

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
8 de enero de 2015 (08.01.2015)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2015/001141 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12P 7/64 (2006.01) C12R 1/38 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2013/070454
- (22) Fecha de presentación internacional:
2 de julio de 2013 (02.07.2013)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (71) Solicitante: REPSOL, S.A. [ES/ES]; Méndez Álvaro 44, E-28045 Madrid (ES).
- (72) Inventores: ESPÍ GUZMÁN, Enrique; Centro de Tecnología Repsol, Crta. Extremadura (A-5) Km 18, E-28935 Móstoles (ES). ADRIO FONDEVILA, José Luis; Neol Biosolutions, S.a, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Avenida de la Innovación, 1, Edif. BIC, E- 18016 Granada (ES). CAMPOY GARCÍA, Sonia; Neol Biosolutions, S.a, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Avenida de la Innovación, 1, Edif. BIC, E- 18016 Granada (ES). LARA CAMBIL, Armando; Neol Biosolutions, S.a, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Avenida de la Innovación, 1, Edif. BIC, E- 18016 Granada (ES). VELASCO ÁLVAREZ, Javier; Neol Biosolutions, S.a, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Avenida de la Innovación, 1, Edif. BIC, E- 18016 Granada (ES).
- (74) Mandatario: ARIAS SANZ, Juan; ABG Patentes, S.L, Avenida de Burgos 16D, Edificio Euromor, E-28036 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:
- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
 - con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR BIOFUEL PRODUCTION USING PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM

(54) Título : COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES UTILIZANDO PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM

(57) Abstract: The invention relates to a microorganism of *Pseudomonas brassicacearum* strain CECT 8162 or a mutant strain of same, which maintains the ability to accumulate up to at least 20 % of its dry weight in the form of lipids. The invention also relates to a method for producing a microbial biomass of said strain that is rich in triglycerides, and to methods for producing a lipid composition from the microbial biomass and for producing paraffins or biodiesel from said lipids.

(57) Resumen: La invención se refiere a un microorganismo de la cepa *Pseudomonas brassicacearum* CECT 8162, o a una cepa mutante de la misma que mantiene la capacidad de acumular lípidos hasta al menos un 20% del peso seco. La invención se refiere así mismo a un método para obtener una biomasa microbiana de dicha cepa rica en triglicéridos así como a métodos para obtener una composición lipídica a partir de dicha biomasa microbiana y para obtener parafinas o biodiesel a partir de dichos lípidos.



WO 2015/001141 A1

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se relaciona con un microorganismo capaz de acumular triglicéridos hasta al menos un 20% del peso seco. La presente invención también se relaciona con procedimientos y usos de dicho microorganismo para obtener biomasa, extraer lípidos y obtener parafinas.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La producción de lípidos a partir de microorganismos ha sido, desde hace tiempo, objeto de investigación. Algunos hongos, levaduras y algas poseen la capacidad de acumular, intracelularmente, hasta más de un 70% de su biomasa en forma de lípidos
15 durante períodos de stress metabólico, por lo que, de forma similar a lo que sucede con las semillas vegetales, se les denomina microorganismos oleaginosos.

Aunque la mayoría de los procariontes acumulan polihidroxicarboxilatos (PHAs) como material de reserva, cepas pertenecientes al grupo de los actinomicetos
20 (*Streptomyces*, *Nocardia*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, o *Mycobacterium*), y muy pocas especies de otros género como, por ejemplo, *Mangroveibacter* o *Pseudomonas*, son capaces de acumular más del 20% de su peso seco en forma de lípidos. Al igual que sucede en eucariotas, la acumulación de triglicéridos se produce cuando una fuente de carbono se encuentra en exceso y la fuente de nitrógeno limita el crecimiento. Bajo
25 estas condiciones de crecimiento, las células utilizan la fuente de carbono para la síntesis de lípidos neutros.

Las mezclas de azúcares obtenidos a partir de materiales lignocelulósicos, especialmente los residuos procedentes de los sectores agrícola, forestal e industrial,
30 son las materias primas con mayor potencial para la producción de biocarburantes en el futuro ya que, no sólo no tienen valor económico en el contexto en el que se generan, sino que suelen provocar problemas ambientales durante su eliminación.

Sin embargo, la producción de biocombustibles a partir de estas materias primas
35 presenta dos grandes retos que son necesarios solventar a la hora de lograr un

proceso económicamente competitivo. Por una parte se requiere la capacidad para crecer en presencia de los compuestos tóxicos generados durante la etapa de pretratamiento de la biomasa, y por otra, la completa utilización de las hexosas y, sobre todo, las pentosas (mayoritariamente xilosa) presentes en los hidrolizados.

5

La mayoría de los microorganismos eucariotas oleaginosos, incluyendo hongos filamentosos, levaduras y algunas microalgas son capaces de metabolizar D-xilosa de forma natural. Sin embargo, esta propiedad está ausente en la mayoría de las escasas especies procariontas oleaginosas conocidas, por lo que es necesario clonar y expresar genes exógenos implicados en el metabolismo de esta pentosa, tal y como se ha realizado en *Cupriavidus* o *Rhodococcus opacus* como se describe en las publicaciones EP2407531 y WO2010147642, respectivamente.

La obtención de estos biocombustibles se realiza con aceites vegetales y grasas animales, o mezclas de éstos con las fracciones destiladas diésel procedentes del petróleo (EP2141217, WO2010000934, WO2008151149 y US20090047721), o incluso con los ácidos grasos presentes en lípidos de origen microbiano (WO2007068797, EP1682466, EP1795576, EP1681337, WO2010000934, EP1640437).

Por lo tanto, la obtención de cepas capaces de crecer y metabolizar diferentes fuentes de carbono, incluyendo todos los azúcares presentes en hidrolizados de biomasa lignocelulósica, y que sean capaces de producir y acumular grandes cantidades de lípidos, no sólo puede suponer una materia prima alternativa económicamente viable, sino que también permitiría lograr los criterios de sostenibilidad requeridos a los biocombustibles por las directivas 2009/28/CE y 2009/30/CE.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han aislado un microorganismo de la cepa *Pseudomonas brassicacearum* CECT 8162, que tiene la capacidad de metabolizar diferentes fuentes de carbono incluyendo, sin limitación, glucosa, glicerina cruda o los azúcares presentes en hidrolizados de biomasa lignocelulósica, y además de acumular lípidos hasta al menos un 20% del peso seco.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un microorganismo de la cepa *Pseudomonas brassicacearum* CECT 8162, o de una cepa mutante de la misma que mantiene la capacidad de acumular lípidos hasta al menos un 20% del peso seco.

5

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener una biomasa microbiana rica en triglicéridos, que comprende

i) cultivar un microorganismo según el primer aspecto de la invención en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y al menos una fuente de nitrógeno, en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo, y

ii) separar la biomasa microbiana del medio de cultivo, en donde la proporción C:N en el medio de cultivo es elevada.

15 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para extraer los lípidos de la biomasa microbiana según el aspecto anterior, que comprende un método de extracción mecánica o un método de extracción sólido-líquido.

20 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener parafinas a partir de los lípidos obtenidos en el procedimiento según el aspecto anterior, que comprende

i) refinar dichos lípidos,

ii) convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) en parafinas.

25

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo según la invención para obtener una biomasa microbiana rica en triglicéridos según el primer procedimiento de la invención.

30 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo según la invención para extraer los lípidos de la biomasa microbiana según el segundo procedimiento de la invención.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo según la invención para obtener parafinas según el tercer procedimiento de la invención.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Microorganismo de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un microorganismo de la
10 cepa *Pseudomonas brassicacearum* CECT 8162, o de una cepa mutante de la misma que mantiene la capacidad de acumular lípidos hasta al menos un 20% del peso seco, en adelante "microorganismo de la invención".

El término "microorganismo" o "microbio", tal y como se utiliza en la presente
15 invención, se refiere a un organismo microscópico con capacidad de acumular lípidos intracelularmente, que puede ser unicelular o multicelular. El particular, el microorganismo de la invención es una bacteria de la especie *Pseudomonas brassicacearum*, en concreto, la cepa CECT 8162.

20 La cepa CECT 8162 de *P. brassicacearum* tiene la capacidad de metabolizar diferentes fuentes de carbono incluyendo, sin limitación, glucosa, glicerina cruda o los azúcares presentes en hidrolizados de biomasa lignocelulósica, que se encuentra en exceso en relación con la fuente de nitrógeno presente en el mismo medio.

