estanques abiertos habían alcanzado también una concentración igual a 0,4 g/l-0,5 g/l, dichos cultivos se transfirieron a estanques abiertos de tipo «estanque de rodadura con ruedas de paletas», colocados en el exterior, que tienen una superficie igual a 50 m², una profundidad igual a 20 cm y un volumen igual a 10 m³, y se puso en producción.

- 5 Dicha producción consistía en la recogida diaria del 40% del cultivo, que se sometió a la fase de recogida (separación/desección), mientras que a los estanques abiertos se les renovó el medio de cultivo con uno recién preparado consistía en el medio F/2, descrito más arriba, en agua de mar. La fuente de dióxido de carbono (CO₂) para estos estanques abiertos se tomó de la descarga de gases emitida desde una planta de oxidación parcial de metano para la producción de hidrógeno para los procedimientos de refinación de aceite.
- 10 La producción de los estanques abiertos se determinó al multiplicar el valor de la concentración de la biomasa de algas (peso seco) por el volumen del cultivo recogido, mientras que la concentración diaria de la biomasa de algas expresada en gramos por litro se determinó por medio de mediciones del peso seco que se llevaron a cabo de la siguiente manera:
- 15 - un volumen conocido de cultivo (p. ej., un litro) se filtró por un filtro Whatman con una porosidad de 0,42 µm para que la biomasa de algas y los sólidos inertes en la suspensión permanecieran adheridos al filtro;
- el filtro se secó a 105 °C, durante 3 horas para retirar el agua embebida;
- el peso del filtro secado a 105 °C dio a conocer la cantidad de biomasa de algas y de sólidos inertes que estaban presentes en el cultivo;
- 20 - a continuación, el filtro se calcinó a 550 °C para eliminar la parte de la biomasa de algas y para determinar los sólidos inertes presentes en el cultivo de algas;
- la diferencia de peso entre el filtro secado a 105 °C y el mismo filtro calcinado a 550 °C dio a conocer la cantidad de biomasa de algas contenida en un litro de cultivo, y el valor obtenido se indicó como una concentración del cultivo (debido solo al peso de la masa orgánica que procede de las microalgas) y es el valor de referencia para calcular la productividad por superficie y para calcular el contenido de lípidos, proteínas y azúcares del cultivo.
- 25 Los valores típicos medidos del contenido orgánico (sólidos volátiles) y del contenido de los sólidos inertes son los siguientes:
- sólidos volátiles del 55% al 70% del peso total de la biomasa de algas más los sólidos inertes;
- sólidos inertes del 30% al 45% del peso total de la biomasa de algas más los sólidos inertes.
- También se calculó la productividad con la siguiente operación:
- 30 - la productividad, expresada en gramos (peso seco), de la biomasa de algas recogida a diario se obtuvo al multiplicar el valor de la concentración del cultivo (determinado como está descrito más arriba) por los litros retirados cada día de cada estanque abierto;
- la productividad por superficie confirmada es la productividad calculada tal y como está descrito más arriba, con respecto a la unidad de superficie eficaz de cada estanque abierto, y este dato se obtuvo al dividir el valor de dicha
- 35 productividad por los metros cuadrados de superficie eficaz de cada estanque abierto, que en este caso eran iguales a 50 m²;
- por lo tanto, la productividad diaria por superficie se expresa en gramos producidos (peso seco) por metro cuadrado al día.
- 40 En la figura 4 se muestra un gráfico con la productividad diaria por superficie durante la producción de las algas con respecto a un estanque abierto (en el eje de ordenadas se describen los g/(m²/día), en el eje de abscisas se describen los días).
- La suspensión acuosa de la biomasa de algas que procede de los estanques abiertos se mezcló con una solución acuosa de hidróxido de calcio [Ca(OH)₂] al 5%, por medio de un mezclador estático, con lo que se llevó el pH de 7,5 a 10,5. La suspensión acuosa de la biomasa de algas a pH 10,5 se mezcló después, por medio de un segundo
- 45 mezclador estático, con una solución acuosa de floculante aniónico (Dryfloc® 976), preparada con anterioridad a una concentración de 1 g/l, con lo que se obtiene así una concentración de floculante en la suspensión acuosa de biomasa de algas igual a 4 ppm.
- La suspensión acuosa de biomasa de algas así tratada se introdujo en un decantador laminar de placas (Accadueo Impianti srl) que tiene una capacidad igual a 15 m³. Al cabo de 30 minutos, la biomasa de algas concentrada
- 50 obtenida se retiró del fondo del decantador: dicha biomasa de algas concentrada tenía una concentración de biomasa de algas (peso seco) igual a aproximadamente 40 g/l.

