

Señor Jefe
Dirección de Nuevas Creaciones
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-010962- -00007-0000

Fecha: 2013-01-16 14:06:07 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 33

Referencia: Solicitud de privilegio de Patente de invención.
Título: PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL Y/O FUELOIL A PARTIR DE BIOMASA INTEGRANDO SUBSTRATOS GENERADOS.
Solicitante: OURO FINO PARTICIPACOES E EMPRENDIMENTOS SA
Exp. No.: 2009-010.962
Asunto: Respuesta al requerimiento formulado mediante oficio No. 15413 del 4 de septiembre de 2012.

MÓNICA WOLF WASSERMAN, identificada con cédula de ciudadanía No. 51.711.267 de Bogotá y con Tarjeta Profesional de Abogada No. 46.034 del Consejo Superior de la Judicatura, en mi calidad de apoderada de la sociedad **OURO FINO PARTICIPACOES E EMPRENDIMENTOS SA**, por medio del presente escrito me permito dar respuesta al requerimiento de la referencia.

1. Título

De acuerdo con la sugerencia hecha por su Despacho con relación a que el título presentado es muy general, presento con este escrito un nuevo título como sigue:

PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL Y/O FUELOIL A PARTIR DE BIOMASA INTEGRANDO SUBSTRATOS GENERADOS

2. En las reivindicaciones

Con el objeto de atender a la observación hecha por su Despacho con respecto a las reivindicaciones, presento un nuevo capítulo de reivindicaciones en donde se han modificado, en particular, las reivindicaciones 1 y 2 y también se han efectuado algunas correcciones de lenguaje y gramática a las demás para hacerlas claras.

Las nuevas reivindicaciones 1 y 2 que presento con el nuevo capítulo de reivindicaciones caracterizan el proceso por sus etapas con lo cual se atiende a la objeción planteada por su Despacho.

También dentro de las modificaciones hechas al pliego reivindicatorio están las de eliminar aquellas expresiones indefinidas como “al menos” y “cerca de”.

En cuanto a los términos “OFA25, OFC27”, estos han sido eliminados del pliego reivindicatorio. Además le informo que estos microorganismos son conocidos en el estado de la técnica y los sufijos mencionados arriba se relacionan con referencias internas del cliente referentes a la fecha de presentación. También, en la solicitud se quiere enfatizar que una persona versada en la materia está en capacidad sin dudas de practicar la invención reivindicada con la generosidad de los microorganismos.

3. En la Descripción

Presento con este escrito una nueva descripción en donde se han efectuado las correcciones en las expresiones mencionadas por su Despacho y también con el nuevo título. Solicito respetuosamente se acepte la nueva descripción que presento.

4. Análisis de la patentabilidad.

Su despacho, después de efectuar una búsqueda de anterioridades en el estado de la técnica, encuentra los documentos (D1) US 4.560.659, (D2) BRPI0406347, (D3) CO2007-123696, (D4) Artículo 2 y (D5) Artículo 1 y con base en estos documento concluye que las reivindicaciones 3, 9 y 10 están afectadas por nivel inventivo en vista de D1, las reivindicaciones 1, 2, 4, 7, 8, 11, 12, 14 y 15 están afectadas por novedad en vista de D2, la reivindicación 9 está afectada por nivel inventivo en vista de D3, las reivindicaciones 3 y 10 están afectadas por nivel inventivo en vista de D4, y las reivindicaciones 5, 6 y 13 están afectadas por nivel inventivo en vista de D5.

Las nuevas reivindicaciones de la presente solicitud están dirigidas a un proceso para producir biodiesel o fueloil a partir de bioaceite de biomasa microbiana y algar. El soporte para esta restricción se encuentra en varios pasajes de la descripción y por la interpretación general de la solicitud.

Particularmente, el presente proceso para la producción de biodiesel y/o fueloil, está caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- a) Cultivar biomasa microbiana productora de aceite a partir de derivados y residuos de la caña de azúcar como fuente de carbón;
- b) Cultivar biomasa algar productora de aceite con el efluente líquido de (a);
- c) Extraer aceite de la biomasa productora de aceite subsiguiente con solvente orgánico o licuefacción directa termopresurizada; y
- d) Hacer reaccionar el aceite extraído con alcohol para producir biodiesel o fueloil.

Por lo tanto, mediante usar un proceso integrado que usa primero y segundo cultivos y el segundo cultivo usa el efluente líquido (caldo de cultivo) del primer cultivo, suministra un proceso mejorado y sorprendente para producir biodiesel o fueloil. Particularmente, existe una reducción de la carga orgánica contaminante, un incremento en el rendimiento de consumo de los nutrientes no consumidos del primer cultivo, la producción de una biomasa (algas) diferente y ventajosa para la producción del producto en cuestión, ya que la biomasa algar es capaz de utilizar el CO2 producido del primer cultivo y por lo tanto también se combina de manera sinérgica con el primer cultivo.

No existe ninguna enseñanza o sugerencia en el arte previo D1 – D5 que motive a una persona versada en la materia a encontrar la misma solución propuesta en la presente solicitud de patente.

Específicamente, D2 se relaciona con un proceso de producción microbiana mediante sumergir el cultivo junto con agitación en con dos derivados de caña de azúcar de la extracción de lípidos y la aplicación para producir biodiesel; producción de biomasa microbiana; y producción de biomasa microbiana mediante cultivo inmerso agitado de dos derivados de caña de azúcar. NO hay enseñanza ni sugerencia en D2 que lleve a una persona versada en la materia hacia la presente invención. No hay enseñanza ni sugerencia en D2 para obtener el proceso mejorado reivindicado en la presente solicitud.

De esta manera la solicitante respetuosamente manifiesta que la presente solicitud de patente es nueva e inventiva frente a D2. También la presente solicitud es nueva y inventiva frente a D1, D3, D4 y D5.

Pido por lo tanto, de manera respetuosa, a su Despacho continuar con el trámite y otorgar la patente a la presente solicitud.

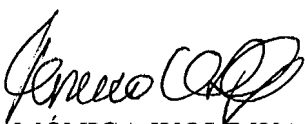
ANEXOS

1. Nuevo capítulo reivindicatorio
2. Nueva descripción

NOTIFICACIONES

Recibiré notificaciones en la Secretaria de este Despacho y en mi oficina, ubicada en la Calle 83ª No. 23-90 de esta ciudad.

Del Señor Jefe,



MÓNICA WOLF WASSERMAN
C.C. 51.711.267 de Bogotá D.C.
T.P. No. 46.034 del C.S. de la J.

4

"PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL Y/O FUELOIL A PARTIR DE BIOMASA INTEGRANDO SUBSTRATOS GENERADOS"

Campo de la Invención

La presente invención trata de un proceso para la producción de biodiesel y/o fueloil a partir de biomasa microbiana oleaginosa y/o algar y/o de derivados y residuos de la caña de azúcar. Los productos objeto de la presente invención son adecuados para su uso directo y en la generación de energía o vapor.

Histórico de la Invención

Con las previsiones actuales de que las reservas de petróleo estarán extintas en las próximas décadas, otras fuentes de energías han sido investigadas en todo el mundo. Entre estas, alternativas, los biocombustibles, tales como el etanol y el biodiesel, presentan un potencial significativo, por ser formas de energías poco contaminantes y, al mismo tiempo, renovables.

En el caso específico del biodiesel, en producción a gran escala, las tecnologías han sido desarrolladas a partir de materias primas ricas en lípidos y ácidos grasos de origen vegetal y animal. Desafortunadamente los lípidos y grasas derivados de plantas y de animales, producidos en todo el mundo, atienden apenas a la demanda de consumo para producción de alimentos y para la industria óleo química. De esta forma, es de extrema importancia la búsqueda de otras fuentes alternativas de producción de lípidos y ácidos grasos para uso en la producción de biodiesel y fueloil. La síntesis de lípidos y grasas por vía microbiana se presenta como una alternativa tecnológica para esta finalidad.

Tres son las principales ventajas de producción de lípidos por microorganismos. La primera, es la gran rapidez de generación, o sea, la biomasa microbiana se duplica en un intervalo de horas, las levaduras producen una nueva generación de una a tres horas, algas de dos a seis horas y hongos de cuatro a doce horas. La segunda, es la necesidad de menor área de producción para una misma masa de material graso, o sea, es posible producir en un fermentador la misma cantidad de lípidos en mucho menos tiempo y en un área hasta treinta veces inferior a aquella utilizada en plantíos de vegetales. Y la tercera, es la posibilidad de tener un mejor control del proceso de producción y del producto, es decir, el control de los birreactores, o fermentadores, es mucho más simples que el control de una labranza agrícola, además de no depender de variaciones climáticas y/o de estación.

No todos los microorganismos acumulan lípidos en cantidad suficiente para viabilizar su producción a escala económica e industrial. Los microorganismos considerados oleaginosos son aquellos que pueden acumular más de 20% de lípidos en su biomasa seca. Los fundamentos básicos de la fisiología para acumulación de lípidos por microorganismos han sido estudiados por varios investigadores alrededor del mundo.

Las levaduras pueden ser citadas como uno de los grupos de microorganismos más interesantes, por su capacidad para acumular grandes cantidades de lípidos a nivel intracelular, así como por sus tasas de crecimiento relativamente altas y su semejanza en la composición de los triglicéridos con la de los óleos vegetales.

En algunos casos, estos microorganismos pueden acumular hasta 70% de su peso seco en lípidos, siendo que los principales triglicéridos formados son de cadenas entre 16 y 18 átomos de carbono.

5

Durante la Segunda Guerra Mundial, con la escasez de lípidos de origen vegetal, el cultivo de levaduras posibilitó la fabricación de aceites y sus derivados, como margarinas y otros productos. En la industria cosmética actual, ácidos grasos de alto valor comercial son usados como emulsionantes y estabilizadores. Estos lípidos pueden igualmente ser sintetizados por vía microbiana.

Las algas representan otra fuente importante de lípidos, son igualmente capaces de acumular concentraciones de hasta 65% con relación al peso de su biomasa seca. Ellas pueden ser clasificadas como organismos fotosintéticos, como las plantas, pues utilizan energía solar para, juntamente con agua y dióxidos de carbono, generar biomasa. Dentro de esa clasificación, la presente invención tiene también como objetivo la utilización de organismos fotosintéticos que crecen en ambiente acuático, o sea, macroalgas, microalgas y otros organismos acuáticos para la producción de productos de interés comercial, en particular lípidos para la producción de biodiesel y fueloil.

Macroalgas son plantas de crecimiento acelerado y alcanzan tamaños considerables, en torno de 50m de longitud. Ya las microalgas, como su propio nombre lo sugiere, son organismos fotosintéticos microscópicos encontrados en ambiente marinos y de agua dulce.

El estudio de las microalgas aún es relativamente poco conocidos y las algas como un todo son organismos aún muy poco comprendidos y empleados en términos biotecnológicos. Las microalgas son divididas en una variedad de clases, de acuerdo con sus pigmentos, ciclo de vida y estructura celular básica. Las cuatro clases más importantes de microalgas en términos de abundancia son *Bacillariophyceae*, *Chlorophyceae*, *Cyanophyceae* y *Chrysophyceae*. Ellas son las formas más primitivas de plantas, poseen mecanismo fotosintético similar al de las plantas superiores, entretanto, convierten la energía solar en otras formas más eficientes, debido a su estructura celular simple. Además, de ellos, como las células crecen en suspensión acuosa, ellas poseen más acceso al agua, dióxido de carbono y otros nutrientes. Por tales motivos, las microalgas son capaces de producir treinta veces o más la cantidad de aceite por unidad de área plantada, cuando es comparada a la de los granos de oleaginosas.

Se puede afirmar, por lo tanto, que las microalgas forman un grupo heterogéneo, el cual engloba microorganismos fotosintetizadores tanto eucarióticos cuanto procarióticos. Las microalgas son generalmente unicelulares, Gram negativas y viven predominantemente en ambiente acuático.

La gran eficiencia fotosintética de estos microorganismos hace con que ellos formen la base de la cadena alimentaria en los ecosistemas acuáticos, siendo responsables por cerca del 40-50% de la fijación de carbono y de la producción de oxígeno del planeta. Además de ellos, las microalgas sintetizan materia orgánica a partir de substratos inorgánicos como sales, dióxidos de carbono y agua.

A partir de este conocimiento, la producción de lípidos por vía microbiana surge como una alternativa viable e innovadora en la competencia por la producción de aceites y grasas de origen vegetal y/o animal. Los microorganismos, como seres vivos más simples de plantas y animales, podrán ser utilizados de manera económica en gran o pequeña escala en la producción de biodiesel o en la generación de combustibles energéticos, así como en la producción de otros productos.

Descripción Resumida de la Invención

Es, por tanto, objetivo de la presente invención, proveer un proceso industrial que pueda integrar las diversas fuentes de materia prima para la producción de biodiesel y/o fueloil, como una alternativa considerable a los combustibles fósiles actuales.

Los productos, lípidos de origen microbiana y/o algar, objeto de la presente invención no son contaminantes y son obtenidos de fuentes renovables, comprendiendo derivados y residuos de la caña de azúcar tales como caldo. Melaza, azúcar refinado y/o integral, azúcares provenientes de la hidrólisis de las hojas y/o bagazo, los efluentes líquidos residuales provenientes de la producción de biomasa microbiana y el dióxido de carbono, además del glicerol, subproducto proveniente de la producción de biodiesel. Todos estos substratos pueden ser utilizados de forma aislada o, de cualquier otra forma, integrados en un mismo proceso ecológicamente adecuado e innovador.