25 El microorganismo de la invención también se refiere a una cepa mutante de la misma que mantiene la capacidad de acumular lípidos hasta al menos un 20% del peso seco.

El término "cepa", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una variante genética o subtipo de un organismo determinado. El término "cepa mutante",
30 tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una cepa resultante de la mutación de una cepa de un organismo determinado que mantiene la capacidad de acumular lípidos hasta al menos un 20% de su peso seco. En una realización particular, la cepa mutante de la cepa mutante de la cepa CECT 8162 de *P. brassicacearum* CECT mantiene la capacidad de acumular lípidos hasta al menos un
35 30% de peso seco, un 40% del peso seco, 50% del peso seco, al menos un 60% del

peso seco, al menos un 70% del peso seco, al menos un 80% de peso seco o al menos un 90% del peso seco.

Como es conocido por el experto en la materia, la capacidad para acumular lípidos se puede analizar mediante numerosos métodos que están disponibles en la técnica. Estos métodos incluyen, sin limitación, la determinación del contenido total de lípidos por métodos de extracción con disolventes orgánicos (por ejemplo Soxhlet, Goldfish, Mojonnier), o también puede cuantificarse por métodos de extracción que no incluyen disolventes (por ejemplo, Babcock, Gerber) y por métodos instrumentales que se basan en propiedades físicas o químicas de los lípidos (por ejemplo, infrarrojo, densidad y absorción de rayos X).

El método de Soxhlet consiste en una extracción semicontinua con un disolvente orgánico. En este método el disolvente se calienta, se volatiliza y condensa goteando sobre la muestra la cual queda sumergida en el disolvente. Posteriormente éste es sifoneado al matraz de calentamiento para empezar de nuevo el proceso. El contenido de lípidos se cuantifica por diferencia de peso.

El método de Goldfish consiste en una extracción continua con un disolvente orgánico. Éste se calienta, volatiliza para posteriormente condensarse sobre la muestra. El disolvente gotea continuamente a través de la muestra para extraer los lípidos. El contenido de grasa se cuantifica por diferencia de peso entre la muestra o la grasa removida.

El método por lotes hace uso de la solubilidad intrínseca de los lípidos; es claro que un compuesto no polar es soluble en un disolvente no polar. La extracción se realiza en frío para evitar el daño del material lipídico y por lotes para incrementar la eficiencia.

El método de Bligh-Dyer, así como su modificación por Hanson y Olley, proporciona un método rápido para la extracción de lípidos de tejidos y productos alimenticios que contienen una cantidad significativa de agua. El método se basa en la homogenización de la muestra con cloroformo, metanol y agua en proporciones tales que se forme una sola fase miscible con el agua de la muestra. Al añadir alícuotas de cloroformo y agua se logra la separación de fases. El material lipídico se encuentra en la fase no acuosa, mientras que el material no lipídico se encuentra en la fase acuosa.

De acuerdo con el método de Röse-Gottlieb método, la separación de los lípidos se logra por amoníaco y etanol con un posterior efecto de deshidratación sobre los fosfolípidos. Los lípidos se disuelven en éter recién destilado y se añade algo de petróleo para que se separen algunos compuestos no lipídicos que se puedan encontrar en la fase etérea. Esta mezcla es completamente inmiscible en agua de manera que mediante una extracción adecuada es simple dejar el componente lipídico en la fase etérea.

10 En una realización particular, la cepa mutante de la cepa CECT 8162 de *P. brassicacearum* mantiene la capacidad de acumular lípidos hasta al menos un 20% del peso seco, al menos un 30% del peso seco, al menos un 40% del peso seco, al menos un 50% del peso seco, al menos un 60% del peso seco, al menos un 70% del peso seco, o al menos un 90% del peso seco.

15

Procedimiento para obtener una biomasa microbiana rica en triglicéridos

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener una biomasa microbiana rica en triglicéridos, en adelante "primer procedimiento de la
20 invención", que comprende

- i) cultivar el microorganismo de la invención en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y al menos una fuente de nitrógeno, en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo, y
- 25 ii) separar la biomasa microbiana del medio de cultivo, en donde la proporción C:N en el medio de cultivo es elevada.

El término "biomasa microbiana", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere al material biológico de organismos vivos o recientemente vivos, en particular del microorganismo de la invención, y a la materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía. Como una fuente de energía renovable, la biomasa puede ser utilizada directa o indirectamente, previa conversión en otro tipo de producto tal como biocombustible. En el caso particular de la presente invención, la biomasa microbiana es rica en triglicéridos. El
35 término "biomasa microbiana rica en triglicéridos", tal y como se utiliza en la presente

invención, se refiere a una biomasa microbiana con un contenido de triglicéridos de al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70% o al menos el 80% de su peso total.

- 5 En una primera etapa, el primer procedimiento de la invención comprende cultivar el microorganismo de la invención en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y al menos una fuente de nitrógeno, en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo.
- 10 El término “cultivar”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere al procedimiento de sembrar, mantener y hacer que se desarrollen microorganismos sobre medios de cultivo adecuados.

- El término “medio de cultivo”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a
- 15 un medio líquido, semisólido o sólido que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH, temperatura y oxigenación, el crecimiento de microorganismos. En una forma de realización particular, el medio de cultivo es un medio líquido. Medios de cultivo adecuados para cultivar microorganismos son
- 20 ampliamente conocidos en la materia, como por ejemplo Maniatis et al. (1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY) y Madigan & Martinko (2005, Brock Biology of Microorganisms, 11th ed.). Entre otros nutrientes, el medio de cultivo comprende una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno. Ejemplos no limitativos de medios de cultivo adecuados para llevar a cabo el primer procedimiento de la invención incluyen medio TSA, medio M9, medio MEM,
- 25 medio LB, medio TSB.

- En otra realización particular, la fuente de carbono se selecciona del grupo que consiste en glucosa, glicerol, glicerina, melazas, xilosa, arabinosa, manosa, fructosa, acetato, almidones y combinaciones de las mismas. En una realización preferida,
- 30 fuente de carbono es glucosa.

En otra realización particular, la fuente de la fuente de nitrógeno se selecciona del grupo que consiste en extracto de levadura, peptona, líquido macerado de maíz, urea, glutamato sódico, diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico, como sales de amonio y

combinaciones de las mismas. En una realización preferida, la fuente de nitrógeno es una sal de amonio, preferiblemente cloruro de amonio.

En una forma preferida de realización, el medio de cultivo que se usa para obtener la
5 biomasa microbiana de acuerdo a la presente invención es hidrolizado de biomasa.

El término "hidrolizado de biomasa", según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier producto de sacarificación, que contiene los azúcares producidos en el proceso de sacarificación, los restos de biomasa no hidrolizada y las enzimas
10 empleadas para la hidrólisis de dicha biomasa.

El término "sacarificación" o "hidrólisis de la biomasa", según se usa en la presente invención, se refiere a la producción de azúcares fermentables a partir de polisacáridos.

15

El término "azúcar fermentable", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a los oligosacáridos y monosacáridos que pueden ser empleados como fuente de carbono por un microorganismo en el proceso de fermentación para la obtención de productos como etanol.

20

Los términos "biomasa" y "sustrato de biomasa", tal y como se utilizan en la presente invención, hacen referencia a cualquier material apropiado para su uso en reacciones de sacarificación. Dichos términos incluyen pero no están limitados a materiales que comprenden celulosa (por ejemplo, biomasa celulósica, materia prima celulósica y
25 sustrato celulósico), lignina o la combinación de celulosa y lignina. La biomasa puede derivar de plantas, animales o microorganismos y puede incluir, sin estar limitada, a residuos agrícolas, industriales y forestales, desechos agrícolas y municipales y cultivos terrestres y acuáticos con fines energéticos. Ejemplos de sustratos de biomasa incluyen pero no están limitados a madera, pasta de madera, pasta de papel,
30 fibra de maíz, grano de maíz, mazorcas de maíz, residuos de cosechas como hojas de maíz, rastrojo de maíz, pastos, trigo, paja de trigo, cebada, paja de cebada, heno, arroz, paja de arroz, mijo, residuos de papel, papel, residuos de procesamiento de pulpa, leñosas o herbáceas, pulpa de fruta o verdura, productos de destilado del grano, hierbas, cáscaras de arroz, algodón, cáñamo, lino, sisal, bagazo de caña,
35 sorgo, soja, mijo, componentes obtenidos de la molienda de granos, árboles, ramas,

raíces, hojas, virutas de madera, aserrín, arbustos y matas, verduras, frutas y flores y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la biomasa comprende pero no está limitada a plantas cultivadas (por ejemplo, hierbas, incluyendo gramíneas C4, tales como pasto varilla, hierba espinal, hierba de centeno, *Miscanthus*,
5 hierba cinta o combinaciones de las mismas), residuos de procesamiento del azúcar, por ejemplo pero sin limitarse a, bagazo [por ejemplo, bagazo de caña de azúcar, pulpa de remolacha (por ejemplo remolacha azucarera), o una combinación de las mismas], residuos agrícolas (por ejemplo rastrojo de soja, rastrojo de maíz, fibra de maíz, paja de arroz, azúcar de caña de paja, arroz, cáscaras de arroz, paja de cebada,
10 mazorcas de maíz, paja de trigo, paja de canola, paja de avena, cáscaras de avena, fibra de maíz, cáñamo, lino, sisal, algodón o cualquier combinación de los mismos), pulpa de fruta, pulpa de vegetales, productos de destilado del grano, biomasa forestal (por ejemplo madera, pasta de madera, fibra, fibras de pasta de madera reciclada, serrín, madera dura, tal y como madera de álamo, madera blanda o una combinación
15 de las mismas).