5 Diferentes muestras de dicha biomasa de algas concentrada se hicieron pasar, por medio de una bomba, a través de los filtros de una prensa filtradora, que funciona a una presión que oscila de 2 atm a 4 atm. La biomasa de algas que quedó en los filtros se retiró posteriormente, con lo que se obtuvo una biomasa de algas concentrada que tenía una concentración de biomasa de algas (peso seco) que oscilaba del 10% en peso al 20% en peso, con respecto al peso total de dicha biomasa de algas concentrada, según la presión de funcionamiento. El agua clarificada, por otra parte, que se hizo pasar a través de la prensa filtradora, se recicló para los estanques abiertos.

La biomasa de algas concentrada así obtenida se caracterizó por la determinación de la cantidad porcentual de lípidos, proteínas y glúcidos: la tabla 1 que viene a continuación indica los valores porcentuales medios que se obtuvieron y los métodos analíticos utilizados para su determinación.

10 Tabla 1

Sustancia	Método analítico	Cantidad (% p/p seco)
Proteínas	Bradford, <i>Bio-rad Protein Assay Analytical Biochemistry</i> (1976) vol. 72, páginas 248	56 ± 3
Lípidos	Bligh y Dyer, <i>Journal of Biochemistry and Physiology</i> (1959), vol. 37, págs. 911-917	15 ± 2
Glúcidos	Trevelyan y Harrison, <i>Archives of Biochemistry and Biophysic</i> (1952), vol. 39(2), págs. 419-439	29 ± 2

Ejemplo 2

Lisis con un homogeneizador y posterior extracción de los lípidos

15 Una muestra de biomasa de algas concentrada y húmeda (800 g) producida tal y como está descrito en el ejemplo 1, que tiene una concentración de biomasa de algas (peso seco) igual al 12% en peso con respecto al peso total de dicha biomasa de algas concentrada y húmeda, de la cual el 44% son los sólidos inertes y el 56% son sólidos volátiles (parte orgánica), y que tiene un contenido de lípidos del 29% en peso con respecto al peso total de sólidos volátiles, determinado con el método indicado en la tabla 1, se sometió a la homogeneización (homogeneizador GEA 3006L de Niro Soavi), que se hizo funcionar a 1500 bar a temperatura ambiente (25 °C).

20 En un matraz de dos litros se incubaron 500 ml de la biomasa de algas obtenida después de la homogeneización, durante 2 horas a 63 °C, con 1 l de acetona. Después de la centrifugación suave, se recuperó el sobrenadante (1370 ml) que comprende agua, acetona y lípidos.

25 El residuo sólido que comprende la biomasa de algas se lavó dos veces con 200 ml de acetona: se recuperaron los lavados y se añadieron al sobrenadante (volumen total de sobrenadante: 1770 ml) y el residuo sólido restante se secó al aire, con lo que se obtuvo un resto de biomasa de algas seca.