Las figuras ilustrativas, en anexo, detallan las características del proceso de producción de biodiesel y/o fueloil según la presente invención, siendo que:

- La Figura 1 ilustra un flujograma general del proceso integrado según la presente invención;
- La Figura 2 ilustra un flujograma de las etapas de tratamiento previo e hidrólisis de bagazo de caña de azúcar;
- La Figura 3 ilustra un flujograma de la unidad de producción de biomasa microbiana oleaginosa;
- La Figura 4 ilustra el perfil de la evolución cinética de los principales parámetros de la producción de biomasa microbiana oleaginosa
- La Figura 5 ilustra un flujograma de las unidades de cultivo y recuperación de biomasa algar;
- La Figura 6 ilustra un flujograma de la etapa de extracción de lípidos y licuefacción directa de biomasa microbiana oleaginosa y biomasa algar;
- La Figura 7 ilustra un flujograma de la etapa de transesterificación de lípidos; y
- La Figura 8 ilustra un flujograma de utilización alternativa de lípidos.

Descripción Detallada de la Invención

Tal como es ilustrado en la Figura 1, de acuerdo a la presente invención, el proceso para la producción de biodiesel y/o fueloil a partir de la biomasa microbiana oleaginosa y/o algar obtenida de los derivados y residuos de la caña de azúcar, en su forma integrada, comprende siete unidades de procesamiento, las cuales engloban las etapas de producción y extracción de lípidos microbianos y algar, la etapa de la producción de biomasa y extracción de lípidos microbianos y algar, la etapa de la producción de biomasa microbiana oleaginosa de levaduras y/o hongos filamentosos obtenidos a partir de los derivados y residuos de caña de azúcar, así como la etapa de la producción de biodiesel y reutilización del glicerol proveniente de la unidad de transesterificación de los lípidos. La biomasa algar es producida concomitantemente a través del aprovechamiento integral de los residuos, CO₂ y caldo residual, efluente líquido de la producción de biomasa microbiana. Estas unidades básicas comprenden:

- Un conjunto de Procesamiento del Bagazo de Caña de Azúcar (Unidad 1);
- Un conjunto de Producción de Biomasa Microbiana a partir de derivados de la Caña de Azúcar, Bagazo de Caña de Azúcar Hidrolizado y Glicerol (Unidad 2);
- Un conjunto de Procesamiento de la Biomasa Microbiana Oleaginosa (Unidad 3);
- Un conjunto de Cultivo y Recuperación de Biomasa Algar (Unidad 4);

- Un conjunto de Extracción y Licuefacción Directa Térmica de Lípidos Microbiano y/o Algar (Unidad 5);
- Un conjunto de Transesterificación de Lípidos (Unidad 6); y
- Un conjunto de Procesamiento para la utilización del Fueloil Obtenido por Licuefacción directa Termopresurizada para generación de calor y/o vapor y aplicación como adyuvante al petróleo (Unidad 7).

El proceso según la presente invención será a continuación descrito a través de la secuencia operacional de procesamiento de las diversas fuentes de materias primas para la producción de biodiesel y/o fueloil. El procesamiento descrito fue realizado en instalaciones de estudios y análisis en condiciones de laboratorio. Siendo así, las diversas etapas del proceso de la invención comprenden:

1ª Etapa- Hidrólisis Ácida del Bagazo de Caña de Azúcar

En la Unidad 1- Procesamiento del Bagazo de Caña de Azúcar, conforme es ilustrado en el diagrama de flujo de la Figura 2, el bagazo de caña de azúcar resultante de la extracción del caldo, que es un residuo lignocelulósico producido en grandes volúmenes, en promedio 150 kg/ton de caña molida, es reutilizado después de hidrólisis como fuente de carbono en el proceso de producción de biomasa microbiana oleaginosa de levaduras y/o hongos filamentosos. Con esa finalidad, el bagazo de caña de azúcar pasa por dos etapas básicas fundamentales, el tratamiento previo y la hidrólisis.

Tratamiento previo del Bagazo y la Hidrólisis.

El tratamiento previo del bagazo de caña de azúcar es requerido para alterar el tamaño y la estructura de las fibras lignocelulosicas, micro y macroscópicamente, así como para alterar la composición química y estructura submicroscópica de las mismas, para que la hidrólisis de la fracción de carbohidratos en azúcares monoméricos pueda ser alcanzada más rápidamente y con rendimiento más elevados. Los objetivos del tratamiento previo son la remoción de la lignina y hemicelulosa, reducción de la cristalinidad de la celulosa y el aumento de la porosidad de los materiales. Un buen tratamiento previo mejora la formación de azúcares o la habilidad de formación de estos a través de la hidrólisis enzimática, así como evita la degradación o pérdida de carbohidratos y la formación de subproductos que puedan inhibir las reacciones subsecuentes de hidrólisis y formación de la biomasa microbiana oleaginosa. El tratamiento previo empleado en el proceso de la presente invención puede ser realizado por medios físicos, tales como la trituration mecánica o molienda, o por medios fisicoquímicos, químicos, biológicos o sus combinaciones.

Según la presente invención, los medios físicos de tratamiento previo son preferidos, más preferentemente la trituration mecánica que es una combinación de corte, trituration y molienda del bagazo. El Bagazo de caña de azúcar seco es molido en un triturador de cuchillas, tal como el de marca Sadrind K8/25. A continuación, ese material es peneirado, siendo que la fracción conteniendo partículas entre 0,1.0, 8 mm es encaminada hacia la etapa de hidrólisis ácida. En la trituration mecánica pueden ser utilizados igualmente otros tipos de equipamientos, tales como molinos de cesto vibratorio, molinos de bola, martillo triturador, triturador de rodillos, amasadores o cualquier otro equipamiento procurando siempre la reducción de las partículas del bagazo, hojas y desechos de caña de azúcar para facilitar la hidrólisis de este material celulósico.

Entre los tratamientos previos fisicoquímicos que pueden ser utilizados igualmente en el proceso de la presente invención, se hace referencia a la explosión a vapor, la explosión con fibra de amonio y la explosión con CO₂. En la explosión a vapor, el bagazo de caña de azúcar debe ser inicialmente molido, tratado con vapor saturado de alta presión y sometido a la reducción brusca de presión. Ese procedimiento generalmente ocurre entre 100- 300° C y 0,43-5.57 Mpa, durante un periodo de tiempo que puede variar de algunos segundos hasta varios minutos.

De forma semejante, en el tratamiento previo con amonio se realiza la exposición del bagazo de caña de azúcar al amonio líquido en alta temperatura y bajo elevada presión, seguida de caída abrupta de la temperatura. Ese procedimiento utiliza en torno de 1- 2 kg de amonio líquido/ kg de bagazo de caña de azúcar seco, a una temperatura entre 60- 120° C por un periodo de reacción entre 10 y 60 minutos.

Ya en el caso de la explosión a CO₂, se utiliza en torno de 2-5 kg de CO₂/kg de bagazo de caña de azúcar, a presiones en torno de 5,62 Mpa, por un periodo de tiempo similar a las otras dos técnicas.

Además, según la presente invención, un tratamiento previo químico del bagazo de caña de azúcar puede ser realizado por ozonolisis, hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina y deslignificación alcalina, entre otros.

La ozonolisis consiste en degradar la lignina y la hemicelulosa utilizándose para ello el ozono. La ozonolisis es preferida por ser más ventajosa, pues no produce residuos tóxicos, las reacciones ocurren a temperatura ambiente y remueve la lignina de forma muy eficiente. Ya el tratamiento previo químico por vía ácida puede utilizar, entre otros, el ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y ácido fosfórico, diluidos o concentrados, en condiciones críticas de presión y temperatura o no, y en forma continua o por lote. Esta técnica, sin embargo, requiere una etapa de neutralización para que el material pueda ser utilizado en la producción de la biomasa microbiana oleaginoso. A su vez, el tratamiento previo químico por vía alcalina posee las mismas variables de aquel por hidrólisis ácida, sin embargo, utiliza hidróxido de sodio, amonio u otros compuestos alcalinos en concentraciones variando de cerca de 2 a 30%. Además de estos tres métodos químicos aquí citados, existe aún la posibilidad de realizarse la deslignificación oxidativa del bagazo de caña de azúcar a través de la exposición de éste al peróxido de hidrogeno en concentraciones de 1 a 5 % y en temperaturas entre 20- 50° C durante un periodo de tiempo de 5 a 30 minutos.

Adicionalmente, existe aún la posibilidad de realizarse el tratamiento previo del bagazo de caña de azúcar a través de procedimientos biológicos. Para ello, son utilizados microorganismos, tales como hongos basidiomicetos (Brown-, White- and soft-rot fungi), capaces de degradar lignina y hemicelulosa.

Todos los tratamientos previos del bagazo de caña de azúcar, citados antes, están incorporados en el ámbito de la presente invención

Siguiendo el tratamiento previo, es efectuada la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar, a través de los cuales los polímeros de carbohidratos son convertidos en azúcares monoméricos. La celulosa puede ser transformada hidrolíticamente en glucosa tanto vía enzimática, a través de la acción de celulasas, como químicamente, a través de la acción de ácidos. Después de la hidrólisis, los azúcares de seis carbonos, también llamados hexosas (glucosa, galactosa y manosa), son prontamente fermentados, mientras que las pentosas (xilosa y arabinosa) son fermentadas sólo por algunas pocas cepas o linajes de microorganismos. La hidrólisis química puede ser realizada a través del uso de ácido, diluido o concentrado, tales como ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico y/o otros ácidos, con concentraciones variando de 2-80%, a temperaturas variando de 25-150° C, durante un periodo de reacción variando de algunos minutos a diversas horas, con o sin sistemas de recuperación o neutralización de ácidos.

También, de acuerdo con la presente invención, la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar es realizada usándose enzimas altamente específicas, denominadas celulasas. Ese método emplea condiciones mucho más blandas cuando es comparado con la hidrólisis ácida, ocurriendo en rangos de pH en torno de 4,5 y a temperaturas variando de 25- 60° C. Las celulasas son

generalmente una mezcla de diversas enzimas, siendo que en el proceso de acuerdo con la presente invención es preferido el uso de endoglucanasis (EC 3.2.1.4), exoglucanasis (EC 3.2.1.91) y/o β -glucosidasas (EC 3.2.1.21). Según la presente invención, la hidrólisis puede ser realizada con sustratos concentrados o no, con concentraciones de celulasas variando de 5 a 40 FPU/G de sustrato, con tiempo de reacción variando de 24-96 horas y utilizando enzimas inmovilizadas o no.

Por ser considerada más ventajosa y económica, la hidrólisis ácida es preferida, conforme a los resultados prácticos obtenidos en condiciones optimizadas.

Hidrólisis Ácida del Bagazo de Caña de Azúcar

Conforme es ilustrado en la Figura 2, el bagazo de la caña de azúcar seco y molido, con particular entre 0,1- 0,8mm es hidrolizado en un reactor de acero inoxidable AISI 316 con capacidad de 10 litros a 125° C, por 20 minutos, utilizando 1kg de materia seca para 120 gramos de H_2SO_4 concentrado, con una relación sólido líquido de 1: 10

Después de la hidrólisis, la suspensión es centrifugada para remoción del residuo sólido no hidrolizado, el cual es lavado con agua para extracción de los azúcares remanentes. El Hidrolizado (sobrenadante) obtenido es concentrado en cerca de seis veces en evaporador rotatorio al vacío tal como el secador BÜCHI R-215, a una temperatura de cerca de 65° C, como forma de aumentar la concentración de los azúcares totales presentes en el hidrolizado. El hidrolizado concentrado es entonces tratado para eliminar compuestos tóxicos derivados del furano, tales como furfural y hidroximetilfurfural, derivados de la degradación de la lignina, que son compuestos fenólicos, y ácidos débiles tales como ácido acético, ácido fórmico y ácido levulinico, que son formados durante el proceso de hidrólisis ácida y actúan como sustancias inhibitoras del crecimiento microbiano, en este caso la levadura. El hidrolizado de bagazo de caña de azúcar es finalmente descontaminado según la técnica descrita por Marton et al. (2003), la cual consiste en alterar el pH a través de la adición de óxido de calcio comercial (CaO) hasta pH 7.0, seguida de una acidificación con ácido fosfórico hasta pH 2,5 y posterior neutralización con óxido de calcio (CaO). En cada una de esas etapas de alteración del pH son hechas remociones del precipitado por filtración. A continuación, el hidrolizado es mezclado con carbón activado granular en una proporción de 10 gramos de carbón por cada 1 litro de hidrolizado en un reactor de acero inoxidable AISI 316, con capacidad de 10 litros, conteniendo en el su interior un sistema de agitación mecánica por palas. Los mejores resultados en términos de la descontaminación del hidrolizado del bagazo de caña de azúcar fue alcanzado después de un tratamiento por un tiempo de cerca de 40 minutos, a temperaturas de cerca de 65° C y con agitación de cerca de 245 rpm

Los azúcares (glucosa, xilosa y arabinosa) y el ácido acético presentes en el hidrolizado concentrado fueron identificados y cuantificados en cromatógrafo líquido de alta eficiencia (CLAE) de la marca Shimadzu modelo LC- 10 AD, detector de índice de refracción en columna AMINEX HPX-87H de la BioRad utilizando H_2SO_4 5mm como fase móvil, 60° C como temperatura del horno detector de índice de refracción. Las muestras fueron centrifugadas a las 4.500 rpm durante 15 minutos, diluidas con agua ultra pura y filtradas en membrana de éster de celulosa con porosidad de 0,22 μm . La concentración de fenoles totales fue realizada mediante el método de Singleton et al (1999) utilizando reactivo de Folin Ciocalteu. En la tabla 1 es presentada la composición química de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar después de tratamiento para su descontaminación utilizando carbón vegetal activado y alteración del pH. La xilosa se constituye en el principal carbohidrato, responde por aproximadamente 87% de los azúcares presentes en el hidrolizado de bagazo de caña de azúcar concentrado y descontaminado. El tratamiento previo para descontaminación del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar redujo en cerca de 17,41% la concentración de xilosa con relación a su valor inicial. En el caso de los compuestos tóxicos

fenólicos esta reducción fue de cerca de 88,85%, ya en el caso del ácido acético esta fue de cerca de 63,73%.