En algunas formas de realización, la biomasa comprende material de desecho celulósico y/o residuos forestales incluyendo pero sin estar limitada a, papel y residuos de procesamiento de pasta de papel, residuos municipales de papel, papel de
20 periódico, cartón y similares. En algunas realizaciones, la biomasa comprende una especie de fibra mientras que en otras realizaciones alternativas, la biomasa comprende una mezcla de fibras que se originan a partir de diferentes biomásas. En algunas realizaciones, la biomasa puede comprender también plantas transgénicas que expresan ligninasa y/o celulasas (ver por ejemplo, el documento US2008/0104724
25 A1).

El término "biomasa" incluye cualquier material biológico vivo o muerto que contiene polisacáridos como sustratos incluyendo pero sin estar limitado a celulosa, almidón, otras formas de polímeros de carbohidratos de cadena larga y combinaciones de los
30 mismos. Puede o no estar formado completamente a partir de glucosa o xilosa, y opcionalmente, puede contener otros monómeros de pentosas o hexosas. La xilosa es una aldopentosa que contiene cinco átomos de carbono y un grupo aldehído. Es el azúcar precursor de la hemicelulosa y es a menudo, el componente principal de la biomasa. En algunas realizaciones, el sustrato se pone en suspensión antes del
35 pretratamiento. En algunas realizaciones, la consistencia de la suspensión es de entre

aproximadamente 2% y aproximadamente 30% y más típicamente entre aproximadamente 4% y aproximadamente 15%. En algunas realizaciones la suspensión se lava o se trata con ácido antes del pretratamiento. En algunas formas de realización, la suspensión se deshidrata mediante cualquier método adecuado para reducir el consumo de agua y de productos químicos antes del pretratamiento. Ejemplos de dispositivos de deshidratación incluyen, pero no se limitan a prensas de tornillo a presión (véase por ejemplo, el documento WO 2010/022511), filtros presurizados y extrusoras.

10 Un sustrato de biomasa está “pretratado” cuando ha sido sometido a procedimientos físicos y/o químicos para facilitar la sacarificación. En algunas realizaciones, el sustrato de biomasa es “pretratado” o “tratado” para aumentar la susceptibilidad de dicha biomasa a la hidrólisis de la celulosa mediante el empleo de métodos conocidos en el estado de la técnica (Cuervo *et al.*, Biotecnología, 2008, 13:3), tales como métodos de pretratamiento físico-químicos (por ejemplo, tratamiento con amonio, pretratamiento con ácido diluido, pretratamiento con álcalis diluida, exposición a disolventes, explosión de vapor, molienda, extrusión), métodos de pretratamiento biológico (por ejemplo, la aplicación de microorganismos lignina-solubilizantes) y combinaciones de los mismos.

20

La molienda consiste en un proceso de trituración de la materia vegetal hasta su reducción a partículas de diferentes tamaños que pueden ser separadas por procedimientos mecánicos.

25 La extrusión es un procedimiento mediante el cual el material vegetal es forzado a fluir bajo una o más de una variedad de condiciones de mezclado, calentamiento y cizallamiento, a través de una boquilla diseñada para dar forma o expandir los ingredientes. Puede realizarse en frío donde el material se extruye sin expansión o en caliente o en caliente, donde las macromoléculas de los componentes pierden su estructura nativa discontinua y se forma una masa continua y viscosa que dextriniza y gelatiniza el almidón, se desnaturalizan las proteínas, se inactivan las enzimas responsables de posibles deterioros, se destruyen algunos compuestos no nutricionales y se destruye al carga microbiana.

30

La hidrólisis ácida consiste en tratar el material vegetal con ácidos como ácido sulfúrico o ácido clorhídrico empleando altas temperaturas. Mediante este proceso se favorece la hidrólisis de la celulosa pero requiere una neutralización del pH al finalizar la hidrólisis para permitir el crecimiento posterior de microorganismos.

5

El tratamiento con álcalis consiste en la adición de bases diluidas a la biomasa vegetal. La eficiencia de este procedimiento depende del contenido de lignina de los materiales. El hidróxido de sodio diluido produce un hinchamiento, permitiendo un incremento en el área de superficie interna reduciendo el grado de polimerización y
10 cristalinidad de la celulosa, causando la separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos.

El tratamiento con disolventes orgánicos consiste en utilizar solventes como el metanol, etanol o acetona para la ruptura de los enlaces de la lignina y la celulosa. La
15 remoción de los solventes del sistema es necesaria, ya que inhiben el crecimiento de los organismos.

El tratamiento con líquidos iónicos (por ejemplo, con una disolución de cloruro sódico) favorece la degradación de la celulosa debido a que los átomos de hidrógeno y
20 oxígeno que forman parte de la misma interactúan por separado con el solvente de manera que se produce la ruptura de los enlaces puentes de hidrógeno entre las cadenas de celulosa.

El tratamiento con explosión de vapor consiste en tratar la biomasa con vapor saturado
25 a una temperatura de 160-260°C (0,69-4,83 MPa) durante un cierto tiempo que dependerá del tipo de material vegetal de origen.

El tratamiento con microorganismos lignina-solubilizantes consiste en tratar a la biomasa con microorganismos que producen enzimas con capacidad de degradar el
30 material lignocelulósico como por ejemplo, *Trichoderma reesei*, *Fusarium oxysporium*, *Piptopus betulinus*, *Penicillium echinalatum*, *Penicillium purpurogenum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Anaeromyces sp.*, *Caecomyces sp.*, *Cyllumcyces sp.*, *Neocallimastix sp.*, *Orpinomyces sp.*, *Piromyces sp.*, *Sporotrichum thermophile*, *Scytalidium thermophilu*, *Thermonospora cubata*, *Rhodosporillum rubrum*,

Cellulomonas fimi, *Clostridium stercorarium*, *Bacillus polymyxa*, *Pyrococcus furiosus*, *Acidothermus cellulotycus*, *Saccharophagus degradans*, etc.

El término "material lignocelulósico", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una composición que comprende tanto la lignina y celulosa. En algunas realizaciones, el material lignocelulósico también puede comprender almidón. "Lignina" es un material polifenólico. Las ligninas pueden ser altamente ramificadas y puede estar también reticuladas. Las ligninas pueden tener una variación significativa estructural que depende, al menos en parte, en la fuente de la planta en cuestión. Los materiales lignocelulósicos incluyen una variedad de plantas y materiales vegetales, tales como, sin limitación, los lodos de fabricación de papel, la madera, y materiales relacionados con la madera, por ejemplo, polvo de sierra, o tableros de partículas, hojas o árboles como los álamos, las hierbas, como el mijo enteros; sembrar maíz, sorgo, pasto Sudán, recortes de césped, cáscara de arroz, bagazo (por ejemplo, la caña de azúcar bagazo), yute, cáñamo, lino, bambú, sisal, abacá, heno, paja, mazorcas de maíz, maíz y rastrojo de sorgo, y el pelo de coco.

Es necesario someter al cultivo de microorganismos a un estrés metabólico para que produzcan y acumulen intracelularmente grandes cantidades de lípidos. El estrés metabólico se puede inducir por un exceso de fuente de carbono en relación con la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo. La acumulación de triglicéridos se produce cuando una fuente de carbono se encuentra en exceso y la fuente de nitrógeno limita el crecimiento. Bajo estas condiciones de crecimiento, las células utilizan la fuente de carbono para la síntesis de lípidos neutros.