30 Se añadió diclorometano al sobrenadante a una razón de 3:1 con el sobrenadante, con lo que se obtuvo una mezcla. Dicha mezcla se agitó para que los lípidos se disolvieran completamente en el diclorometano de las dos fases inmiscibles que se obtuvieron. Dichas fases inmiscibles, que consistían de la mezcla agua/acetona y diclorometano/lípidos, se separaron por medio de un embudo de separación. Se retiró por evaporación el diclorometano desde la fase diclorometano/lípidos, y a continuación se determinó, pesándolos, la cantidad de lípidos restantes.

35 Se obtuvieron 19 g de lípidos, que eran el 26,8% en peso con respecto a los sólidos volátiles presentes en la biomasa de algas concentrada y húmeda de partida. Este valor indica que, con el procedimiento objeto de la presente invención, que se puede adaptar a una escala industrial, se consigue extraer el 92,4% de los lípidos totales contenidos en la biomasa de algas concentrada y húmeda de partida, lo que se determinó de acuerdo con el método analítico indicado en la tabla 1.

Ejemplo 3

Deshidratación con un solvente polar y posterior extracción de los lípidos

40 Se añadieron 485 g de acetona a una muestra de biomasa de algas concentrada y húmeda (310 g) que se produjo tal y como está descrito en el ejemplo 1, que tiene una concentración de biomasa de algas (peso seco) igual al 21,67% en peso con respecto al peso total de dicha biomasa de algas concentrada y húmeda, de la cual el 34,5% son sólidos inertes y el 65,5% son sólidos volátiles (parte orgánica) y que tiene un contenido de lípidos del 29% en peso con respecto al peso total de los sólidos volátiles, determinado con el método que se indica en la tabla 1, para una razón de agua:acetona igual a 1:2.

Después de mezclar en un Vortex durante 4 s, la mezcla obtenida se centrifugó a 2500 rpm durante 4 s. Se le añadieron 120 g de acetona al residuo obtenido, para una razón inicial de agua:acetona igual a 1:0,5, y la mezcla completa se mezcló de nuevo en un Vortex durante 4 s, con centrifugación a 2500 rpm durante 4 s.

5 La biomasa de algas húmeda (267 g) recuperada resultó tener la composición siguiente: 21,86% en peso con respecto al peso total de dicha biomasa de algas concentrada y húmeda (peso seco), de la cual el 33,28% son sólidos inertes y el 66,72% son sólidos volátiles (parte orgánica), y que tiene un contenido de lípidos del 29% en peso con respecto al peso total de los sólidos volátiles, determinado con el método indicado en la tabla 1. La fase líquida, que corresponde al 78,14% de dicha biomasa de algas húmeda, consistía en el 80% de acetona y solo el 20% de agua.

10 Una muestra (6,8 g) de la biomasa de algas húmeda de más arriba se sometió a la extracción de los lípidos con acetona como solvente polar: para este objetivo, la biomasa de algas húmeda se incubó durante dos horas en un matraz de 100 ml con dos cuellos a una temperatura de 65 °C a 70 °C, con 20 ml de acetona (razón de biomasa de algas húmeda:acetona igual a 1:3), con lo que se obtiene un sobrenadante (26 ml) que consiste en agua/acetona/lípidos y una biomasa de algas residual (desecho) que se separaron por filtración.

15 El residuo sólido que comprende la biomasa de algas residual (desecho) se lavó dos veces con 200 ml de acetona: se recuperaron los lavados y se añadieron al sobrenadante (volumen total de sobrenadante de 205 ml) y el residuo sólido restante se secó al aire, con lo que se obtuvo un residuo de biomasa de algas seca.

La determinación de los lípidos se llevó a cabo tal y como está descrito en el ejemplo 2.

20 Se obtuvieron 281 g de lípidos, iguales al 27,94% en peso con respecto a los sólidos volátiles presentes en la biomasa de algas concentrada y húmeda de partida. Este valor indica que, con el procedimiento objeto de la presente invención, que se puede adaptar a una escala industrial, se puede extraer el 96,3% de los lípidos totales contenidos en la biomasa de algas concentrada y húmeda de partida, lo que se determinó de acuerdo con el método analítico indicado en la tabla 1.