Tabla 1. Composición química del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar concentrado 6X

Componentes	Hidrolizado (g/l) Concentrado 6X	
	1	2
Glucosa	6,12	5,53
Xilosa	108	89,28
Arabinosa	8,90	8,10
Ácido acético	5,10	1,85
Fenoles	8,52	0,95
pH	7,0	7,0

1= antes de la descontaminación; 2= después de la descontaminación

2ª Etapa- Producción de Biomasa Microbiana de Levadura Oleaginosa

En la Unidad 2- Producción de Biomasa Microbiana, conforme es ilustrada en la Figura 3, las materias primas básicas utilizadas son los derivados de la caña de azúcar, tales como el caldo, melaza, azúcar moreno y/o refinado, bagazo de caña de azúcar hidrolizado concentrado y descontaminado (BHCD), glicerol y/o sus mezclas. En esa etapa, de acuerdo con la presente invención, se realiza:

Aislamiento e Identificación de la Cepa de Levadura

La levadura oleaginosa, *Rhodosporidiun toruloides* OF A25 fue aislada del suelo en una plantación de caña de azúcar en el Estado de Paraná- Brasil e identificada a través de sus características morfológicas y propiedades fisiológicas, metabolismo bioquímico, así como por técnicas de biología moleculares. La cepa *R.torulóides* OF A25 fue seleccionada por su habilidad en acumular triacylglicerol (TAG) en su biomasa cuando es cultivada en medios ricos en fuentes de carbono, tales como sacarosa y xilosa, derivadas de melaza, hidrolizado de bagazo de caña de azúcar y glicerol, sin embargo pobre en fuentes de nitrógeno. La cepa *R. torulóides* OF A25 fue conservada por liofilización en freezer, en temperatura de cerca de 80° C y subcultivada en caldo y agar YN (Yeast Medium)

Crecimiento de R. toruloides OF A25 en Diferentes Fuentes de Carbono

Ese experimento tuvo como base la utilización de los diferentes residuos provenientes de la industrialización de la caña de azúcar. La melaza de caña de azúcar (MCA) es un licor viscoso oscuro, rico en azucares no cristalizables generado durante la fabricación del azúcar. Su composición es bastante variable, pues depende de factores agrícolas e industriales tales como la variedad de la caña de azúcar, el grado de maduración y las condiciones climáticas, entre otras. Los principales componentes de la melaza son agua, carbohidratos y compuestos de origen orgánico como los aminoácidos, ácidos carboxílicos alifáticos y olefinicos, vitaminas, proteínas y fenoles, entre otros. La melaza contiene también una fracción de origen mineral de gran importancia en los cuales están presentes metales y no metales en proporciones significativas. En la tabla 2 al pie es presentada la composición promedio de la melaza de caña de azúcar utilizada en el proceso de la presente invención conforme aquí es descrito, el cual fue adquirido en la empresa Jardest S.A Azucar y Alcohol, Via Anhanguera kn 340- Jardimópolis- SP, Brasil. La sacarosa es el azúcar predominantes, responde por cerca de 80% de los azucares presentes. La presente

invención prevé igualmente el uso del caldo de caña de azúcar, en el cual aunque la sacarosa aparezca como azúcar predominante, su concentración es inferior a aquella encontrada en la melaza.

Tabla 2- Composición fisicoquímica de la melaza de caña de azúcar

Componente	%
Sacarosa	46,9
Glucosa	5,2
Fructosa	6,7
Cenizas	11,5
Otras sustancias no carbohidratos	16,4
Agua	14,5
pH	5,5

Como ya fue relatado anteriormente, la presente invención prevé la utilización del glicerol aislado y/o en asociación con melaza y/o caldo de caña de azúcar y/o hidrolizado de bagazo de caña de azúcar como fuente de carbono para producción de la biomasa oleaginosa de *Rhodospiridium toruloides* OF A25. El glicerol se constituye en un subproducto, residuo del proceso de transesterificación de los lípidos, en este caso triacilglicerol (TAG), durante la fabricación del biodiesel a partir de biomasa de levadura oleaginosa y/o algar. El reciclaje integrado de todos estos residuos es factor preponderante para los propósitos de la presente invención.

Preparo del Inóculo

Para el preparo del inóculo, la cepa *Rhodospiridium toruloides* OF A25 fue descongelada, repicada en medio YN (Yeast Medium) sólido, y sometida al crecimiento en estufa a cerca de 30° C durante 5 días. Fue transferida en cámara de flujo laminar para frascos Erlenmeyer de 500ml conteniendo 100ml del medio líquido YN estéril. Estos frascos fueron transferidos a una incubadora de movimiento rotatorio Nex Brunswick Scientific Co., a cerca de 30° C, 150 rpm por un periodo de cerca de 72 horas. El medio líquido YN está compuesto por glucosa (10g/l), peptona (5,0 g/l), extracto de levadura (3,0g/l), extracto de malta (3,0g/l), Agar (20 g/l) y con pH 5,0. La única diferencia de este medio con el YN Sólido es la presencia del Agar en una concentración de 20 g/l.

Producción de Biomasa de la Levadura Oleaginosa Rhodospiridium toruloides OF A25.

Frascos Erlenmeyer de 21 conteniendo 400ml de diferentes medios de cultivo esteril, conforme es ilustrado en la Tabla 3 (condiciones 1-15) debajo fueron inoculados con 10% v/v de un cultivo activo y recién obtenido de *Rhodospiridium toruloides* OF A25, según es descrito en el ítem anterior, con pH ajustado para cerca de 5,0 con HCl 1,0N. los frascos fueron entonces transferidos a una incubadora de movimiento rotatorio New Brunswick Scientific Co. a una temperatura de cerca de 30° C, 150 rpm, por cerca de 72 horas. Como fuentes de carbono, fue utilizada la melaza de caña de azúcar (substrato rico en sacarosa), hidrolizado de bagazo de caña de azúcar descontaminado y concentrado 6X (substrato rico en xilosa), glicerol (subproducto de la producción de biodiesel) y sus asociaciones. Según un aspecto de la presente invención, la melaza de caña de azúcar puede ser perfectamente sustituida por el caldo de caña de azúcar en función de la disponibilidad, estacionalidad y por economía de proceso. La concentración en términos de azúcares totales, presentes en la melaza de caña de azúcar e hidrolizado de bagazo de caña de azúcar es determinada por el método del fenol sulfúrico o en cromatografo líquido de alta eficiencia (CLAE) de la marca Varian Pro Star, modelo 500, con modulo de distribución de solvente modelo 240, horno modelo 500, detector de índice de refracción modelo 350, software Workstation 5.0, columna de separación SZ 5532 Shodez, que separa los componentes de la

muestra por tamaño molecular. Las condiciones de análisis fueron en fase móvil H₂O: acetonitrilo (20:80), 1ml/min, 65° C, volumen de inyección 15 µl (capacidad del loop 5µl). La estandarización de las lecturas de concentración es hecha con soluciones acuosas de 1 a 20 g/l de estándar grado analítico. Las muestras son previamente centrifugadas (10.000g, 5 min) y filtradas en membranas PVDF hidrofílicas de 0,22 µm (Millipore). En el caso del glicerol, sus concentraciones en los experimentos fueron cuantificadas por CLAE. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Dos fuentes de nitrógeno fueron seleccionadas y utilizadas, específicamente extracto con levadura y urea, o sus combinaciones y mezclas. Se enfatiza que otras fuentes de nitrógeno, de origen orgánico o inorgánico, así como concentraciones variadas podrán ser utilizadas, teniendo por objetivo maximizar la producción y/o acumulación de lípidos en la biomasa microbiana según la presente invención. Después de cultivo por cerca de 72 horas, los frascos fueron retirados del incubador y la biomasa oleaginosa fue separada por filtración en papel de filtro cuantitativo, al vacío. Después de una primera filtración, la biomasa fue lavada dos veces con agua destilada y secada en estufa al vacío por cerca de 24 horas aproximadamente a 60° C y pesada en balanza analítica. La concentración total de lípidos presente en la biomasa de la levadura fue determinada por extracción Soxhlet.

Tabla 3- Producción de biomasa y lípidos por *Rhodospiridiun torulóides* OF A25 en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno

LA	B	C	D	Y	F	G	H
1		-	100	10	-	16,05	15,14±0,97
2	-	100	-	10	-	18,73	24,30±1,74
3	100	-	-	10	-	32,13	41,18±1,42
4	100	-	-	-	2.5	27,60	31,03±2,73
5	-	100	-	-	2.5	14,21	14,62±0,94
6	-	-	100	-	2.5	12,65	9,25±1,05
7	50	50	-	10	-	26,53	34,01±1,12
8	50	-	50	10	-	22,08	29,05±1,50
9	-	50	50	10	-	10,12	16,44±1,35
10	50	50	-	5	1.25	24,44	30,10±0,54
11	-	50	50	5	1.25	23,07	25,33±2,04
12	40	30	30	-	2.5	15,49	17,02±0,71
13	40	30	30	5	2.25	26,47	33,61±2,13
14	30	40	30	-	2.5	8,15	13,12±0,34
15	30	30	40	-	2.5	9,17	14,00±1,11
16	30	30	40	5	2.5	19,25	24,79±2,02

A= Condición de Cultura; B= Melaza de caña (g/l); C= Hidrolizado de bagazo de caña de descontaminado concentrado 6X (g/l); D= Glicerol (g/l); E= Extracto de levadura (g/l); F= Urea (g/l); G= Biomasa (g/l); H= Contenido Lípido (%)

Los resultados presentados en la Tabla 3 líneas arriba demuestran que la levadura *Rhodospiridiun torulóides* OF A25 puede crecer y acumular elevadas concentraciones de lípidos en medios conteniendo residuos de la industrialización de la caña de azúcar, tales como la melaza, caldo e hidrolizado de bagazo, así como el glicerol, residuo generado durante la fabricación de biodiesel. La Condición de Cultivo 3 es la que propició las mejoras condiciones al crecimiento celular y acumulación de lípidos. Como ya fue resaltado anteriormente, la melaza de caña de azúcar, además de ser rica en sacarosa, posee también aminoácidos, ácidos carboxílicos alifáticos y olefínicos, vitaminas, proteínas e innumerables minerales. Inclusive cuando se sustituye la fuente de nitrógeno de origen orgánico (como el extracto de levadura) por otra de origen fósil (como la urea) , la producción de biomasa seca fue elevada, cerca de 27, 60 g/l, con un tenor de lípidos del orden de 31, 03% conforme a la Condición de Cultivo 4. Esa levadura demostró ser también capaz de crecer y acumular lípidos cuando es cultivada en hidrolizado de bagazo de caña de azúcar concentrado y descontaminado (BHCD). Como ya fue citado, ese hidrolizado es rico en xilosa. Con

la presencia de extracto de levadura en el medio conteniendo BHCD, la concentración de biomasa seca fue de cerca de 18m73 g/l, cuando se utilizó urea como fuente de nitrógeno, esa concentración fue de 14,21 g/l, las concentraciones de lípidos en la biomasa seca fueron respectivamente 24,30% y 14,62%, conforme Condiciones de Cultura 2 y 5. *Rhodosporidium toruloides* OF A25 demostró también ser bastante eficiente en la asimilación del glicerol cuando es utilizado como única fuente de carbono en el medio de cultivo. La producción de biomasa seca fue de cerca de 16,05 y 12,65 g/l de biomasa seca formada después de 72 horas de cultivo en shaker, habiendo acumulado respectivamente 15,14% y 9,25% de lípidos cuando las fuentes de nitrógeno fueron extracto de levadura y urea conforme muestran las Condiciones de Cultivo 1 y 6.

Producción de biomasa de la levadura oleaginosa *Rhodosporidium toruloides* OF A25 en Biorreactor.