Así, el procedimiento para obtener una biomasa microbiana rica en triglicéridos emplea un medio de cultivo en donde la proporción C:N es elevada. El término "elevada", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una proporción de C:N donde hay un exceso de C con respecto a N. En una realización particular, la proporción de C:N es de al menos 10:1 (peso/peso), al menos 15:1 (peso/peso), al menos 20:1 (peso/peso), al menos 30:1 (peso/peso), al menos 40:1 (peso/peso), al menos 50:1 (peso/peso), al menos 60:1 (peso/peso), al menos 70:1 (peso/peso), al menos 80:1 (peso/peso), al menos 90:1 (peso/peso), o al menos 100:1 (peso/peso).

Los métodos para el cultivo de microorganismos son estándares en la técnica y son ampliamente conocidos por el experto en la materia. El cultivo puede llevarse a cabo en matraces o biorreactores hasta alcanzar un contenido en triglicéridos elevado, típicamente igual o superior al 20% en peso seco. La duración del cultivo es variable, aunque típicamente el cultivo se realiza durante de 2 a 5 días.

El término "condiciones adecuadas para el crecimiento del microorganismo de la invención", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a condiciones que soportan el crecimiento del microorganismo de la invención. Tales condiciones pueden incluir pH, nutrientes, temperatura, humedad, oxigenación, ambiente y otros factores.

En una realización particular, las condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo de la etapa i) comprenden

- una temperatura en un rango entre 18 °C y 37 °C, preferentemente entre 23 °C y 32 °C, más preferentemente entre 28 °C y 30°C;
- una concentración de oxígeno disuelto de al menos el 20%, y/o
- agitación constante.

Una vez alcanzada la máxima cantidad intracelular de triglicéridos, en una segunda etapa, el primer procedimiento de la invención comprende separar la biomasa microbiana del medio de cultivo. Las células se recogen mediante alguno de los procedimientos habitualmente utilizados para este fin. En una realización particular, la segunda etapa del primer procedimiento de la invención se realiza mediante un método seleccionado del grupo que consiste en filtración, microfiltración, centrifugación, presión, decantamiento y combinaciones de los mismos.

En una realización particular, el procedimiento de la invención comprende además secar la biomasa microbiana obtenida en la segunda etapa. En una realización preferida, dicha etapa adicional de secado se realiza a una temperatura entre 50 °C y 70 °C. En una realización más preferida, dicha etapa adicional de secado se realiza a una temperatura de 60 °C.

Biomasa microbiana

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a la biomasa microbiana rica en triglicéridos obtenible según el primer procedimiento de la invención, en adelante “biomasa microbiana de la invención”. El término “biomasa microbiana” se ha descrito con anterioridad y es de aplicación en el presente aspecto.

5

La biomasa microbiana generada de acuerdo al primer método de la invención comprende no solo los microorganismos sino también todos aquellos componentes del cultivo generados por los microorganismos o que se han incorporado a los microorganismos a partir del cultivo durante su crecimiento y proliferación, tales como
10 ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos o lípidos. La biomasa microbiana de acuerdo a la invención comprende microorganismos de la cepa *Pseudomonas brassicacearum* CECT 8162 o una cepa mutante de la misma que mantiene la capacidad de acumular lípidos hasta al menos un 20% del peso seco. En una realización particular, la biomasa rica en triglicéridos tiene un contenido en triglicéridos al menos el 50% del peso seco,
15 al menos el 60% del peso seco, al menos el 70% del peso seco, o al menos el 80% del peso seco.

En otra realización particular, la biomasa rica en triglicéridos contiene una cantidad del microorganismo de la invención de al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el
20 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o superior respecto al resto de microorganismos presentes en el cultivo.

Procedimiento para extraer los lípidos de la biomasa microbiana

25 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para extraer los lípidos de la biomasa microbiana de la invención, en adelante “segundo procedimiento de la invención”, que comprende un método de extracción mecánica o un método de extracción sólido-líquido.

30 El término “biomasa microbiana” se ha descrito en detalle en el contexto del primer procedimiento de la invención, y su definición y sus detalles se aplican igualmente al segundo procedimiento de la invención

Los métodos para extraer y determinar la cantidad de lípidos empleados en relación con el microorganismo de la invención se pueden aplicar igualmente en relación con el segundo método de la invención.

5 Los microorganismos que acumulan lípidos y que forman parte de la biomasa microbiana de acuerdo la presente invención se puede lisar para producir un lisado, que se usa como material de partida para la extracción de lípidos. La etapa de lisis se puede llevar a cabo usando cualquier método conocido para un experto, como por ejemplo, lisis por calor, lisis en medio básico, lisis en medio ácido, lisis enzimática
10 usando enzimas tales como proteasas o enzimas que degradan polisacáridos (amilasas), lisis mediante ultrasonidos, lisis mecánica, lisis mediante choque osmótico, Estos métodos se pueden llevar a cabo de forma individual o combinada y, en caso de uso combinado, se pueden llevar a cabo de forma simultánea o secuencial. El grado de rotura celular se puede determinar mediante análisis microscópico.

15

De esta manera, en una realización particular, el método de extracción mecánica comprende el uso de prensa de tornillo, prensa francesa o molino de bolas.

Preferiblemente, la etapa de lisis requiere de la rotura de al menos en torno a un 70%
20 de las células, al menos en torno a un 80% de las células, al menos en torno a un 90% de las células o, preferiblemente, al menos en torno a un 100% de las células.

Métodos adecuados para separar lípidos de los lisados celulares incluyen cualquier método de extracción mecánico químico y, dentro de estos, cualquier método de
25 extracción sólido-líquido. Métodos adecuados incluyen, la extracción en presencia de solventes orgánicos, que permite la expresión de lípidos y derivados lipídicos tales como aldehídos y alcoholes de ácidos grasos (Frenz et al. 1989, Enzyme Microb. Technol., 11:717), licuefacción (Sawayama et al. 1999, Biomass and Bioenergy 17:33-39 and Inoue et al. 1993, Biomass Bioenergy 6(4):269-274); licuefacción en aceite
30 (Minowa et al. 1995, Fuel 74(12):1735-1738), extracción con CO₂ supercrítico.

Por otra parte, la extracción de los lípidos de la biomasa microbiana también se puede llevar a cabo aprovechando diferencias de solubilidad de los mismos en un determinado disolvente. En el caso favorable de una mezcla de sólidos en la cual uno
35 de los compuestos es soluble en un determinado disolvente (normalmente un

disolvente orgánico), mientras que los otros son insolubles, se puede realizar una extracción consistente en añadir este disolvente a la mezcla contenida en un vaso de precipitados, un matraz o una cápsula de porcelana, en frío o en caliente, agitar o triturar con ayuda de una varilla de vidrio y separar por filtración la disolución que
5 contiene el producto extraído y la fracción insoluble. La extracción sólido-líquido suele ser mucho más eficiente cuando se hace de manera continua con el disolvente de extracción caliente en un sistema cerrado, utilizando una metodología similar a la explicada anteriormente, basada en la maceración con disolvente orgánico de la mezcla sólida a extraer, previa al vaporizado en un matraz y condensado en un
10 refrigerante. El paso del disolvente orgánico con parte del producto extraído al matraz inicial, permite que el mismo disolvente orgánico vuelva a ser vaporizado, repitiendo un nuevo ciclo de extracción, mientras que el producto extraído, no volátil, se concentra en el matraz.

15 Así, en otra realización particular, el método de extracción sólido-líquido se realiza usando un disolvente orgánico inmiscible en agua. El término "disolvente orgánico", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una sustancia que disuelve un soluto cuyas moléculas contienen átomos de carbono. El término "disolvente orgánico inmiscible en agua", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un
20 disolvente orgánico con poca o ninguna capacidad para mezclarse con el agua. Ejemplos no limitativos de disolventes orgánicos inmiscibles en agua incluyen n-hexano, acetona, éter de petróleo y éter-etílico. Así, en una realización preferida, dicho disolvente orgánico inmiscible en agua se selecciona del grupo que consiste en n-hexano, acetona, éter de petróleo, éter-etílico y combinaciones de los mismos. En una
25 realización aún más preferida, dicho disolvente orgánico inmiscible en agua es n-hexano.