Ejemplo 4

25 Lisis y extracción con solvente al mismo tiempo («Lisis y extracción simultánea»: LES)

30 Se añadieron 160 g de acetona a una muestra de biomasa de algas concentrada (100 g) que se produjo tal como está descrito en el ejemplo 1, que tiene una concentración de biomasa de algas (peso seco) igual al 20% en peso con respecto al peso total de dicha biomasa de algas concentrada y húmeda, de la cual el 35% son sólidos inertes y el 65% son sólidos volátiles (parte orgánica), y que tiene un contenido de lípidos del 14,16% en peso con respecto al peso total de los sólidos volátiles, que se determinó con el método indicado en la tabla 1, para una razón de agua:acetona de 1:2, y la mezcla completa se sometió a la homogeneización (homogeneizador GEA 3006L de Niro Soavi), que se hizo funcionar a 1500 bar a temperatura ambiente (25 °C).

La biomasa de algas húmeda obtenida después de la homogeneización se centrifugó a 2500 rpm y se recuperó el sobrenadante (165 ml) que comprende agua, acetona y lípidos.

35 El residuo sólido que comprende la biomasa de algas seca se lavó dos veces con 200 ml de acetona: se recuperaron los lavados y se añadieron al sobrenadante (volumen total de sobrenadante: 565 ml) y el residuo sólido restante se secó al aire, con lo que se obtuvo un residuo de biomasa de algas seca.

La determinación de los lípidos se llevó a cabo tal y como está descrito en el ejemplo 2.

40 Se obtuvieron 2,45 g de lípidos iguales al 12,27% en peso con respecto a los sólidos volátiles presentes en la biomasa de algas concentrada y húmeda de partida. Este valor indica que, con el procedimiento objeto de la presente invención, que se puede adaptar a una escala industrial, se puede extraer el 86,65% de los lípidos totales contenidos en la biomasa de algas concentrada y húmeda de partida, lo que se determinó de acuerdo con el método analítico indicado en la tabla 1.

Ejemplo 5

45 Hidrólisis y extracción de azúcares

Una muestra (10 g) que consiste en un residuo de biomasa de algas seca (desecho) obtenida después de la extracción de los lípidos descrita en el ejemplo 2, se sometió a la hidrólisis ácida para hacer que los azúcares complejos presentes en la biomasa de algas seca de partida (desecho) se conviertan en azúcares simples (monómeros).

50 Con este propósito, se añadieron 20 ml de agua a dicha muestra junto con la cantidad de ácido sulfúrico necesario para obtener un pH de la solución igual a 1, con lo que se obtiene una suspensión de biomasa de algas.

La suspensión así obtenida se sometió a agitación durante 5 minutos, se llevó posteriormente, siempre en agitación, a 141 °C por medio de un lote termostático y se dejó a esta temperatura durante 5 horas.

5 Los azúcares simples que se obtienen después de la hidrólisis se disolvieron en la fase acuosa de la suspensión. La fase acuosa, rica en azúcares simples, se separó a continuación del «desecho» de células por medio de la centrifugación a 2500 rpm.

Para determinar los azúcares presentes en la fase acuosa aislada, se adaptó el método citado en la publicación de Trevelyan y Harrison, *Archives of Biochemistry and Biophysic* (1952), vol. 39 (2), págs. 419-439.