Diferentes alícuotas de 20ml del medio X (inóculo) preparado conforme a la metodología anteriormente descrita, fueron transferidas a frascos Erlenmeyer estériles de 2l y mezclados en 180ml del medio Y (adaptación) esteril. Esas composiciones están descritas en la Tabla 4 a continuación. Esos frascos fueron incubados en agitador rotatorio del tipo shaker a 30° C, por cerca de 48 horas, a 150rpm. Después de ese tiempo, la levadura está perfectamente adaptada y presenta un crecimiento vigoroso en el nuevo medio. Este crecimiento y adaptación de la levadura al medio Y es evaluado a través de la retirada de muestras cada 6 horas y realizado un conteo de las células viables, previamente teñidas con eritrosina 1% en cámara de Neubauer. El biorreactor conteniendo un vaso de cerca de 14l fue llenado con 9.0l del medio de cultivo Z. El vaso del biorreactor fue transferido a una autoclave y el conjunto vaso + medio Z fue esterilizado aproximadamente a 120° C por 15 min. Después de un enfriamiento a temperatura de 30° C, ese medio fue inoculado con 1l de un cultivo activo de cerca de 48 horas del medio Y. la producción de biomasa de la levadura oleaginosa en biorreactor fue conducida durante cerca de 72 horas, en un equipamiento de la marca New Brunswick Scientific, modelo Bioflo 110, volumen total de 14l, volumen útil de 10l, modulo de control de pH y de O₂ con sonda de O₂, Mettler Toledo InPro 6800 Series O₂ Sensors y sonda de pH, Mettler Toledo 425mn modelo 405 DPAS-SC-K85/425 y dos bombas peristálticas para adición de ácido o base, modulo de control de nivel y espuma, con dos sondas control y dos bombas peristálticas para adición de antiespumante y agua, agitador mecánico con velocidad entre 100-1200rpn eje de agitación con dos hélices de Rushton (6 palás) de 74mm, rotámetro para control de aeración rango de 0 a 15l/min y escala de 1 en 1. Los parámetros de la fermentación fueron temperatura de 30° C, pH 5,0 controlado por la adición de ácido fosfórico 5% y/o hidróxido de sodio 3 normal, CO₂ 30%, velocidad entre 100 a 1200rpm, control automático conforme la saturación de oxigeno y variación de 1 v/v/min (5-10l/min conforme al volumen del medio).

Tabla 4 Medios utilizados para la producción de biomasa oleaginosa en el biorreactor

X (Preinóculo)	Y (Medio de Adaptación)	Z (Medio de Producción)
Glucosa, 10 g/l	Melaza de caña de azúcar, 10 g/l	Melaza de caña de azúcar, 40 g/l
Peptona, 5 g/l	Hidrolizado de Bagazo de Caña de Azúcar concentrado y descontaminado, 5 g/l	Hidrolizado de Bagazo de Caña de azúcar y concentrado y descontaminado, 30 g/l
Extracto de levadura, 3 g/l	Glicerol, 5 g/l	Glicerol, 30 g/l
Extracto de malte, 3 g/l	Extracto de levadura, 5 g/l	Extracto de levadura, 5,0 g/l
pH 5,0	pH 5,0	Urea, 2,5 g/l
		Antiespumante, 0,5 ml/l
		pH 5,0

En la Tabla 5 a continuación, y Figura 4, es presentada la evolución de los principales parámetros cinéticos, así como rendimientos globales de esa fermentación en biorreactor. Los resultados obtenidos demuestran que cerca de 29, 95% de las fuentes de carbono (Tabla 4, Medio Z) fueron utilizados por la levadura en la producción de biomasa y cerca de 10,81 para producción de lípidos. La biomasa total producida en biorreactor fue de cerca de 22,21% superiores a aquella producida en frascos Erlenmeyer en medio de cultivo similar (Tabla 3, Condición Cultivo 13), en cuanto a la acumulación de lípidos en la biomasa fue cerca de 7,5% mayor.

Tabla 5. Evolución de los principales parámetros cinéticos en el biorreactor

T (h)	pH	Azúcar Total (g/l)	Glicerol g/l	Biomasa Seca (g/l)	Lípidos %	Levadura x/s Global (%)	Levadura p/s Global (%)
0	5,0	82,40	29,04	1,32	2,68		
12	5,0	77,90	28,22	1,94	3,47		
24	5,0	45,33	26,48	3,92	9,25		
36	5,0	35,63	14,63	14,25	15,22		
48	5,0	24,72	8,33	17,93	18,5		
60	5,0	10,45	4,15	17,76	32,22		
72	5,0	1,39	2,02	33,67	36,13		
						29,95	10,81

En el proceso de acuerdo con la presente invención queda evidenciada la posibilidad concreta de emplearse como sustratos en la producción de biomasa oleaginosa de levadura, los residuos de la industrialización de la caña de azúcar, tales como la melaza de caña de azúcar e hidrolizado de bagazo de caña de azúcar concentrado y descontaminado, así como el glicerol, residuo de la transesterificación de los triacilgliceroles durante la producción de biodiesel. Esos residuos pueden ser empleados de manera aislada o en combinaciones en diversas proporciones, conjuntamente con diferentes fuentes de nitrógeno de origen orgánico e inorgánico o sus combinaciones, objetivando siempre altas concentraciones de biomasa conteniendo elevados tenores en de lípidos, conforme demostrados en los experimentos de la presente invención líneas arriba descritos. Valores superiores y/o inferiores a los presentados en estos ejemplares de experimentos podrán ser obtenidos en función de las condiciones fisicoquímicas, nutricionales, equipamientos, microorganismos, optimizaciones y mejoras que pueden ser aportadas al proceso de la presente invención.

La producción de biomasa microbiana oleaginosa, conforme a la presente invención, podrá ser realizada utilizándose otros géneros y especies de levaduras y hongos filamentosos, modificados genéticamente o no. De modos preferencial, los grupos de levaduras y hongos filamentosos son compuestos por *Candida curvat*, *Candida guilhermondi*, *Candida tropicalis*, *Candida sp.*, *Candida oleophila*, *Candida lipolitica*, *Criptococcus terricolu*, *Hanseunula saturnus*. *Hansenulla ciferrii*, *Lypomyces starkei*, *Rhodutoralagracilis*, *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus ochrceus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustu*, *Cladosporium fulvum*, *Cladosporium herbarum*, *Mucor miehei*, *Penicillium gladiololi*, *Penicillium ultimum*, *Crptococcus albidus*, *Lypomices starkeyi*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon pullulans*, *Mortierrela hygrophila*, *M. zychae*, *M. elengata*, *M. parvispora*, *M. schmuckeri*, *M.alpina*, *Lypomyces lipofeer*, *Lipomyces tetrasporus*, *Williopsis saturnus*, *Candida diddesnsiae*, *Yarrowia lipolitica*, *Trichosporon cutaneum*, entre otros, todos capaces de acumular lípidos en su biomasa durante la fase de crecimiento y post crecimiento. Estos microorganismos son utilizados de manera aislada o en asociaciones de dos o más.

Las referidas levaduras y hongos filamentosos pueden ser cultivadas en diferentes modelos de biorreactos, entre otros, del tipo tanque agitado, columna de burbujas, airlift, lecho empaquetado, lecho fluidizado o lecho goteante, operando en lote, gran cantidad alimentada o de forma continua. Los medios de cultivo ilustrados en las Tablas 3 y 4 podrán ser suplementados o no con una fuente mineral u orgánica de nitrógeno, tal como amonio, sulfato de amonio, fosfato de amonio, salvado de soya, extracto de carne, hidrolizados proteicos de soya, además de KH_2PO_4 , K_2SO_4 , MgSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4 , FeSO_4 , otros minerales y oligoelementos. Durante la formación de la biomasa y la acumulación de lípidos por las células microbianas podrían ser utilizado, en los biorreactores, una relación carbono/nitrógeno variando de cerca de 0,5 a 500, un pH variando de 2,5 a 8,5 y una temperatura en el rango de 10 a 50° C. el medio de cultivo a base de los derivados de la caña de azúcar, sus hidrolizados de bagazo y glicerol, podrá ser o no pasteurizado o esterilizado por el uso del calor como forma de eliminar la carga microbiana naturalmente presente, sin embargo indeseable en las materias primas. En caso que se adopte la práctica de la pasteurización o esterilización, la temperatura podrá variar de cerca de 62 a 142° C, en un tiempo de exposición térmica variando entre algunos segundos a algunas horas, en función de la técnica utilizada. Los medios podrán ser aun tratados con antibióticos y antifúngicos para reducción de la carga microbiana indeseable presente en los substratos. En el caso del uso de antibióticos, los mismos deberán ser de amplio espectro, o sea, poseer acción contra bacterias Gran (+) o Gram (-). Después de la pasteurización y/o esterilización, los medios de cultivo a base de los derivados de la caña de azúcar serán enfriados a temperaturas que podrán variar de 15 a 50° C. Los medios de cultura destinados a la producción de biomasa microbiana y consiguiente producción de lípidos serán inoculados con linajes de levaduras y/o hongos oleaginosos seleccionados y cultivados en biorreactores de menor volumen, con medio de la misma y/o diferente composición al descrito anteriormente. Es importante que esos inóculos posean concentraciones elevadas de células viables, superior aproximadamente a 10^3 UFC/cm³, pudiendo inclusive alcanzar valores del orden de 10^{12} UFC/cm³ o más. El volumen del inóculo utilizado en los tanques de producción podrán variar de 1 a 99 % del volumen de trabajo del biorreactor de producción, dependiendo siempre del sistema empleado, o sea, lote, gran cantidad alimentada o sistema continuo. El medio de cultivo en el interior del biorreactor tendrá una temperatura controlada de 15 a 50° C a través de camisas o serpentinas de calentamiento/enfriamiento, en la cual podrá circular agua fría o vapor. El pH en el interior del biorreactor será mantenido en el rango de pH 2,5- 8,5 en función del linaje microbiana empleado y será realizado a través del bombeo de una solución conteniendo ácido o álcali concentrado. El medio de cultivo en el interior del biorreactor podrá ser agitado mecánicamente o no. En el caso del uso de agitación, la misma será realizada por un sistema de palas a una velocidad que podrá variar de 5 a 500 rpm. El medio de cultivo para producción de la biomasa microbiana oleaginosa es aireado con un volumen de aire en el rango de 0,1 a 5 v/v/m (volumen de aire por volumen de medio por minuto). Podrá ser utilizando sólo aire, o una mezcla aire/oxígeno o sólo oxígeno. La inyección del aire en el interior de los biorreactores será realizado por compresores y todo el aire será filtrado en filtros con capacidad de retención de partículas de hasta 0,2 µm. El tiempo de cultivo para cada producción de biomasa y acumulación de lípidos será variable y en el orden de 24 horas a aproximadamente 150 horas, en función del genero y especie del microorganismo, así como del sistema de cultivo y del modelo del biorretor empleado, pudiendo ser de hasta semanas o meses, en el caso de cultivo que opera en sistema continuo.

La biomasa microbiana producida en la Unidad 2, puede alcanzar concentraciones variando de 15 a 130 g/l, dependiendo de la técnica de cultivo empleada, y la acumulación de lípidos puede llegar a concentraciones de hasta 65% o más en relación a su peso.

3ª Etapa- Cultivo y RECUPERACION DE Biomasa Algar

En la Unidad 4- Cultivo y Recuperación de Biomasa Algar, integrada al proceso según la presente invención, se realiza la preparación del caldo, efluente liquido resultante de la producción de

biomasa oleaginosa de la levadura *Rhodosporidiun toruloides* OF A25, para uso como sustrato en el cultivo de microalgas. La Figura 5 ilustra un flujograma de la integración de la Unidad 4 al proceso de la presente invención, hasta aquí descrito.

En los estudios de desarrollo del proceso según la presente invención, fue constatado que el caldo, efluente líquido proveniente de la separación de la biomasa microbiana oleaginosa, ya sea producido por levadura o por hongos filamentosos, es un excelente sustrato para el cultivo de microalgas oleaginosas o no. En el ejemplo de experimento según la presente invención, el caldo de la producción de biomasa oleaginosa de *Rhodosporidiun toruloides* OF A25 producida en biorreactor fue utilizado para tal finalidad. Ese caldo, fue analizado en cuanto a su composición fisicoquímica y utilizado como sustrato en el cultivo de la microalga *Botryococcus braunii* OF C27 en los ejemplos de experimentos presentados a continuación. El caldo, tal como es demostrado en la Tabla 6 a continuación, además de agua, posee concentraciones importantes de sales minerales y componentes orgánicos tales como azúcar residual no consumido por las levaduras, biomasa y fragmentos de las células de levaduras, proteínas solubles, etc. Por tanto, por ser rico en materia orgánica y minerales, dicho caldo posee igualmente una carga contaminante significativa, con valores de DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno) y DQO (Demanda Química de Oxígeno) superiores a cerca de 13.000 mg/l, lo que es considerado muy alto en términos ambientales.

Tabla 6- Composición de Caldo Fermentado de *Rhodosporidiun toruloides* OF A25*

Componentes	Concentración (mg/l)
DBO	13.900,08
DQO	23.414,04
Cloruros	0,00
Sulfatos	<700,00
Nitrógeno Total	30,00
Materia Orgánica	2,8%
Azúcar residual	<1000
Manganeso	<0,20
Potasio	307,64
Sodio	153,45
Zinc	<0,20
Aluminio	<10,00
Calcio	134,38
Cobalto	<0,50
Cobre	<0,50
Hierro	1,17
Fósforo	36,46
Magnesio	145,50
pH	5,0
Densidad	1035

* Análisis realizado en el CEPPA- Centro de Investigación y Procesamiento de Alimentos- UFPR

Como es de conocimiento general del arte, las industrias que producen fermento biológico (biomasa) para panificación o para aditivos para alimentación animal a base de levaduras del género *Saccharomyces*, además de otros, también descartan ese mismo tipo de residuo líquido después de separada la biomasa. El único y tradicional destino de ese residuo son las estaciones de tratamiento de efluentes industriales, en las cuales son empleados sistemas de digestión aeróbica y anaeróbica como forma de reducción de la carga contaminante en termos de DBO y DQO.