La extracción sólido-líquido suele ser mucho más eficiente cuando se hace de manera continua con el disolvente de extracción caliente en un sistema cerrado, utilizando una
30 metodología similar a la comentada para la extracción líquido-líquido continua, basada en la maceración con disolvente orgánico, previamente vaporizado en un matraz y condensado en un refrigerante, de la mezcla sólida a extraer contenida dentro de un cartucho o bolsa de celulosa que se coloca en la cámara de extracción. El paso del disolvente orgánico con parte del producto extraído al matraz inicial, permite que el
35 mismo disolvente orgánico vuelva a ser vaporizado, repitiendo un nuevo ciclo de

extracción, mientras que el producto extraído, no volátil, se va concentrando en el matraz.

La fracción lipídica extraída del biomaterial de acuerdo a la invención puede contener
5 al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%,
99.9% o sustancialmente 100% (en peso) de ácidos grasos y glicéridos, incluyendo
monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos. Métodos para determinar el porcentaje en
peso de los distintos componentes (ácidos grasos y glicéridos) son conocidos del
estado de la técnica e incluyen, sin limitación, cromatografía de gases o electroforesis.

10

Procedimiento para obtener productos de interés industrial a partir de la biomasa rica
en lípidos de acuerdo a la invención

Los lípidos obtenidos a partir de la biomasa microbiana de acuerdo a la presente
15 invención pueden ser procesados químicamente para dar lugar a productos de interés
en la industria. Ejemplos de métodos de modificación química que pueden ser
aplicados a los lípidos de acuerdo a la invención incluyen hidrólisis de los lípidos,
hidroprocesamiento de los lípidos y esterificación de los lípidos. Otras modificaciones
químicas incluyen, sin limitación, epoxidación, oxidación, hidrólisis, sulfatación,
20 sulfonación, etoxilación, propoxilación, amidación y saponificación. La modificación de
los lípidos de acuerdo a la presente invención permite generar productos que pueden
ser modificados adicionalmente para dar lugar a compuestos de interés, tales como
jabones, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, compuestos de
nitrógeno grasos, ésteres metílicos de ácidos grasos y glicerol. Ejemplos de productos
25 oleoquímicos derivados incluyen, pero no se limitan a, nitrilos grasos, ésteres, ácidos
dímeros, compuestos cuaternarios, tensioactivos, alcanolamidas grasos, sulfatos de
alcoholes grasos, resinas, emulsionantes, alcoholes grasos, olefinas, lodos de
perforación, polioles, poliuretanos, poliacrilatos, goma, velas, cosméticos, jabones,
jabones metálicos, ésteres de metilo alfa-sulfonados, sulfatos de alcoholes grasos,
30 etoxilatos de alcoholes grasos, sulfatos de éteres de alcoholes grasos, imidazolinas,
agentes tensioactivos, detergentes, ésteres, compuestos cuaternarios, productos de
ozonólisis, aminas grasas, alcanolamidas grasos, sulfatos de etoxi, monoglicéridos,
diglicéridos, triglicéridos (incluyendo triglicéridos de cadena media), lubricantes, fluidos
hidráulicos, grasas, fluidos dieléctricos, agentes de liberación del molde, fluidos para
35 trabajo de metales, fluidos de transferencia de calor, otros fluidos funcionales,

productos químicos industriales (por ejemplo, productos de limpieza, auxiliares de tratamiento de los textiles, plastificantes, estabilizantes, aditivos), superficie revestimientos, pinturas y lacas, aislamiento del cableado eléctrico, y alcanos superiores.

5

Procedimiento para obtener parafinas a partir de lípidos

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener parafinas, en adelante "tercer procedimiento de la invención", que comprende las etapas de:

10

- i) refinar los lípidos obtenidos en el segundo procedimiento de la invención y
- ii) convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa i) en parafinas.

15 o las etapas de

- i) obtener una preparación enriquecida en lípidos a partir de una biomasa microbiana de acuerdo a la invención,
- ii) refinar los lípidos obtenidos en la etapa ii) y
- iii) convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) en parafinas.

20

El término "parafina", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un grupo de hidrocarburos alcanos de fórmula general C_nH_{2n+2} , donde n es el número de átomos de carbono. La molécula simple de la parafina proviene del metano, CH_4 , un gas a temperatura ambiente; en cambio, los miembros más pesados de la serie, como el octano C_8H_{18} , se presentan como líquidos. Las formas sólidas de parafina, llamadas cera de parafina, provienen de las moléculas más pesadas C_{20} a C_{40} . Ejemplos no limitativos de parafinas incluyen queroseno, diésel, biofuel o biocombustible, cera de parafina, nuyol, aceite de adepsina, albolin, glimol, parafina medicinal, saxol y aceite mineral de USP.

30

El término "biofuel" o "biocombustible", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un combustible que se deriva de la biomasa, tal como residuos animales, de plantas o microbianos. Los biocombustibles incluyen, pero no se limitan a, biodiesel, diésel renovable bioqueroseno, biohidrógeno, biogás, biomasa derivada de

35

dimetilfurano (DMF), y similares. El término "biocombustibles" también se utiliza para referirse a mezclas de combustible que comprenden derivados de la biomasa combustibles, tales como mezclas de alcohol / gasolina (es decir, gasohols).

- 5 En una realización particular del tercer método de la invención, La parafina es un diésel renovable.

En una primera etapa, el tercer procedimiento de la invención comprende refinar los lípidos obtenidos a partir del segundo procedimiento de la invención.

10

El término "refinamiento" o "refino", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere al proceso de purificación de una sustancia química obtenida muchas veces a partir de un recurso natural. Numerosos métodos son conocidos en el estado de la técnica para la refinación de sustancias. Por ejemplo, la refinación de líquidos se logra a menudo a través de la destilación o fraccionamiento. Un gas se puede refinar también de esta manera enfriándolo o comprimiéndolo hasta su licuefacción. Los gases y líquidos también se pueden refinar por extracción con un solvente que disuelva la sustancia de interés o bien las impurezas.

15

- 20 Así, en una realización particular, los lípidos obtenidos en el segundo procedimiento de la invención se refinan mediante al menos un lavado con NaOH a una concentración entre 5% y 15%. El proceso de refinación comprende al menos un lavado con NaOH, al menos dos lavados con NaOH, al menos tres lavados con NaOH, al menos cuatro lavados con NaOH, al menos cinco lavados con NaOH, al menos diez lavados con NaOH o más. En una realización preferida, la concentración de NaOH es de entre 8% y 12%. En una realización más preferida, la concentración de NaOH es de 10%.

25

En una segunda etapa, el procedimiento de la invención comprende convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa i) en parafinas.

30

En una realización particular, la etapa ii) del tercer método de la invención comprende un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en hidrotratamiento o hidroprocesamiento

El experto en la materia entenderá que existen en la técnica numerosos procedimientos para convertir lípidos en parafinas que incluyen, sin limitación, procedimientos de hidrotratamiento o hidroprocesamiento (EP1682466, EP1795576, EP1681337, EP1640437).

5

El término “hidrotratamiento” o “hidroprocesamiento”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a reacciones de hidrogenación, habitualmente catalíticas, que son ampliamente usadas sobre fracciones de petróleo como nafta, keroseno y diesel, así como fracciones de lípidos, bajo presión y temperatura elevadas. En el caso particular de la presente invención, el hidroprocesamiento se efectúa sobre la mezcla de lípidos obtenida del segundo procedimiento de la invención.

El hidroprocesamiento es necesario para eliminar los contaminantes como los metales de azufre, nitrógeno y metales pesados de aceites combustibles. De esta manera, los hidrocarburos oxigenados reemplazan sus átomos de oxígeno por átomos de hidrógeno, y los átomos de oxígeno que salen se combinan con moléculas de hidrógeno formando agua. Los hidrocarburos nitrogenados reemplazan sus átomos de nitrógeno por átomos de hidrógeno, y los átomos de nitrógeno que salen se combinan con moléculas de hidrógeno formando amoníaco. Finalmente los hidrocarburos que contienen azufre reemplazan sus átomos de azufre por átomos de hidrógeno, y los átomos de azufre que salen se combinan con moléculas de hidrógeno formando sulfuro de hidrógeno. Una vez realizado el procedimiento de hidroprocesamiento, se separan las parafinas del resto de las sustancias y se someten a otros tratamientos hasta conseguir las características deseadas.