10 La cantidad de azúcares simples obtenidos resultó ser igual a aproximadamente el 50% de los azúcares totales, lo que resultó ser igual al 12% en la biomasa de algas de partida (desecho), lo cual se determinó con el mismo método indicado más arriba y también especificado en la tabla 1.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas, que comprende:
 - producir una suspensión acuosa de biomasa de algas;
- 5 - llevar el pH de dicha biomasa de algas a un valor mayor o igual que 10, que preferiblemente oscila de 10,2 a 12, con lo que se obtiene una suspensión acuosa de biomasa de algas a pH básico;
 - añadir al menos un floculante aniónico a dicha suspensión acuosa de biomasa de algas a pH básico, con lo que se obtiene una biomasa de algas concentrada;
 - recuperar dicha biomasa de algas concentrada;
- 10 - someter dicha biomasa de algas concentrada a la extracción de lípidos, con lo que se obtiene:
 - (i) una fase orgánica que comprende lípidos;
 - (ii) una fase semisólida que comprende un residuo de dicha biomasa de algas;
 - someter dicha fase semisólida (ii) a hidrólisis, con lo que se obtienen azúcares.
- 15 2. El procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho procedimiento se lleva a cabo en lotes, en semilotes o en continuo, preferiblemente en continuo.
3. El procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha suspensión acuosa de biomasa de algas procede del cultivo de algas, preferiblemente del cultivo de microalgas.
- 20 4. El procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho cultivo de algas se lleva a cabo en presencia de agua dulce o de agua salada que viene de fuentes naturales o artificiales, tal como los procesamientos industriales, preferiblemente agua salada.
- 25 5. El procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el pH de dicha suspensión acuosa se lleva a un valor mayor o igual que 10, mediante la adición de al menos un hidróxido de un metal alcalino, tal como hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH) o mezclas de los mismos; o de un metal alcalinotérreo, tal como hidróxido de calcio $[Ca(OH)_2]$, hidróxido de magnesio $[Mg(OH)_2]$ o mezclas de los mismos; o mezclas de los mismos.
- 30 6. El procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores de 1 a 4, en donde el pH de dicha suspensión acuosa se lleva a un valor mayor o igual que 10, mediante el consumo completo del dióxido de carbono (CO₂) durante el crecimiento de la biomasa de algas.
- 35 7. El procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho floculante aniónico se selecciona de polímeros aniónicos de alta masa molecular, tales como poli(acrilamidas), poli(acrilatos), poli(metacrilatos), poli(carboxilatos), preferiblemente poli(acrilamidas).
8. El procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dichos polímeros aniónicos tienen una masa molecular que oscila de 1 MDa a 20 MDa, que más preferiblemente oscila de 2 MDa a 10 MDa.
- 40 9. El procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho floculante aniónico está presente en dicha suspensión acuosa de biomasa de algas a pH básico en una cantidad que oscila de 1 ppm a 20 ppm, que preferiblemente oscila de 2 ppm a 10 ppm.
- 45 10. El procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho procedimiento comprende someter dicha biomasa de algas concentrada a la deshidratación, antes de la extracción de los lípidos, por la adición de al menos un solvente orgánico polar seleccionado de acetona, metanol, etanol, acetato de etilo, cetona metilética (MEK) o mezclas de los mismos, preferiblemente acetona, con lo que se obtiene una fase acuosa que comprende dicho solvente orgánico polar y agua, y una fase orgánica que comprende dicha biomasa de algas, más concentrada.