Como alternativa al descarte del caldo efluente proveniente de la separación de la biomasa microbiana, el proceso según la presente invención incorpora el referido caldo como medio de

cultivo de algas, como forma de reducción de carga contaminante, así como para producir lípidos más allá de proporcionar la liberación de oxígeno, por las dichas algas, para el medio ambiente.

Los elementos nutricionales presentes en ese caldo, en particular sales minerales, lo tornan un excelente sustrato para el cultivo de varios grupos de algas oleaginosas o no, cuyos rendimientos obtenidos en términos de biomasa son compatibles a los medios clásicos descritos en la literatura internacional. Se observó, también, sorprendentemente, que esos efluentes líquidos provenientes de la filtración de la biomasa de levaduras podrán ser utilizados en el cultivo de algas para la producción no sólo de lípidos, sino también de proteínas y otros productos de interés comercial.

Adaptación de la microalga al caldo

Fueron realizados estudios previos de adaptación de la microalga *Botryococcus braunii* OF C27 en mezclas crecientes de 5,10,20,30 hasta 100% de caldo al medio de cultura ESP, ilustrado en la Tabla 7 al pie. Esa adaptación fue hecha en frascos Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo 20 ml de medio. Los frascos fueron transferidos a una incubadora del tipo shaker, marca TECNAL, modelo TE-421, conteniendo fotoperiodo, temperatura y agitación controladas. Los cultivos fueron incubados por un periodo de cerca de 15 días, durante los cuales fueron mantenidos constantes preferentemente los siguientes parámetros: temperatura 25° C (±2° C), agitación de 110 rpm, 1500 Lux de intensidad de irradiación luminosa por periodos de 12 horas alternados con 12 horas en el oscuro. La intensidad de luz en el interior del incubador fue evaluada diariamente, en este caso fue utilizado luxímetro digital Minip MLN 101. Para la evaluación del crecimiento algar fueron colectadas muestras cada 2 días para su análisis por peso seco. La biomasa algar formada fue filtrada al vacío en papel filtro de 50µm y en seguida lavada con agua destilada y seca por 24 horas en estufa a 100° C, los resultados expresan el promedio de 2 determinaciones. Ese proceso previo de adaptación de las microalgas al caldo posibilitó la obtención de resultados más expresivos en términos de productividad diaria de biomasa, así como, mayores tasas de reducción de DBO y DQO, cuando es comparado con un proceso en el cual el alga no pasó por esa adaptación previa.

Tabla 7- Composición del medio ESP utilizado en el cultivo y adaptación al caldo de *Botryococcus braunii* OF C27

Componentes	Solución Estoque (g/100ml)	Solución Nutritiva (ml)
KNO ₃	1	20
K ₂ HPO ₄	0,1	20
Mg.SO ₄ .7H ₂ O	0,1	20
Extracto de sodio*	-	30
Solución de Micronutrientes**	-	5
Agua destilada	-	905
Proteosa-Peptona	-	1

Preparación del Inóculo

El inóculo para el cultivo de la *Botryococcus braunii* OF C27 en caldo puede ser realizado en diferentes modelos de frascos de vidrio u otro material transparente la luz. En el experimento según la presente invención fue realizado en frascos Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 90 ml de caldo o una mezcla de caldo + agua. Los frascos conteniendo ese medio pueden ser o no esterilizados. En el caso del experimento de la presente invención no fue realizada esterilización, siendo dicho frasco inoculado con 10 ml de un cultivo activo de *Botryococcus braunii* OF C27

adaptada en medio conteniendo ESP+ caldo, de modo que la concentración inicial de biomasa alga alcance valores de cómo mínimo 0,2 g/l. Procesos similares podrán ser realizados empleando concentraciones de biomasa alga superiores y/o inferiores la esa, utilizándose adaptación previa de la alga al caldo o no, sin embargo el objetivo es siempre tener un inóculo vigoroso y de buena calidad para atender a las necesidades de la etapa del cultivo alga en caldo. Los frascos son transferidos a una incubadora tipo shaker y cultivados en las mismas condiciones líneas arriba descritas. La biomasa alga obtenida fue empleada para inocular los fotobiorreactores tubulares en las etapas siguientes.

Cultivo *Botryococcus braunii* OF C27 en concentraciones crecientes de caldo

La *microalga Botryococcus braunii* OF C27 es cultivada en caldo duro o diluido en agua como único sustrato del medio de cultivo. Los fotobiorreactores fueron llenados con 1,8l de caldo no esterilizado, inoculados con un cultivo activo de *Botryococcus braunii* OF C27 de manera que la concentración de biomasa alga al inicio del cultivo sea del orden de 0,2 g/l. la agitación y aeración de los fotobiorreactores es realizada a través de un flujo de aire atmosférico de 1 v/v/m (volumen de aire por volumen de medio), utilizándose cánulas de vidrio con piedras porosas en su extremidad como forma de mejorar la difusión de los gases en el medio líquido. Los experimentos son conducidos en sala climatizada, con temperatura controlada en el rango de 30° C (±2° C) a través de uso de un acondicionador de aire. En esa sala son instaladas dos estufas con fotoperiodos para el control de tiempo ciclométrico digital marca Full Gauge, modelo PROGS I con alimentación directa de 220 VCA, conteniendo doce lámparas fluorescentes 20 Watts luz del día. La iluminancia de los fotobiorreactores es de 1500 Lux proporcionada por las lámparas fluorescentes tipo luz del día, por un periodo de 12 horas, alternados con 12 horas de ambiente oscuro. El tiempo de cultura es de cerca de 15 días. El volumen de las culturas fue mantenido constante por la reposición diaria de agua destilada para compensar las pérdidas por evaporación.

Tabla 8- Cultivo de la microalga *Botryococcus braunii* OF C27 en concentraciones crecientes de caldo

Caldo (%)	H ₂ O	Medio EPS Solución nutritiva	Biomasa Algar Inicial (g/l)	Biomasa Algar Final (g/l)	Lípidos %	Lípidos g/l
	Destilada (%)					
25	75	-	0,203	2,985±0,03	19,07	0,57 g/L
50	50	-	0,212	3,162±0,15	15,05	0.47 g/l
75	25	-	0,195	4,18±0,13	13,19	0.55 g/l
100	0	-	0,207	6,17±0,44	11,04	0.68 g/l
-	-	100	0,212	1,322±0,11	29,20	0.38 g/l

La biomasa alga formada fue filtrada al vacío en papel filtro de 50 µm y en seguida lavada con agua destilada y secada durante 24 horas en estufa a 100° C. Los resultados expresan el promedio de 2 determinaciones para cada experimento. Se observa en la Tabla 8 líneas arriba que el mejor resultado en términos de biomasa alga producida después de 15 días de cultivo fue obtenido con 100% de caldo puro (6,17 g/l). No obstante, se observa que en esa condición el porcentaje de lípidos presente en la biomasa alga fue de 11,04%, valor inferior a los 19,07% obtenidos en el experimento con caldo diluido en 75% de agua. Entretanto, si los cálculos fuesen realizados en términos de productividad de los lípidos por litro de medio de cultivo utilizado, esa situación se invierte. De esta forma, observamos que la producción de lípidos fue 0,68 g/l cuando *Botryococcus braunii* OF C27 fue desarrollado en un medio conteniendo 100% de caldo, frente a 0,57 g/l cuando el medio era compuesto por 25% de caldo + 75 % H₂O. La cantidad de biomasa y lípidos producidos por la microalga *Botryococcus braunii* OF C27 cuando fue cultivada en caldo

puro o diluido fue superior en comparación al medio (EPS- Solución nutritiva), referido en la literatura como ideal para el cultivo de esa especie de microalga (Tabla 8). Por los resultados obtenidos es posible concluir que el caldo residual proveniente del cultivo de la levadura oleaginosa (Unidad 2) puro o diluido, se constituye en un excelente sustrato para el cultivo de la microalga *Botryococcus braunii* OF C27 procurando la producción complementaria de biomasa y lípidos, según el proceso integrado objeto de la presente invención.

Efecto del CO₂ en el cultivo de *Botryococcus braunii* OF C27 en caldo

En la descripción líneas arriba es posible verificar que la productividad de óleo en (g/l) es más expresiva cuando la microalga *Botryococcus braunii* OF C27 es cultivada en un medio conteniendo 100% de caldo. Así, se procuró evaluar el efecto del CO₂ en la formación de biomasa y síntesis de lípido. Diferentes concentraciones de CO₂ fueron mezcladas en el aire de alimentación de los fotobiorreactores tubulares durante el cultivo de la *Botryococcus braunii* OF C27 en caldo puro. El CO₂ proveniente de un cilindro de gas es conducido a un mezclador de gases, el cual es alimentado concomitantemente con aire, de manera que los gases en la salida del mezclador presenten concentraciones de %, 10% y 15% de CO₂. Los experimentos son conducidos en cantidades de 15 (quince) días en fotobiorreactores tubulares de vidrio con 52 cm de longitud por 8 cm de diámetro, con volumen total de 2 litros (1,8 litros e volumen útil). Todos los cultivos fueron mantenidos en agitación constante proporcionada por un flujo de aire atmosférico filtrado de 1,0 v/v/m. los cultivos fueron iniciados con una concentración celular algar del orden de 0,20 g/l y fueron mantenidos durante el experimento sin corrección o ajuste de pH. Los volúmenes de los cultivos fueron mantenidos constantes por la reposición diaria del agua perdida por evaporación. Las condiciones de inoculación e incubación de los fotobiorreactores fueron las mismas empleadas anteriormente. Todos los experimentos fueron conducidos por duplicado y los resultados expresan el promedio de esas determinaciones.

Tabla 9- Efecto de la presencia del CO₂ en el crecimiento de *Botryococcus braunii* OF C27 en caldo

Condición de Cultura	Biomasa Algar Inicial (g/l)	Biomasa Algar Final (g/l)	% Lípido
Aire	0,207	6,17±0,44	11,04
Aire + 5% CO ₂	0,199	6,54±0,34	11,56
Aire +10% CO ₂	0,197	6,74±0,27	11,87
Aire+ 15 CO ₂	0,205	6,68±0,53	12,79

EN LA Tabla 9 líneas arriba ilustrados los resultados obtenidos. Se constata que la adición de CO₂ ejerce un efecto positivo en la producción de la biomasa y acumulación de lípidos durante el cultivo de la microalga de *Botryococcus braunii* OF C27 en medio a la base de caldo residual de la producción de biomasa de levadura oleaginosa. Cuando se comparan los cultivos en los cuales CO₂ fue mezclado al aire, con aquel que recibió sólo aire atmosférico. Se percibe que la mayor concentración en términos de biomasa algar y lípidos acumulados (6,68 g/l de biomasa con 12,79% de lípidos) después de 15 días de cultivo en fotobiorreactor tubular fue obtenida con la mezcla (Aire + 15% CO₂), mientras con sólo aire, fue de 6,17 g/l. Ciertamente que valores superiores y/o inferiores a esos podrán ser obtenidos en cultivos de la microalga *Botryococcus braunii* OF C27 o con otros géneros y especies de algas cuando son cultivadas en caldo puro o diluido, así como en niveles de CO₂ que no son probados en este estudio.

Reciclaje del sobrenadante

El cultivo de la microalga *Botryococcus braunii* OF C27 es realizado reciclándose el sobrenadante después de separación, por ejemplo utilizando filtrado. El reciclaje del sobrenadante es realizado en los mismos fotobiorreactores antes descritos, alimentados en todos los experimentos con apenas una mezcla gaseosa (Aire+ 15% CO₂), pues fue esa la condición que proporcionó los mejores resultados en términos de producción de biomasa y acumulación de lípidos, aunque sea posible utilizar otras concentraciones de CO₂. Así, en el proceso de la presente invención, es previsto el reciclaje de la fracción líquida (sobrenadante) de la primera producción para su utilización como medio de cultivo para un segundo, un tercero o más lotes, hasta que el sobrenadante residual se encuentre totalmente agotado en sus nutrientes originales.

Después de cultivo y filtración, el sobrenadante puede presentar pH alterado, habiendo necesidad de su corrección para un rango óptimo. La gran ventaja de esa recirculación, se refiere al hecho de que, además del tratamiento biológico conferido a ese residuo altamente contaminante, proveniente de la Unidad 2, se consigue implementar la producción de lípidos destinados a la producción de biodiesel y/o fueoil. En la Tabla 9 a continuación podemos observar que con el pasar de los ciclos, los macro y microelementos van siendo consumidos, los niveles de DQO y DBO van siendo significativamente reducidos, llegando al final del tercer ciclo con tasas muy próximas a cero. Queda, por lo tanto, claramente observada la importancia económica y ambiental de la recuperación del CO₂ generado durante la producción de biomasa de levadura *Rhodospiridiun torulóides* OF A25 y reutilización del mismo en la producción de biomasa de la microalga *Botryococcus braunii* OF C27, se reaprovechado así todos los residuos generados en la Unidad 2 en un circuito integrado.