El término “catálisis”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere al aumento de la velocidad de una reacción química debido a la participación de una sustancia denominada catalizador. A diferencia de otros reactivos en la reacción química, un catalizador no se consume. Un catalizador puede participar en múltiples transformaciones químicas. El efecto de un catalizador puede variar debido a la presencia de otras sustancias conocidas como inhibidores o venenos (que reducen la actividad catalítica) o promotores (que aumentan la actividad). En el contexto de la presente invención, los principales catalizadores útiles en hidroprocesamiento se basan en disulfuro de molibdeno (MoS_2) junto con cantidades menores de otros

metales. La mayoría de los metales catalizan el hidroprocesamiento, pero aquellos en el medio de la serie de transición de un metal son más activos. El disulfuro de rutenio parece ser el catalizador más activo, pero las combinaciones binarias de cobalto y el molibdeno son también altamente activas. Aparte de la base de cobalto modificado con catalizador MoS₂, también se utilizan níquel y tungsteno. Por ejemplo, los catalizadores de Ni-W son más eficaces para hidrodeshidrogenación.

Otro método de hidrotratamiento comprende poner en contacto los lípidos refinados con agua, aplicar una temperatura y presión elevadas, y separar la fase orgánica del agua. Otro método de hidroprocesamiento comprende hidrogenar la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa, y además desoxigenar dicha mezcla de lípidos refinados.

En una realización preferida, el método de hidrotratamiento comprende

- 15 - poner en contacto la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) con agua,
- aplicar una temperatura y presión elevadas, y
- separar la fase orgánica del agua.

20 En esta realización, el hidrotratamiento se lleva a cabo en fase líquida, a una temperatura elevada, de 100 a 400 °C, preferiblemente 250 a 350 °C. La reacción puede llevarse a cabo a presión atmosférica. Sin embargo, con el objetivo de mantener los reactivos en la fase líquida, es preferible utilizar una presión mayor que la presión de saturación de vapor y, por lo tanto, los intervalos de presión de reacción tienen un rango desde la presión atmosférica hasta 20 MPa, preferiblemente de 0,1 a 5 MPa.

Una vez finalizada la reacción, la fase orgánica se separa del agua obteniéndose como producto un destilado con la composición de un diésel renovable.

- 30 En otra realización preferida, el método de hidroprocesamiento comprende
- hidrogenar la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii), y
 - desoxigenar dicha mezcla de lípidos refinados.

En una realización más preferida, el método de hidroprocesamiento se lleva a cabo a temperatura y presión elevadas.

El término “desoxigenación”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una reacción química que implica la eliminación de oxígeno molecular (O₂) a partir de una mezcla de reacción o disolvente, o la eliminación de los átomos de oxígeno de una molécula. Ejemplos no limitativos de reacciones de desoxigenación incluyen la sustitución de un grupo hidroxilo por hidrógeno en la desoxigenación de Barton-McCombie o en la desoxigenación Markó-Lam, y la sustitución de un grupo oxo por dos átomos de hidrógeno en la reducción de Wolff-Kishner.

10 Por ejemplo, los lípidos y opcionalmente un disolvente o una mezcla de disolventes se ponen en contacto con un catalizador heterogéneo de descarboxilación seleccionado a partir de catalizadores que contienen uno o más metales del grupo VIII y/o VIA del sistema periódico. Preferiblemente, los catalizadores son catalizadores de Pd, Pt, Ni, NiMo o CoMo, la sobre un soporte de alúmina, sílice y/o carbono. Se puede usar
15 hidrógeno opcionalmente. Las condiciones de reacción de descarboxilación varían con la materia prima utilizada. La reacción se lleva a cabo en fase líquida, a una temperatura elevada, de 100 a 400 °C, preferiblemente 250 a 350 °C. La reacción puede llevarse a cabo a presión atmosférica. Sin embargo, con el objetivo de mantener los reactivos en la fase líquida, es preferible utilizar una presión mayor que
20 la presión de saturación de vapor y, por lo tanto, los intervalos de presión de reacción tienen un rango desde la presión atmosférica hasta 150 MPa, preferiblemente de 0,1 a 5 MPa.

En una realización preferida, la hidrogenación y desoxigenación de dicha mezcla de
25 lípidos refinados se realiza en la misma etapa. En otra realización preferida, la hidrogenación y desoxigenación de dicha mezcla de lípidos refinados se realiza en etapas consecutivas.

El producto que se obtiene una vez finalizada la reacción es un diésel renovable. En
30 otra realización particular, el tercer procedimiento de la invención comprende adicionalmente un proceso de craqueo catalítico en condiciones adecuadas para convertir las parafinas obtenidas en la etapa iii) en bioqueroseno.

El término “craqueo catalítico” o “cracking catalítico”, tal y como se utiliza en la
35 presente invención, se refiere a la ruptura de un alcano de cadena larga en otros

alcanos y alquenos de cadena corta más útiles, es decir, el proceso de ruptura de hidrocarburos de cadena larga en hidrocarburos de cadena corta. Se trata de un proceso de descomposición termal en presencia de un catalizador de los componentes de las parafinas obtenidas mediante los procesos de hidrotratamiento, con el propósito
5 de craquear hidrocarburos de cadena larga cuyo punto de ebullición es igual o superior a los 315 °C, y convertirlos en hidrocarburos de cadena corta cuyo punto de ebullición se encuentra por debajo de los 221 °C. Dichos catalizadores se presentan en forma granular o microesférica. Los catalizadores usualmente se componen por óxido de silicio (SiO₂) y alúmina (Al₂O₃). El mineral más comúnmente usado para este fin es la
10 faujasita.

En una realización preferida, dicho craqueo catalítico emplea un catalizador sólido.

El término "catalizador sólido" tal y como se usa aquí se refiere a una sustancia
15 química, sólida, simple o compuesta, que modifica la velocidad de una reacción química, interviniendo en ella pero sin llegar a formar parte de los productos resultantes de la misma. La mayoría de los catalizadores sólidos son los metales o los óxidos, sulfuros y haloideos de elementos metálicos y de semimetálicos como los elementos boro aluminio, y silicio. Los catalizadores sólidos pueden prepararse
20 mediante precipitación-deposición, que consiste en depositar un hidróxido mediante la precipitación de una sal soluble del metal sobre el soporte. En este caso la precipitación se realiza principalmente por modificación del pH de la disolución. El método más empleado debido a su sencillez es la impregnación, que consiste en añadir el soporte a una disolución, con el contenido de fase activa deseado, y eliminar
25 el disolvente por evaporación. En una realización más preferida, dicho catalizador sólido se selecciona del grupo que consiste en catalizadores que consisten en sistemas bifuncionales de hidrogenación-deshidrogenación metálicos (por ejemplo, Co-Mo o Pd-Pt) y componentes ácidos para craqueo (por ejemplo, Al₂O₃, SiO₂, y también en forma de zeolitas) en presencia de hidrógeno.

30

Procedimiento para obtener biodiesel

En otra realización particular, la invención se refiere a un método para obtener biodiesel, en adelante cuarto método de la invención, que comprende las etapas de:

- i) refinar los lípidos obtenidos en el segundo procedimiento de la invención y
 - ii) convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa i) en parafinas.
- 5 o las etapas de
- i) obtener una preparación enriquecida en lípidos a partir de la biomasa microbiana de acuerdo a la invención,
 - ii) refinar los lípidos obtenidos en la etapa i) y
 - iii) convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) en
- 10 biodiesel

El término "biodiesel", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una composición química compuesta fundamentalmente por ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga. Los ésteres que forman parte del biodiesel son ésteres metilo, etilo o propilo y los ácidos grasos son los que proceden de la composición lipídica de acuerdo a la presente invención.

15

En formas particulares de realización, el biodiesel de acuerdo a la presente invención comprende uno o varios de los siguiente ésteres de alquílicos de ácidos grasos: esterres metílicos de ácidos grasos (FAME o fatty acid methyl ester), esterres etílicos de ácidos grasos (FAEE o fatty acid ethyl esters), ésteres butílicos de ácidos grasos (FABE o fatty acid butyl esters). En formas particulares de realización, el biodiesel puede contener uno o varios ácidos grasos seleccionados de miristato, palmitato, estearato, oleato, linolenato, araquidate y behenato. En una forma preferida de la invención, el biodiesel es un combustible que está compuesto en su totalidad por esterres de origen biológico que no contienen diésel procedente del petróleo y que comprende monoalquil ésteres de ácidos grasos de cadena larga. Este tipo de biodiesel se conoce con B100 e indica que el 100% del combustible es biodiesel

20

25

En otras formas particulares de realización, el biodiesel puede contener uno o varios ácidos grasos seleccionados de miristato, palmitato, estearato, oleato, linolenato, araquidato y behenato.