- 5 11. El procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho procedimiento comprende someter dicha biomasa de algas concentrada a la lisis celular, antes de la extracción de los lípidos, o después de la deshidratación, en donde dicha lisis celular se lleva a cabo preferiblemente en un homogeneizador a una presión que oscila de 250 bar a 2000 bar, preferiblemente de 800 bar a 1600 bar, a temperatura ambiente (25 °C).
- 10 12. El procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho procedimiento comprende someter dicha biomasa de algas concentrada, antes o después de la deshidratación, a la lisis celular y la extracción de lípidos al mismo tiempo (Lisis y extracción simultánea: LSE), preferiblemente en un homogeneizador, en presencia de al menos un solvente orgánico polar, tal como, por ejemplo, acetona, metanol, etanol, acetato de etilo, cetona metiletilica (MEK) o mezclas de los mismos, preferiblemente acetona, con lo que se obtiene una mezcla que comprende dicha biomasa de algas concentrada, dicho solvente orgánico polar y agua.
- 15 13. El procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho procedimiento comprende someter dicha biomasa de algas concentrada, antes o después de la deshidratación, a la lisis celular y la extracción de lípidos al mismo tiempo (Lisis y extracción simultánea: LSE), preferiblemente en un homogeneizador, en presencia de al menos un solvente orgánico apolar seleccionado de hexano, *n*-octano, iso-octano, nonano, decano, isómeros de xileno, tolueno, benceno, clorobenceno, diclorometano o mezclas de los mismos, cortes de refinería que comprenden mezclas que incluyen hidrocarburos alifáticos y aromáticos, mezclas de dichos hidrocarburos alifáticos y aromáticos, en concreto mezclas conocidas como «lubricantes ligeros» (LCO), gasóleos, gasolinas alquiladas o mezclas de los mismos, con lo que se obtiene una mezcla que comprende dicha biomasa de algas concentrada, dicho solvente orgánico apolar y agua.
- 20 14. El procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en donde dicha lisis celular y extracción de lípidos al mismo tiempo (Lisis y extracción simultánea: LSE) se lleva a cabo con una razón entre el volumen de la suspensión acuosa de la biomasa de algas concentrada y el volumen del solvente orgánico polar o apolar que oscila de 1:1 a 1:2, preferiblemente 1:2, a una presión que oscila de 250 bar a 2000 bar, preferiblemente de 800 bar a 1600 bar, a temperatura ambiente (25 °C).
- 25 15. El procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicha extracción de lípidos, cuando se realiza después de la lisis celular o de la deshidratación, se lleva a cabo mediante la adición de al menos un solvente orgánico apolar seleccionado de hexano, *n*-octano, iso-octano, nonano, decano, isómeros de xileno, tolueno, benceno, clorobenceno, diclorometano o mezclas de los mismos, cortes de refinería que comprenden mezclas que incluyen hidrocarburos alifáticos y aromáticos, mezclas de dichos hidrocarburos alifáticos y aromáticos, en concreto mezclas conocidas como «lubricantes ligeros» (LCO), gasóleos, gasolinas alquiladas, o mezclas de los mismos.
- 30 16. El procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicha extracción de lípidos, cuando se realiza después de la lisis celular o de la deshidratación, se lleva a cabo mediante la adición de al menos un solvente orgánico polar seleccionado de acetona, metanol, etanol, acetato de etilo, cetona metiletilica (MEK) o mezclas de los mismos, preferiblemente acetona.
- 35 17. El procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, en donde dicha extracción de lípidos, cuando se lleva a cabo después de la lisis celular o de la deshidratación, se lleva a cabo con una razón entre el volumen de la suspensión acuosa de la biomasa de algas concentrada y el volumen del solvente orgánico apolar o polar que oscila de 1:1 a 1:2, preferiblemente 1:1, a una temperatura que oscila de 20 °C a 100 °C, que preferiblemente oscila de 50 °C a 80 °C, durante un tiempo que oscila de 30 minutos a 4 horas, que preferiblemente oscila de 1 a 3 horas.
- 40 18. El procedimiento para la extracción de lípidos y azúcares a partir de biomasa de algas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha hidrólisis se puede llevar a cabo:
- 45 - en presencia de ácidos diluidos, tales como ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, presentes en una cantidad que oscila del 1% en peso al 5% en peso con respecto al peso total de dicha fase semisólida (ii), y está operando a una temperatura que oscila de 110 °C a 160 °C, durante un tiempo que oscila de 1 hora a 6 horas; o que está operando al punto de ebullición del agua;
- 50 - mediante el tratamiento de la fase semisólida (ii) con vapor de agua a una temperatura y presión altas, optativamente acompañado por una etapa para la liberación repentina de la presión (conocida en la técnica como el método de «explosión de vapor»), optativamente en presencia de un ácido, tal como ácido sulfúrico, a concentración baja, preferiblemente a una concentración <1% en peso con respecto al peso total de dicha fase semisólida (ii).
- 55