Tabla 10- Producción de biomasa algar a lo largo de los ciclos de recuperación de caldo de producción de biomasa de levadura oleaginosa.

Tiempo de cultivo (días)	Aire + 15% CO ₂ g/l	% Lípido
0	0,211	-
15	6,68±0,53	12,79
30	4,54±0,34	15,74
45	1,94±0,27	17,65

En la Tabla 10 se constata que el reciclaje del sobrenadante interfiere positivamente en la tasa de acumulación de lípidos del *Botryococcus braunii* OF C27, sin embargo, no en la producción de biomasa.

Tabla 11- Reducción de los niveles de DQO y DBO del caldo proveniente de la Unidad 2 a lo largo de los ciclos

	DQO (mg/l O ₂)	DBO (mg/l O ₂)
Inicio	23.414±724	13.900±589
1º Ciclo	4682±234	1210±65,7
2º Ciclo	265±67	97±3,12
3 Ciclo	24±1,57	<5,0

Los análisis de DBO y DQO, cuyos resultados están listados en la Tabla 11 líneas arriba, fueron realizadas según Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20ed., 1998, Hach Company y WTW. La cuantificación de lípidos totales presentes en la bimasa algar fue determinada empleándose la metodología propuesta por BLIGH & DYER (1959).

Aún, de acuerdo con la presente invención, el caldo residual podrá ser diluido en agua, acrecentado o no de otras sustancias químicas teniendo por finalidad ajustar su pH o aún complementar determinados macros y micro-nutrientes. También, si fuera necesario, el caldo podrá ser decantado, filtrado o clarificado utilizándose carbón activado o agentes floculantes, dependiendo de la concentración de sólidos en suspensión. Se observa, igualmente, que la pasteurización o esterilización del caldo no proporciona diferencias significativas en la producción de biomasa y acumulación de lípidos en los diferentes grupos de algas investigados, siendo, por lo tanto, una operación unitaria dispensable, aunque pueda ser empleada cuando se haga necesario.

De acuerdo con presente invención, esa misma metodología podrá ser empleada con otras algas y/o cianobacterias que podrán ser cultivadas de forma Aislada y/o en cocultivos (linajes combinados) y son preferentemente aquellas de los géneros y especies formadas por el grupo *Euglena* sp. (*gracilis*), *Anabaena* sp. (*variabilis*, *cylindrica*, *hassali*, *planctónica*). *Dunaliella* sp. (*salina*, *bardawil*, *tertioleta*), *Achananthes orientalis*, *Amphora* (*delicatissima*, *cafeiformis*), *Ankistrodesmus falcatus*, *Chaetoceros* sp. (*muelleri*, *gracilis*, *muelleri subsalsum*), *Clorococcum* sp., *Chlorrella* sp. (*ellipsoidea*, *salina*), *Chromonas* sp., *Chrysosphaera* sp., *Cricophaera* sp., *Cryptomonas* sp., *Cyclotella* sp. (*meneghiniana*, *cryptica*), *Navícula* sp. *Amphiprora hialina*, *Eustigmatophyte flagellate*, *Pleurochysis* sp., *Franceia* sp., *Gleocapsa* sp., *Gloeothamnion* sp., *Hymenomonas* sp., *Isochrysis* aff. *Galbana*, *Monoraphidium* sp., *Nannochloropsis* sp. (*salina*), *Navícula* (*saprophil*, *pseudotenelloides*, *biskanterae*, *acceptata*, *saprophila*, *pseudotenelloides*), *Nephrochloris* sp., *Nitzchia* sp. (*pusilla monoensis*, *elliptica*, *alexandrina*, *quadrangula*, *pusilla monoensis*, *inconspicua*, *microcephala*, *frustulum*, *hantzchianna*, *intermedia*, *frustulum*, *communis*), *Ochromonas* sp., *Oocystis* sp. (*pusilla*), *Oscillatoria* sp. (*subborevis*, *limnetica*), *Phaeodactylum tricornutum* *Platymonas* sp., *Pleurochrysis* sp. (*dentate*), *Prymnesiophyte* sp., *Tetraselmis suecica*, *Thalassiosira weissflogii*, *Nitzchia* sp., así como sus mutantes y/o linajes modificados genéticamente capaces de acumular lípidos en su biomasa.

Estas algas y cianobacterias podrán también ser cultivadas a escala industrial. Diferentes formatos y tamaños de tanques pueden ser utilizados, pudiendo ser abiertos o cerrados, aireados o no, agitados o no, continuos, semicontinuos o discontinuos, horizontales, verticales, de tipo raceway, de placas, tubulares, ovales, circulares, rectangulares o cuadrados.

El cultivo de algas o cianobacterias en reactores abiertos es realizado en tanques naturales o artificiales con volúmenes que pueden variar entre algunas decenas de litros hasta varios millones de litros. Estos reactores ocupan grandes áreas, pudiendo alcanzar en promedio 10.000m² o más, en el caso de un único tanque horizontal o vertical. El sistema más común de agitación emplea palas, que son agitadas mecánicamente, siendo que dichas palas son distribuidas en espacios regulares por toda la superficie del medio, o entonces localizadas en las extremidades o en el centro del reactor. Conjuntamente a la agitación por palas, puede ser inyectado aire comprimido. Ese aire podrá ser filtrado o no. Los reactores podrán ser cerrados, a través del uso de una cobertura removible, sin embargo, esa cobertura deberá ser construida de un material transparente o translucido a la luz natural o artificial. Materiales apropiados son plástico, acrílico y vidrio.

En el caso de producción industrial, el dióxido de carbono (CO₂) producido en la Unidad 2- Producción de Biomasa Microbiana oleaginosa, es recuperado en el tope de los biorreactores a través de un colector al mismo y transferido a través de tuberías hasta los tanques de producción de algas y/o cianobacterias. El CO₂ es distribuido a través de burbujeador o difusores apropiados instalados en el medio de cultivo, de forma que la concentración de CO₂ en la forma disuelta en el medio sea del orden de 0,1- 30%. El CO₂ podrá ser comprimido y/o purificado y estoqueado en reservorios presurizados antes de ser inyectado en los tanques de cultivo de algas y/o cianobacterias. En el caso de ser purificados, los gases provenientes de los biorreactores de

producción de biomasa microbiana oleaginosa (Unidad 2) pasan a través de dos torres lavadoras rellenas con espirales de cerámica hasta llegar al gasómetro. En dichas torres, en que el líquido de lavado es agua desairada, ocurre la remoción casi que total de todas las impurezas solubles en agua. El líquido de lavado retorna por bombeo a los biorreactores de producción de biomasa microbiana (Unidad 2), pudiendo aún ser enviados a los tanques de producción de la biomasa algar. Del gasómetro, el gas es conducido a un depurador conteniendo $K_2Cr_2O_7$ en solución, el cual oxida metabolitos volátiles tales como aldehídos, alcoholes, entre otros, presentes en el gas, que es entonces enfriado. En un segundo depurador, conteniendo H_2SO_4 , se completa la oxidación y el gas es deshidratado. El CO_2 que sale de este depurador arrastra un poco de ácido que es eliminado en una torre rellena con coque, en la cual circula una solución de Na_2CO_3 . Cuando el ácido es neutralizado, hay liberación de CO_2 . El gas pasa por un lavador conteniendo una pequeña porción de glicerina que tiene por finalidad absorber los productos oxidados y fornecer un gas inodoro que puede ser estoqueado bajo compresión en tanques para ser utilizado en el cultivo de algas y/o cianobacterias.

La separación o recolección de la biomasa algar producida podrá ser realizada de manera continua, semicontinua o discontinua, manual o mecánica, floculada o no, utilizando centrifugas, filtros, filtros prensa, tamices, decantadores o ciclones. Se prefiere, según el proceso de la presente invención, la centrifugación y/o filtración. La biomasa algar podrá ser extrudida o no, seca naturalmente o en secadores de lecho fijo o móvil, o aun por atomización (spray-drier), o tambor rotatorio para extracción posterior de lípidos. La biomasa oleaginosa algar recuperada podrá además, alternativamente, ser sometida a una etapa de rompimiento celular y a continuación enviada a un mezclador.

4ª Etapa- Procesamiento de la Biomasa Microbiana Oleaginosa y/o Algar.

Tanto la biomasa oleaginosa como la biomasa algar producida según el proceso de la presente invención son separadas del caldo de cultivo de la misma forma, o sea por centrifugación. En los experimentos fue utilizada una centrifuga marca Car Padberg Zentrifugenbau, modelo 241, 20.000rpm, capacidad, 250l/h. después de separación del caldo, las referidas biomasas fueron lavadas dos veces con agua potable. Esas biomasas pueden también ser separadas por otras operaciones unitarias, tales como decantación o filtración, aunque la centrifugación pueda figurar como el proceso preferido en la presente invención. En el presente caso, la biomasa fue procesada por dos métodos distintos, con y sin secado.

Secado

El secado de las biomasas de levadura oleaginosa y algar fue realizada en una estufa a vacío marca BTN Medical, Modelo Vacucell, con capacidad de 111 litros. El secado fue realizado a temperatura de $60^\circ C$, presión de 500 mmHg y tiempo de 24 horas. Después de secado, el tenor de humedad de esas biomasas varió entre 8,5-10%.

Tratamiento de la Biomasa húmeda

Las biomasas de levadura oleaginosa y algar recuperadas después de centrifugación son enviadas para la Unidad 5- Extracción de Óleos (Lípidos) y Licuefacción Directa, conforme es ilustrado en la Figura 6. Alternativamente, la biomasa húmeda o seca podrá pasar por un proceso de rompimiento celular para facilitar la extracción de los lípidos subsecuentemente en el extractor a base de solventes orgánicos. Ese rompimiento celular podrá ser realizada a través del uso de métodos mecánicos o no mecánicos. Los métodos mecánicos consisten en el uso de presión, trituración o ultrasonido. Los métodos no mecánicos se basan fundamentalmente en el uso de enzimas que provocan lise celular, como la lisozima u otras, o en métodos químicos por el uso de detergentes o aun en métodos físico, a través del choque osmótico o congelamiento. Las biomasas aún húmedas (en pasta) de naturaleza microbiana y algar sometidas o no al rompimiento celular

podrán además opcionalmente ser enviadas a un mezclador donde son igualmente alimentados soportes naturales deshidratados, tales como salvado de soya, proteína de soya concentrada, pulpa cítrica y bagazo de mandioca, entre otros. La adición de esos soportes naturales a la biomasa oleaginosa de levadura y/o hongos filamentosos y/o algar, tiene por finalidad suprimir la etapa de secado de la misma antes de ser conducida al extractor, así como generar un producto destinado al consumo animal, después de la extracción de los lípidos.

5ª Etapa- Extracción de los Óleos (lípidos) y Licuefacción Directa Termopresurizada

Las biomásas de las levaduras oleaginosa *Rhodospiridium toruloides* OF A25 y de la microalga *Botryococcus braunii* OF C27. Producidas y procesadas según la presente invención, tienen sus óleos (lípidos) extraídos a través de dos procesos distintos, en extractor tipo Soxhlet y por licuefacción directa termopresurizada.

Extractor tipo Soxhlet semipiloto

Un extractor semipiloto basado en la metodología Soxhlet, con cámara/vaso de extracción conteniendo un volumen de 3 litros es alimentado con 300 gramas de biomasa de levadura oleaginosa y algar molida con partículas de 0,1-1mm. La extracción del óleo (lípidos) es realizada en esa cámara a través de la recirculación de 2,5 litros de n-hexano que se filtra a través de la biomasa contenida en el interior de un envoltorio de papel de filtro. Como fuente de calentamiento de la cámara es utilizado vapor fluente a 4atm. La temperatura de extracción optimizado de 4 horas. Otros solventes y/o condiciones de extracción podrán ser probados en este equipamiento.

Análisis de los óleos (lípidos)

Los óleos producidos por la levadura *Rhodospiridium toruloides* OF A25 y por la microalga *Botryococcus braunii* OF C27 fueron analizados conforme a la metodología siguiente:

1. Metilación de los ácidos grasos presentes en las muestras de las biomásas de levadura y algar utilizando el método Metcalfe, Smith & Pelka (1966);
2. Separación y detección de los ácidos grasos presentes en las muestras utilizando un cromatógrafo marca Varian, modelo 3300, equipado con detector de ionización de llama, inyector tipo "split/splitless", con columna Carbomax 20N. Los parámetros de la operación: temperatura del detector- 280° C; temperatura del inyector- 250° C; temperatura de la columna- 110° C (2Min), programación la 5° c/min hasta 180° C (7min), programación a 10° C/min hasta 210° C
3. Gas de arrastre, H₂ con flujo en la columna de 1mL/min;
4. Gas "make up", N₂ (30mL/min); y
5. Técnica de inyección "split, razão 1:100

El tiempo de retención (tr) y porcentaje (%) de los componentes fueron obtenidos a través del integrador INTRALAB 4290 que es acoplado al cromatógrafo.