30

En una forma preferida de la invención, el biodiesel es un combustible que está compuesto en su totalidad por esterres de origen biológico que no contienen diésel

35

procedente del petróleo y que comprende monoalquil ésteres de ácidos grasos de cadena larga. Este tipo de biodiesel se conoce con B100 e indica que el 100% del combustible es biodiesel

5 En una primera etapa, el cuarto procedimiento de la invención comprende refinar los lípidos obtenidos a partir del segundo procedimiento de la invención. El término “refinamiento” o “refino”, se ha descrito en el contexto del tercer método de la presente invención y es usado de la misma manera en relación al cuarto método de la invención.

10

El experto en la materia entenderá que existen en la técnica numerosos procedimientos para convertir lípidos en biodiesel que incluyen, sin limitación, procedimientos de transesterificación (EP1682466, EP1795576, EP1681337, EP1640437).

15

El término “esterificación” o “transesterificación” tal y como se usa en la presente invención, se refiere a la reacción que se produce entre un ácido graso y un alcohol. El producto de dicha reacción es un éster de ácido graso. La transesterificación puede ser catalizada por bases, ácidos o enzimas. En una forma de realización, el biodiesel
20 se obtiene a partir de la preparación lipídica obtenida en la etapa i) del tercer procedimiento de la invención mediante la transesterificación de los ácidos grasos libres que forman parte de la preparación lipídica.

El proceso de transesterificación catalizado por ácidos se lleva a cabo en presencia de
25 ácidos Brønsted, preferentemente por ácido sulfónico o sulfúrico. Estos catalizadores generan una muy alta producción de ésteres alquílicos pero las reacciones son lentas en comparación con catalizadores alcalinos. Típicamente este tipo de transesterificación se emplea con aquellos lípidos de elevado contenido en ácidos grasos libres.

30

El proceso de transesterificación catalizado por bases se lleva a cabo con metanol vía alcalina. El catalizador (por ejemplo, NaOH, KOH, NaHCO₃, KHCO₃) es disuelto en el alcohol y tras añadirlo al aceite, la mezcla se agita a una determinada temperatura y presión, que podrán ser ajustadas según las condiciones experimentales. Esta

reacción da lugar a ésteres de ácidos grasos y glicerina cruda como productos finales de reacción.

El proceso de transesterificación enzimática catalizado por lipasas se lleva a cabo en presencia de estas enzimas o de microorganismos que las producen, como por ejemplo 5 aquellos pertenecientes a los géneros *Candida sp*, *Chromobacteri sp*, *Cryptococcus sp*, *Mucor sp*, *Pseudomonas sp*, *Rhizomucor sp*, *Rhizopus sp*, *Thermomyces sp*, etc.

En una realización aún más particular la obtención de biodiesel se lleva a cabo mediante transesterificación catalizada por bases tal y como se muestra en el ejemplo 10 6 de la presente invención. Como el experto en la materia entenderá, la concentración del catalizador básico, la cantidad de sustrato, la temperatura y el tiempo de reacción podrá ser ajustada. Los productos de reacción obtenidos son esteres metílicos de los correspondientes ácidos grasos que conforman el biodiesel y glicerina. El metanol 15 utilizado como diluyente del catalizador puede ser retirado mediante diferentes procedimientos físico-químicos conocidos en el estado de la técnica como tratamiento con calor, destilación etc. Debido a la distinta densidad de los productos de reacción, la fase ligera, en donde se encontrará la glicerina y otros compuestos, puede ser separada de la fase pesada, formada por los ésteres metílicos de los ácidos grasos, 20 mediante cualquier técnica conocida que permita la separación de líquidos de distinta densidad como por ejemplo centrifugación, sedimentación, filtración, cristalización etc.

Los ésteres metílicos obtenidos, pueden ser opcionalmente purificados para eliminar impurezas (pequeñas cantidades de metanol, glicerina, catalizador, jabones, restos 25 celulares y compuestos de alto punto de ebullición). Métodos para la purificación de ésteres metílicos son bien conocidos en el estado de la técnica, e incluyen sin limitarse a, métodos de purificación cromatográficos, cristalización, destilación al vacío, o lavado con soluciones diluidas de ácido. En una realización aún más particular etapa de purificación de los ésteres metílicos obtenidos se lleva a cabo mediante lavado con 30 una solución diluida de ácido clorhídrico. Este lavado permite eliminar las impurezas insolubles que acompañan al éster y consigue evitar la formación de emulsiones. Típicamente el lavado se realiza a la misma temperatura empleada en la reacción de transesterificación. Tras el lavado, se lleva a cabo la separación la fase acuosa y orgánica de la mezcla. Como el experto en la materia entenderá cualquier técnica que permita la separación de la fase orgánica y la fase acuosa podrá ser empleada en el 35

contexto de la presente invención. La separación de ambas fases puede llevarse a cabo, pero sin estar limitado a, mediante la extracción de la fase orgánica, decantación, o evaporación de la fase acuosa. Finalmente, la fase orgánica, en donde se encontrarán los ésteres metílicos, aún arrastra una parte considerable de agua que debe ser eliminada. Típicamente la etapa de secado se lleva cabo en condiciones de presión y temperatura elevadas (temperaturas de alrededor de 100°C y se suele aplicar el vacío).

Usos de la invención

10

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo de la invención, en adelante "primer uso de la invención", para obtener una biomasa microbiana rica en triglicéridos según el primer procedimiento de la invención.

15 Los términos "microorganismo" y "biomasa microbiana rica en triglicéridos" y sus particularidades han sido descritos en el contexto del microorganismo y del primer procedimiento de la invención, y son aplicables al primer uso de la invención. Asimismo, también son aplicables de igual manera los modos de realización particulares y preferidos del microorganismo y del primer procedimiento de la
20 invención.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo de la invención, en adelante "segundo uso de la invención", para extraer los lípidos de la biomasa microbiana según el segundo procedimiento de la invención.

25

Los términos "microorganismo" y "biomasa microbiana" y sus particularidades han sido descritos en el contexto del microorganismo y del primer procedimiento de la invención, y son aplicables al segundo uso de la invención. Asimismo, también son aplicables de igual manera los modos de realización particulares y preferidos del
30 microorganismo y del segundo procedimiento de la invención.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo de la invención, en adelante "tercer uso de la invención", para obtener para obtener parafinas según el tercer procedimiento de la invención.

35

Los términos “microorganismo” y “parafina” y sus particularidades han sido descritos en el contexto del microorganismo y del tercer procedimiento de la invención, y son aplicables al tercer uso de la invención. Asimismo, también son aplicables de igual manera los modos de realización particulares y preferidos del microorganismo y del
5 tercer procedimiento de la invención.

La invención se describe en detalle a continuación por medio de los siguientes
10 ejemplos, que han de interpretarse como meramente ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención.

EJEMPLOS

15 **Ejemplo 1: Aislamiento de *Pseudomonas brassicacearum* CECT 8162**

La selección de esta cepa se llevó a cabo a partir de una muestra de suelo de la que se prepararon diluciones seriadas en solución salina, sembrándose 0,1 mL en placas conteniendo medio TSA (por litro, extracto de levadura 10 g, peptona bacteriológica,
20 20 g, glicerina cruda 47 g) suplementado con cicloheximida y nistatina (50 µg/mL) para inhibir el crecimiento de eucariotas. Las placas se incubaron a 30°C durante 3-4 días.

La capacidad para acumular grasas se analizó mediante un screening utilizando la tinción con rojo Nilo (Kimura K, et al., 2004, *J. Microbiol. Methods*, 56, 331-338). La
25 cepa se creció en cultivos a 30°C, 250 rpm durante 96 horas en matraces conteniendo 50 mL de medio M9 (para 1 litro: Glucosa 40 g, Na₂HPO₄·12H₂O 7 g, KH₂PO₄ 3 g, NaCl 0,5 g, NH₄Cl 1 g, FeSO₄·7H₂O 0,5 mg, MgSO₄ 0,12 g, elementos traza 2,5 mL. Elementos traza (por litro): ZnCl₂ 50 mg, MnCl₂·4H₂O 30 mg, H₃BO₃ 300 mg, CoCl₂ 200 mg, CuCl₂·2H₂O 10 mg, NiCl₂·6H₂O 20 mg, NaMoO₄·2H₂O 30 mg). Las células se
30 recogieron por centrifugación, y se resuspendieron en 5 mL de agua conteniendo 0,75 mL de hidróxido amónico. La suspensión se agitó suavemente y se incubó en un baño a 60-70°C durante 15 minutos. Se enfrió y se añadieron 5 mL de etanol agitando con fuerza. A continuación se añadieron 12,5 mL de éter etílico, se agitó brevemente y se añadió el mismo volumen de éter de petróleo. La mezcla se separó por centrifugación
35 retirándose la fase orgánica a un matraz esférico de fondo plano. La fase orgánica se

evaporó a sequedad en un rotavapor y el matraz se introdujo en una estufa a 102°C hasta obtener un peso constante.