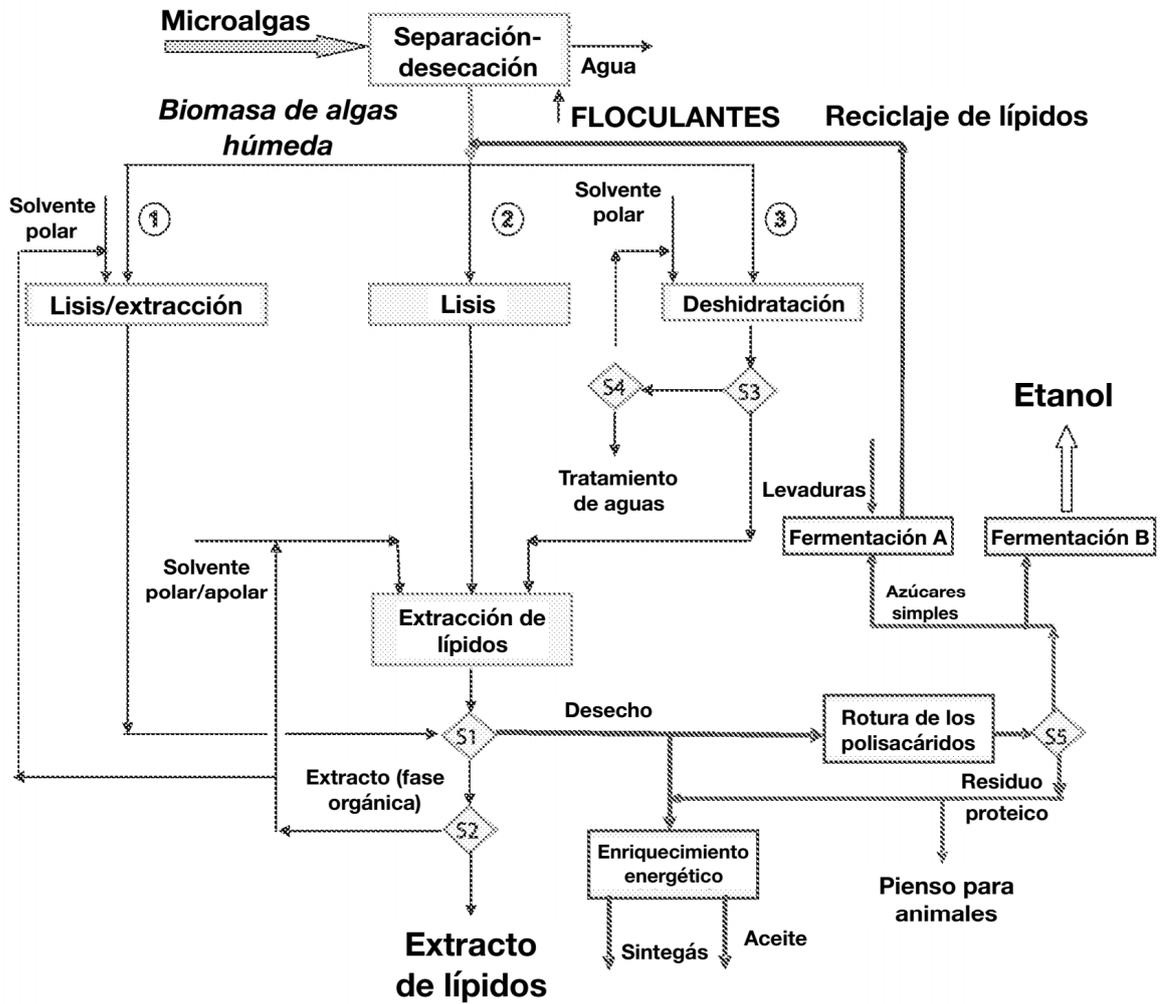
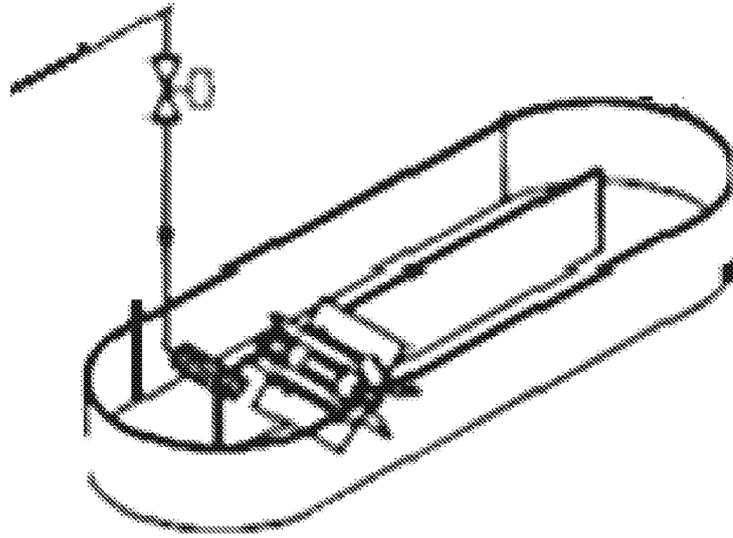