La identificación de los ácidos grasos presentes en cada muestra fue realizada a través de los siguientes procedimientos:

- i. Tiempo de retención y tiempo de retención corregido (tr y trc) de ésteres metílicos de los ácidos grasos de las muestras y estándares;
- ii. Técnica del spiking de estándares junto con muestra; y
- iii. Longitud equivalente de cadena (ECL)

Los valores del ECL fueron calculados según Miwa et al., 1960, Bano et al., 1968. En las Tablas 12 y 13 son presentados la composición promedio (3 determinaciones) de los ácidos grasos presentes (en 3 muestras distintas) de óleos producidos por la levadura oleaginosa *Rhodospordiun torulóides* OF A25 y por la microalga *Botryococcus braunii* OF C27

Tabla 12 Perfil de Ácidos Grasos de la levadura *Rhodospordiun torulóides* OF A25

Ácido Graso	Carbono	g/100g
Mirístico	C 14:0	1,52±0,07
Palmitico	C 16:0	22,73±1,77
Palmitoleico	C:16:1	0,44±0,04
Esteárico	C: 18: 0	15,25±2,01
Oleico	C:18:1	45,20±1,89
Linoleico	C:18:2	11,44±0,94
Linolenico	C:18:3	3,46±0,41

Tabla 13 Perfil de Ácidos Grasos de la microalga *Botryococcus braunii* OF C27

Ácido Graso	Carbono	g/100g
Laurico	C:12:0	2,26±0,16
Mirístico	C:14:0	2,92±0,93
Palmitico	C:16: 0	39,26±3,77
Esteárico	C:18.0	4,21±0,644
Oleico	C:18:1	23,09±1,98
Linoleico	C:18:2	13,44±1,22
Alfa linolenico	C:18:3	14,79±0,95

Extracción por licuefacción directa termopresurizada

Este proceso es designado extracción por licuefacción directa termopresurizada (ELDT), en razón de que el extractor/reactor opera con presiones superiores a la atmosférica. Este incremento de presión no es ocasionado por la inyección de un gas inerte, pero sí por la elevación por sobre el ponto de ebullición y vaporización del líquido en el interior del vaso/ reactor. El reactor es formado por un vaso de acero carbono revestido internamente en acero inoxidable AISI 316. Este revestimiento interno debe ser de acero inoxidable para no sufrir corrosión en virtud de las diversas sales que son adicionadas al caldo de fermentación que inevitablemente estarán presentes en cantidades apreciables en la biomasa húmeda.

El extractor es constituido por un cilindro de 40 cm de longitud, 20 cm de diámetro externo y 15 cm de diámetro interno, resultando en un volumen total de 7,0 litros. Internamente existen 3 chicanas anguladas entre sí en 120º y con ancho de 1 cm, lo suficiente para elevar las esferas y hacerlas caer. El reactor reposa bajo ejes horizontales que lo movilizan a una velocidad de 40 rpm, promoviendo eficiente mezcla entre solvente, biomasa y esferas de porcelana, propiciando una mejora en la eficiencia del rompimiento celular y facilitando la extracción del óleo. 500g de biomasa de levadura oleaginosa y algar en la forma de pasta con 70% de humedad son mezclados con 2,1 litros de solvente y 50 esferas de porcelana. En esas condiciones operacionales la tasa de ocupación del volumen útil del reactor es de aproximadamente 35%. El reactor es lacrado, teniendo inicio el proceso de extracción, que es realizada a una temperatura de cerca de 120° C, para el caso de la utilización del n-hexano como solvente o cerca de 145° C para en el caso del uso del metano. La presión utilizada para ambos los tratamientos es de 7 bar, optimizadas previamente. Temperaturas y presiones superiores y/o inferiores a esas podrán ser utilizadas. El tiempo de extracción es de 1h 30 min, conforme condición optimizada, previamente

Después del término de la extracción, la fracción sólida formada por detritos celulares es separada de la fracción líquida formada por óleo + solvente + agua, por medio de filtración al vacío en filtro Büchner con papel filtro de porosidad de 4µm. La fase sólida queda retenida en el filtro siendo deshidratada y pudiendo ser utilizada como suplemento en la alimentación animal. La mezcla de las fases orgánica y oleosa es encaminada a un embudo de decantación. Después de 1 hora las fases están bastante distintas. La capa superior está compuesta por una mezcla de óleo y solvente. Esa mezcla es destilada para la recuperación del solvente que podrá ser reciclado en el proceso, obteniéndose un óleo bruto viscoso de coloración oscura.

Tabla 14. Propiedades del óleo obtenido por licuefacción directa termopresurizada (ELDT)

Propiedades	OBL	OBM	*Fueloil BPF (tipo LA)
Densidad Aparente (Kg/m ³)	957	945	970
Viscosidad Cinemática (mm ² /s)	*Normas ANP, Resolución 80, ASTM E29 OBL= Óleo bruto de levadura, OBM= óleo bruto de microalga **Poder calorífico inferior		
Punto de Fulgor Min. °C	85	79	66° c (mín)
H ₂ O y Sedimentos (% Volumen)	1.22	1,69	2,0% (máx)
Tenor de azufre	1,43	0,49	2,5% (máx)
Poder Calorífico Kcal/kg	**8598	**8429	9600

En la Tabla 14 líneas arriba son presentadas las propiedades de los óleos microbiano y algar obtenidos a través del proceso ELDT, según la presente invención, en comparación con el óleo BPF (tipo A) derivado del petróleo. Los experimentos demuestran que ese óleo obtenido de biomasa de levadura (OBL) y de microalga (OBM) se encuadra dentro de las normas brasileñas (ANP, Resolución 80 y extranjera ASTM) para esa clase de combustible destinado a la generación de calor/vapor. El proceso ELDT líneas arriba descrito posee gran potencial aplicativo en el área de la producción de los biocombustibles, pues dispensa la operación de secado de la biomasa, que es considerada de gran impacto económico. De esta forma, la presente invención a través de sus tecnologías integradas contempla la posibilidades de optarse por la vía tecnológica que sea más ventajosa económicamente y/o del tipo del biocombustible que se desea producir, el biodiesel o el fueloil para generación de vapor/ energía.

Además, según el proceso de la presente invención, la biomasa microbiana oleaginosa y/o algar con alto tenor de humedad puede, alternativamente, ser licuefactada en un reactor bajo presión y temperatura, en presencia de catalizadores químicos, preferentemente en presencia de álcalis. Durante la licuefacción, el reactor puede ser purgado con un gas inerte, tal como el nitrógeno, pues la purga impide la evaporación del agua y auxilia en la remoción del aire residual en el equipamiento. De acuerdo con la proveniencia de la biomasa (microbiana, algar o sus mezclas), el procedimiento de licuefacción directa termopresurizada puede durar de 5 minutos y 120 minutos, la temperatura interna del reactor puede variar entre 120° y 400° C y la presión interna puede variar de 1 Mpa Y 5 Mpa. El material licuefactado obtenido a partir de esta técnica posee alto poder calorífico, cerca de 5.000- 11.500 Kcal/kg, dependiendo del tenor de lípidos presente en la biomasa, así como de las condiciones empleadas en el proceso de licuefacción y naturaleza del catalizador. El producto obtenido podrá ser utilizado directamente como combustible o entonces puede ser mezclado al petróleo fósil durante la operación de refinado, con vistas a aumentar las

fracciones de diesel y/o gasolina. Podrá aún ser enviado para una nueva etapa de extracción liquido-liquido, con vistas a la extracción de hidrocarburos y subsiguiente producción de biodiesel.

6ª Etapa- Transesterificación de los óleos (lípidos) por catálisis ácida.

Los lípidos de biomasa oleaginosa de levadura y microalga extraídos y analizados conforme líneas arriba descrito fueron transesterificados según técnica descrita por Miao & Wu (2006)

Las reacciones de transesterificación fueron realizadas en frascos de vidrio del tipo Becker con capacidad de 1 litro. Fue utilizando una relación metanol: óleo de 56:1 y 100% H₂SO₄ como catalizador. Los frascos recubiertos con papel de aluminio fueron transferidos a una estufa con temperatura controlada en 30° C, siendo la reacción de transesterificación conducía bajo agitación por un periodo de 4 horas. Después de ese periodo, el producto de la reacción fue transferido para un embudo de separación. La parte superior constituida de biodiesel fue separada y lavada con éter de petróleo y, a continuación, con agua a temperatura 45 °C hasta la misma se tornar neutra, demostrando que ocurrió la completa remoción de la acidez residual de la reacción de transesterificación. El biodiesel fue entonces obtenido por separación del éter de petróleo por destilación. La parte inferior del embudo de separación es constituida básicamente por glicerina que es recirculada para el reactor de la Unidad 2, efectivando así el ciclo de aprovechamiento integral de los residuos en el proceso según la presente invención.

Evaluación de la calidad del biodiesel producido

La Tabla 15 a continuación presenta una serie de parámetros del biodiesel producido a partir de los ésteres metílicos obtenidos a partir de las biomazas oleaginosas de la levadura *Rhodosporidiun torulóides* OF A25 y microalga *Botryococcus braunii* OF C27. Eses resultados fueron comparados con muestras de diesel derivado del petróleo adquirido en el mercado en la ciudad de Ribeirão Preto, Estado de Sao Paulo, Brasil. Los resultados evidencian que el biodiesel producido a través del proceso de la presente invención presenta una cualidad próxima al diesel derivado del petróleo, pudiendo ser empleado integralmente o en mezcla con ese combustible fósil en motores tipo Diesel. Otra posibilidad es su utilización como sustituto del biodiesel producido a partir de productos agrícolas que son ampliamente requeridos en la alimentación humana y animal, como por ejemplo, la soya.

Tabla 15. Comparacion de las propiedades del biodiesel producido a partir de óleo de levadura y microalga con diesel derivado del petróleo.

Características	Método/ Técnica Utilizadas	BL	BM	Diesel Comercializado Estado de SAO Paulo- Brasil
H2O+ Sedimentos (% Volumen)	ASTN D 1796	0,03	0,01	0,03
Cenizas (%Masa)	ASTN D 482	0,0	0,01	0,0
Densidad Relativa a 20-4 °C (Kg/m³)	ASTN D 4052	875	869	852
Punto de Fulgor (min, °C)	ASTN D 445	103	96	59
Viscosidad la 40°C	ASTN D 445	5,3	5,2	3,5
Poder Calorifico	ASTN D 240	9860	9275	11300

Superior (Kcal/Kg)				
Indice de cetano	ASTN 4737 ANP Resolucion 210/ 2001	46	45,5	44

ASTM: American Society for Testing and Materials

Según un otro aspecto de la presente invención, la transesterificación de los óleos provenientes de una de las subunidades de extracción o de licuefacción directa, o inclusive sus mezclas, pueden ser transesterificados con el uso de etanol, isopropanol, butanol o cualesquier proporciones estequiométricas de óleo/ alcohol. La temperatura de la reacción deberá variar de 25 °C a 120 °C. La Figura 7 ilustra un flujograma de la unidad de transesterificación, parte integrante del presente proceso.

En esa Unidad 6, la transesterificación podrá aún ser realizada utilizándose diferentes catalizadores químicos. Si la catálisis es alcalina, se puede utilizar el hidróxido de sodio, hidróxido de potasio u otros y, si la catálisis fuese ácida, se pueden utilizar el ácido fosfórico, ácido clorhídrico, el carbonato de calcio u otros. En el caso de catálisis enzimática, se puede utilizar cualesquier enzimas clasificadas como lipolíticas/lípases. De acuerdo con el catalizador utilizado en el proceso, se debe aplicar el neutralizador correspondiente en la etapa de lavado de biodiesel. La transesterificación puede también ser realizada utilizándose cosolventes tales como el tetrahidrofurano u otros, los cuales irán a aumentar la solubilidad del alcohol primario utilizado. En este caso, queda dispensada la neutralización, pues son recuperados juntamente con el alcohol.

Además de estas dos opciones, hay una tercera, la reacción de transesterificación en estado supercrítico, en el cual la reacción ocurrirá a temperaturas variando de 350 °C a 400 °C y presiones variando en el orden de 60 a 100 atm.

De un modo general, la reacción de transesterificación podrá aun ocurrir en lotes o en sistema continuo. El catalizador, el cosolvente, el alcohol y la biomasa procesada podrán ser adicionado al tanque de transesterificación conjuntamente o podrán ser previamente mezclados en otro orden utilizándose tanques adicionales para estas mezclas. La reacción podrá ocurrir con o sin catálisis ácida, básica o enzimática, homogénea o heterogénea, con o sin el uso de cosolventes, en estado supercrítico o no y con o sin agitación.

Después de la etapa de transesterificación , el alcohol utilizado podrá ser recuperado por procesos de evaporación o destilación flash, procurando reducir la solubilidad del glicerol en el biodiesel. En caso que sea utilizada transesterificación con cosolvente, en esta etapa él será removido junto al alcohol.

A continuación de la etapa de transesterificación, es realizada la separación de fases, resultando en una fase leve comprendiendo el biodiesel (fase superior) y en una fase pesada comprendiendo el glicerol (fase inferior). La separación de fases podrá ocurrir naturalmente por decantación o a través de la acción de un campo gravitacional centrifugo para acelerar este proceso, pudiéndose entonces utilizar una centrífuga. Después de la separación de fases, el glicerol es retirado del sistema y recirculado como fuente de carbono para la producción de biomasa microbiana oleaginosa, al inicio del proceso integrado según la presente invención. El biodiesel así obtenido pasa, alternativamente, por una etapa de lavado, visando la remoción de cualesquier impurezas o de otros compuestos químicos adicionados al proceso. Este lavado es realizada utilizándose diferentes proporciones agua/biodiesel y por cualquier método adecuado. El efluente de esta etapa de lavado consiste en una mezcla de agua y catalizado, en caso que éste empleado en la etapa de transesterificación.

El biodiesel purificado podrá entonces ser almacenado o, deseándose un producto con calidad superior, se puede aún someterlo a una etapa de evaporación del agua remanente.

Como alternativa a la producción de biodiesel, los lípidos provenientes de la Unidad 5- Extracción de Óleos (Lípidos) y Licuefacción Directa termopresurizada, conforme es ilustrada en la Figura 6 y líneas arriba descrita, pueden ser utilizados directamente en la industria. Ventajosamente, los lípidos provenientes de la subunidad d licuefacción directa pueden ser utilizados como combustibles para la generación de calor y/o vapor, mientras que los lípidos provenientes de la subunidad de extracción, o sus mezclas con aquellos provenientes de la subunidad de licuefacción directa, pueden ser utilizados como adyuvantes al petróleo bruto o sus fracciones pesadas provenientes del refinado, lo que proporcionará aumento en los rendimientos en gasolina, diesel y demás fracciones durante el refinado o craqueado. La Figura 8 ilustra un flujograma mostrando tales alternativas

Los técnicos en el asunto percibirán, por la descripción líneas arriba, que el proceso para la producción de biodiesel y/o fueoil a partir de biomasa microbiana oleaginosa y/o algar según la presente invención es una tecnología innovadora, ecológicamente sustentable, que no genera cualquier tipo de residuo, proporcionando además la ventaja de liberar importantes volúmenes de oxígeno en la atmosfera a partir de los tanques de producción de biomasa algar.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la producción de biodiesel y/o fueloil, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
 - a) Cultivar biomasa microbiana productora de aceite a partir de derivados y residuos de la caña de azúcar como fuente de carbón;
 - b) Cultivar biomasa algar productora de aceite con el efluente líquido de (a);
 - c) Extraer aceite de la biomasa productora de aceite subsiguiente con solvente orgánico o licuefacción directa termopresurizada; y
 - d) Hacer reaccionar el aceite extraído con alcohol para producir biodiesel o fueloil.

2. El proceso para la producción de biodiesel y/o fueloil, de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
 - Cultivar biomasa microbiana productora de aceite a partir de levadura *Rhodosporidium toruloides*;
 - Separar la biomasa microbiana productora de aceite de *Rhodosporidium toruloides* del caldo de cultivo;
 - Cultivar biomasa algar productora de aceite con microalgas *Botryococcus braunii* con el CO₂ y el caldo residual de la etapa anterior;
 - Extraer los aceites microbianos y algares con solvente orgánico o licuefacción directa termopresurizada;
 - Transesterificar los aceites producidos.

3. El proceso para la producción de biodiesel y/o fueloil, de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por el hecho de que la etapa de producción de biomasa microbiana oleaginosa es realizada con el uso de la levadura *Rhodosporidium toruloides*.

4. El proceso para la producción de biodiesel y/o fueloil, de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por el hecho de que la etapa de producción de biomasa microbiana oleaginosa es realizada con el uso de una o más entre las levaduras y hongos filamentosos, modificados genéticamente o no, seleccionada del grupo compuesto por *Cándida curvata*, *Candida guilhermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida sp.*, *Candida oleophila*, *Candida lipolitica*, *Cryptococcus terricolus*, *Hansenula saturnus*, *Hansenula ciferrii*, *Lipomyces starkei*, *Rhodotorula gracilis*, *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus ochrdeus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus*, *Cladosporium fulvum*, *Cladosporium herbarum*, *Mucor miehei*, *Penicillium gladiololi*, *Penicillium javanicum*, *Penicillium lilacinum*, *Penicillium spinulosum*, *Penicillium ultimum*, *Cryptococcus albidus*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon pullulans*, *Mortierella hygrophila*, *M. zychae*, *Lipomyces tetraporus*, *Williopsis saturnus*, *Candida diddensiase*, *Yarrowia lipolitica*, *trichosporon cutaneum*.

5. El proceso para la producción de biodiesel y/o fueloil, de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por el hecho de que la etapa de producción de biomasa algar es realizada con el uso de la microalga *Botryococcus braunii*.

6. El proceso para la producción de biodiesel y/o fueloil, de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por el hecho de que la etapa de producción de biomasa algar es realizada con el uso de algas y/o cianobacterias que pueden ser cultivadas de forma aislada o en cultivos (linajes combinados) y están formadas por el grupo constituido por *Euglena* sp. (*gracilis*), *Anabaena* sp. (*variabilis*, *cylindrica*, *hassali*, *planctónica*), *Dunaliella* sp. (*salina*, *bardawuil*, *tertioleta*), *Achananthes orientalis*, *Amphora* (*delicatissima*, *cafeiformis*), *Ankistrodesmus falcatus*, *Chaetoceros* sp. (*muelleri*, *gracilis*, *muelleri subsalum*), *Clorococcum* sp. , *Chorrella* sp. (*ellipsoidea*, *salina*), *Chromonas* sp. *Chrysosphaera* sp. , *Cricophaera* sp. , *Cryptomonas* sp. , *cyclotella* sp. (*meneghiana*, *cryptica*), *Navicula* sp. *Amphiprora hialina*, *Eustigmatophyte flagellate*, *pleurochysis* sp., *Franceia* sp., *Gleocapsa* sp. , *Gleothamnion* sp. *Hymenomonas* sp. , *Isochrysis* aff. *Galbana*, *Monoraphidium* sp. , *Nannchloropsis* sp. (*salina*), *Navicula* (*saprophil*, *pseudotenelloides*, *biskanterae*, *acceptata*, *saprophila*, *pseudotelloides*), *Nephrochloris* sp. , *Nitzschia* sp. (*pusilla monoensis*, *elliptica*, *alexandrina*, *quadrangula*, *pusilla monoensis*, *inconspicua*, *microcephala*, *frustulum*, *hantzchianna*, *intermedia frustulum*, *communis*), o *chromonas* sp. , *Oocystis* SP. (*pusilla*), *Oscillatoria* sp. (*subborevis limnetica*), *Phaeodactylum tricornutum*, *platymonas* sp. , *pleurochrysis* sp. (*dentate*), *prymnesiophyte* sp. , *Pseudoanabaena* sp. , *Pyraminonas* sp. , *Stichococcus* sp. , *Synechococcus* sp., *tetraselmis suecica*, *Thalassiosira weissflogii*, *Nitzschia* sp. , asi como sus mutantes y/o linajes modificados genéticamente capaces de acumular lípidos en su biomasa.

7. El proceso para la producción de biodiesel y/o fueloil, de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que los derivados de la caña azúcar son bagazo de caña de azúcar hidrolizado concentrado y descontaminado (BHCD), caldo , melaza, azúcar morena y/o refinada.

8. El proceso para la producción de biodiesel y/o fueloil, de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por el hecho de que el bagazo de caña de azúcar sufre un tratamiento previo para alterar el tamaño y la estructura de la fibras lignocelulósicas, micro y macroscópicamente, y alterar la composición química y estructura submicroscopica de la misma antes de ser hidrolizado, dicho tratamiento previo es efectuado por medios físicos, fisicoquímicos, químicos, biológicos o sus combinaciones, preferentemente por medio de trituración mecánica o molienda, y es enseguida hidrolizado por medios químicos o enzimáticos.

9. El proceso para la producción de biodiesel y/o fueloil, de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por el hecho de que el bagazo de caña de azúcar previamente tratado seco y con partículas que tienen un tamaño entre 0,1 a 0,8 mm, luego es hidrolizado a 125 °C durante un periodo de 20 min, utilizándose para cada kg de materia 120 gramos de ácido sulfúrico

concentrado, con una relación sólido/líquido de 1:10, y entonces el hidrolizado es concentrado y descontaminado.

10. El proceso para la producción de biodiesel y/o fueloil, de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, caracterizado por el paso de preparar un inóculo de la cepa *Rhodosporidiun toruloides* en medio YM (Yeast Medium) sólido, dicha cepa es sometida al crecimiento en estufa a 30 °C durante 5 días e incubada por un periodo de 72 horas, dicho medio YM está compuesto por glucosa (10 g/l), peptona (5,0 g/l), extracto de levadura (3,0 g/l), extracto de malta (3,0 g/l), Agar (20g/l) y con Ph de 5,0.

11. El proceso para la producción de biodiesel y/o fueloil, de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por el paso de producir biomasa microbiana oleaginosa en un biorreactor dotado con agitación mecánica, durante un tiempo entre 24 horas a 150 horas, en una relación carbono/nitrógeno que varía entre 0,5 a 500, con un pH que varía entre 2,5 a 8,5 y una temperatura en el rango de 10 a 50 °C, el medio de cultivo es aireado con un volumen de aire en el rango de 0,1 a 5 v/v/min (volumen de aire por volumen de medio por minuto).

12. El proceso para la producción de biodiesel y/o fueloil, de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque comprende:

- preparar un medio de preinóculo que comprende 10 g/l de glucosa, 5 g/l de peptona, 3 g/l de extracto de levadura y 3 g/l de extracto de malta;
- preparar un medio de adaptación que comprende 10 g/l de melaza de caña de azúcar, 5 g/l de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar concentrado y descontaminado, 5 g/l de glicerol 5 g/l de extracto de levadura;

Y

- Preparar un medio de propagación que comprende 40 g/l de mezcla de caña de azúcar, 30 g/l de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar concentrado y descontaminado, 30 g/l de glicerol, 5 g/l de extracto de levadura, 2,5 g/l de urea y 0,5 ml/l de antiespumante, todos estos medios son desarrollados en un pH de 0,5.

13. El proceso para la producción de biodiesel y/o fueloil, de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por el hecho de que la etapa de producción de biomasa alga comprenda:

- adaptar la microalga en el caldo residual de biomasa microbiana oleaginosa, en cultivos incubados por un periodo de 15 días mantenidos a una temperatura de 25°C (-/+ 2°C), agitación de 110 rpm, 1500 Lux de intensidad de irradiación luminosa por periodos de 12 horas alternados con 12 horas en lo oscuro, la biomasa alga es formada, filtrada, lavada con agua destilada y secada durante 24 horas en una estufa a 100°C;
- preparar el inóculo para el cultivo de microalga en el caldo residual de biomasa microbiana oleaginosa, o en una mezcla de caldo + agua, la concentración inicial de microalga se adapta a valores mínimos en el orden de 0,2 g/l: y

- activar por medio del cultivo activo (inóculo), los fotobiorreactores contenidos en el caldo residual de biomasa microbiana oleaginosa, los cuales son provistos con agitación y aeración mediante un flujo de aire atmosférico de 1 v/v/min (volumen de aire por volumen de medio por minuto), con temperatura controlada en el rango de 30°C (-/+ 2 °C), dichos fotobiorreactores poseen una iluminancia de cerca de 1500 Lux, por un tiempo de cultivo de 15 días.
- inyectar dióxido de carbono residual de la etapa de producción de biomasa microbiana oleaginosa en los fotobiorreactores, los cuales son burbujeados para alcanzar una concentración en forma disuelta en el medio de orden de 0,1 a 30%; y
- separar o recolectar la biomasa algar producida por centrifugación y/o filtración.

14. El proceso para la producción de biodiesel y/o fueloil, de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por el hecho de que las biomasa de levadura oleaginosa y algar pasan por un proceso de rompimiento celular para facilitar la extracción de sus óleos (lípidos) en un extractor tipo Soxhlet y por licuefacción directa termopresurizada.

15. El proceso para la producción de biodiesel y/o fueloil, de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por el hecho de que los lípidos extraídos de las biomasa oleaginosas microbiana y algar son transesterificados para obtener el biodiesel según un proceso en el cual el glicerol residual es recirculado para alimentar el biorreactor de producción de biomasa microbiana oleaginosa.

16. El proceso para la producción de biodiesel y/o fueloil, de acuerdo con la reivindicación 2 o 14, caracterizado por el hecho de que los lípidos extraídos de las biomasa oleaginosas microbiana y algar son utilizados directamente como combustibles para la generación de calor y/o vapor, o como adyuvantes del petróleo bruto o sus fracciones pesadas provenientes de la refinación.

RESUMEN

“PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL Y/O FUELOIL”

La presente invención trata de un proceso para la producción de biodiesel y/o a partir de biomasa microbiana oleaginosa y/o algar y/o de derivados y residuos de la caña de azúcar. Los productos objeto de la presente invención son adecuados para el uso directo en motores y la generación de energía o vapor.

El proceso integrado según la presente invención comprende la utilización, como materia prima, biomasa microbiana oleaginosa obtenida a partir de derivados y residuos de la caña de azúcar, la cual es integrada con biomasa algar y/o con glicerol y son procesados a través de etapas de producción de biomasa microbiana oleaginosa de levaduras y/o hongos filamentosos, etapas de producción simultanea de biomasa algar por el aprovechamiento integral de los residuos, CO₂ y caldo residual de la referida producción de biomasa microbiana, así como etapas de extracción y transesterificación de los lípidos contenidos biomasa, con reutilización del glicerol residual producido. El proceso descrito se trata de tecnología innovadora, ecológicamente sustentable, que no genera ningún tipo de residuo, proporcionando aun la ventaja de liberar importantes volúmenes de oxígeno en la atmosférica.