Fig. 1



Estanque P-1

Fig. 2

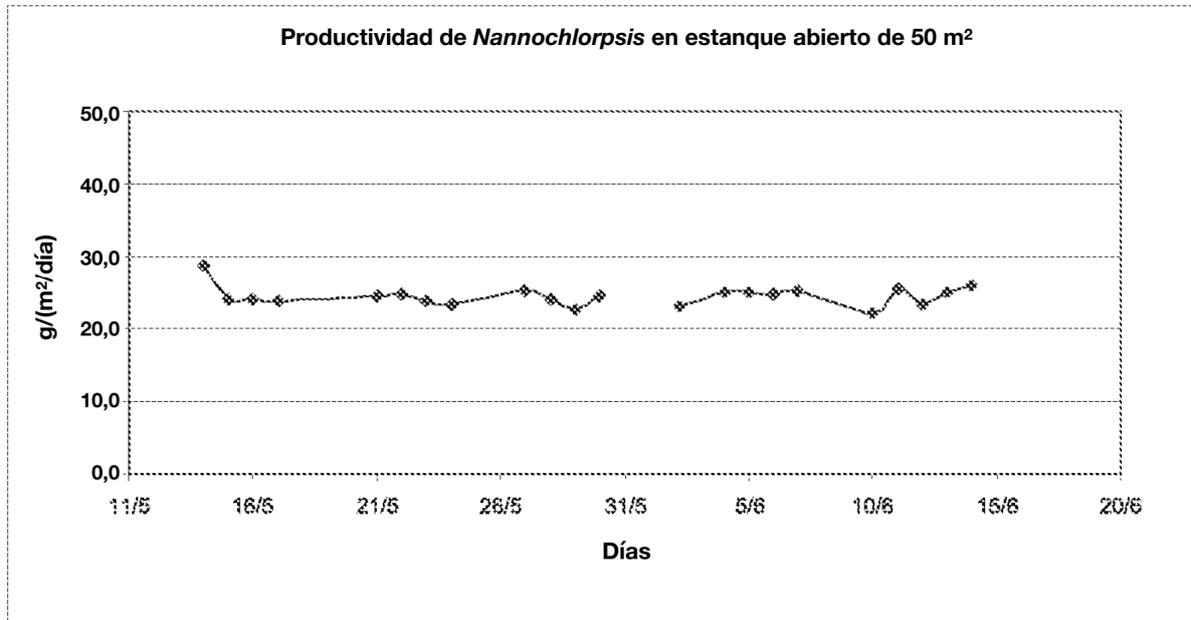


Fig. 3