Mediante esta medida por gravimetría se confirmó que la cepa era capaz de acumular más de un 25% de su peso seco en forma de lípidos. Esta cepa se identificó, mediante la secuenciación de la región D1/D2 de la subunidad 16S del ADN ribosómico (SEQ ID NO 1) y un fragmento de la ITS (SEQ ID NO 2) como *Pseudomonas brassicacearum* mostrando diferencias frente a las secuencias de esta especie depositadas en las bases de datos consultadas. El microorganismo se ha depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como *P. brassicacearum* CECT 8162.

La presente cepa de *P. brassicacearum* es capaz de metabolizar diferentes fuentes de carbono incluyendo glucosa, glicerina cruda o los azúcares presentes en hidrolizados de biomasa lignocelulósica, que se encuentra en exceso en relación con la fuente de nitrógeno presente en el mismo medio.

Ejemplo 2: Producción de lípidos en biorreactores

Cultivos de la cepa *P. brassicacearum* CECT 8162 crecidos en medio TSA se utilizaron para inocular matraces de 2 litros conteniendo 350 mL de medio TSB. Las células se incubaron 24 h en un agitador orbital (250 rpm, 30°C). A continuación se transfirieron 800 mL de este cultivo a un fermentador conteniendo 3,2 litros de medio M9-1. Este medio consiste en (sobre la base de 1 litro): Glucosa 40 g; NH₄Cl 3,8 g; MgSO₄·7H₂O 0,8 g; Na₂HPO₄·12H₂O 24 g; KH₂PO₄ 4 g; elementos traza 8 mL. Elementos traza (por litro): FeSO₄·7H₂O 10 g; CaCl₂·2H₂O 3 g; ZnSO₄·7H₂O 2,2 g; MnSO₄·H₂O 0,4 g; H₃BO₃ 0,3 g; CoCl₂ 0,2 g; NaMoO₄·2H₂O 0,15 g; NiCl₂·6H₂O 0,02 g; CuSO₄·5H₂O 1 g.

El fermentador se mantuvo a 30°C, la concentración de oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 20% manteniendo una agitación de 1.000 rpm. Al cabo de 40 horas la concentración de biomasa en el fermentador era de 60-70 g/L y el contenido intracelular de lípidos fue del 23%. La mezcla de lípidos extraída se fraccionó en una columna de silica obteniéndose 4 fracciones que se analizaron por HPLC-ELSD y HPLC-MS. La identidad de los compuestos presentes en cada una y el porcentaje en peso con respecto al contenido en glicéridos de la muestra fue el siguiente:

Fracción	Composición	% peso
1	Triglicéridos	8,9
2	Ácidos grasos libres	1,0
3	Diglicéridos	7,2
4	Monoglicéridos	33,7

La composición de ácidos grasos presentes se analizó mediante cromatografía de gases observándose una cantidad mayoritaria de ácido palmítico (37,5%),
5 heptadecenoico (19%), mirístico (16,5%), vaccénico (14%) y oleico (13%).

Ejemplo 3: Extracción del aceite

Se trituraron 1,4 kg de biomasa seca de *P. brassicacearum* CECT 8162 hasta lograr
10 un tamaño de partícula con diámetro inferior a 1 mm. A continuación se realizó una extracción durante 24 horas, mediante soxhlet empleando n-hexano como disolvente. El extracto se centrifugó a 9.000 rpm durante 15 minutos y se filtró a través de una membrana de 0,2 µm. Finalmente se evaporó el hexano a sequedad obteniéndose
15 306,6 g de extracto seco.

Ejemplo 4: Producción de biodiésel

Una muestra (0,5 kg) de aceite extraído y refinado de la cepa *P. brassicacearum* CECT 8162 se empleó para llevar a cabo la reacción de transesterificación. La
20 reacción se realizó en tres etapas cada una de 2 horas de duración a una temperatura de 55°C. En cada etapa se añadieron NaOH (1% p/v) y metanol (10% v/v). Concluida la reacción se detuvo la agitación y la mezcla se separó mediante centrifugación. Se obtuvieron dos fases: una ligera, conteniendo los ésteres metílicos y metanol en exceso, y una fase pesada formada por glicerina, restos de metanol, catalizador y
25 sales.

La purificación de la fase ligera se realizó mediante cuatro etapas de lavado a 55°C. En la primera se utilizó HCl (al 2%) y en las tres restantes agua destilada. Al finalizar cada lavado se dejó decantar la mezcla hasta lograr una buena separación de la fase
30 orgánica y acuosa. Se retiró la fase acuosa y los ésteres metílicos se sometieron a una

etapa de secado, para eliminar los restos de metanol y agua, mediante evaporación a vacío y 115°C. La cantidad final obtenida fue de 0,49 kg de ésteres metílicos lo que representa un rendimiento del 98%. El análisis del biodiésel obtenido cumplió todos los parámetros exigidos por la norma EN14214.

5

DEPÓSITOS DE MATERIAL BIOLÓGICO

La cepa *Pseudomonas brassicacearum* caracterizada por su capacidad de acumular lípidos hasta al menos un 20% del peso seco ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo en las condiciones estipuladas en el Tratado de Budapest. El depósito se efectuó el 15 de junio de 2012 y el número asignado a dicho depósito fue de CECT 8162.

15

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo de la cepa *Pseudomonas brassicacearum* CECT 8162, o de una cepa mutante de la misma que mantiene la capacidad de acumular lípidos hasta al menos un 20% del peso seco.
5
2. Un procedimiento para obtener una biomasa microbiana rica en triglicéridos, que comprende
 - i) cultivar un microorganismo según la reivindicación 1, en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y al menos una fuente de nitrógeno, en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo, y
10
 - ii) separar la biomasa microbiana del medio de cultivo, en donde la proporción C:N en el medio de cultivo es elevada.
15
3. El procedimiento según la reivindicación 2, en donde la proporción C:N es de al menos 10:1 (peso/peso).
4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en donde la fuente de carbono se selecciona del grupo que consiste en glucosa, glicerol, melazas, xilosa, arabinosa, manosa, fructosa, acetato y combinaciones de las mismas.
20
5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde la fuente de carbono es glucosa.
25
6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde la fuente de nitrógeno se selecciona del grupo que consiste en extracto de levadura, peptona, líquido macerado de maíz, urea, glutamato sódico, diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico, como sales de amonio y combinaciones de las mismas.
30
7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde la fuente de nitrógeno es una sal de amonio, preferiblemente cloruro de amonio.
35

8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde las condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo de la etapa i) comprenden
- temperatura en un rango entre 18 °C y 37 °C,
 - 5 - concentración de oxígeno disuelto de al menos el 20%, y/o
 - agitación constante.
9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en donde la etapa ii) se realiza mediante un método seleccionado del grupo que consiste en
- 10 filtración, microfiltración, centrifugación y combinaciones de los mismos.
10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, que comprende además secar la biomasa microbiana de la etapa ii).
- 15 11. El procedimiento según la reivindicación 10, en donde la etapa de secado se realiza a una temperatura entre 50 °C y 70 °C.
12. Biomasa microbiana rica en triglicéridos obtenible según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11.
- 20 13. Un procedimiento para obtener una composición lipídica a partir de la biomasa microbiana según la reivindicación 12, que comprende extraer la fracción lipídica de la biomasa microbiana.
- 25 14. El procedimiento según la reivindicación 13 en donde la extracción de la fracción lipídica se lleva a cabo mediante extracción mecánica o mediante un método de extracción sólido-líquido.
- 30 15. El procedimiento según la reivindicación 14, en donde el método de extracción mecánica se realiza usando prensa de tornillo, prensa francesa o molino de bolas.
16. El procedimiento según la reivindicación 15, en donde el método de extracción sólido-líquido se realiza usando un disolvente orgánico inmiscible en agua.

17. El procedimiento según la reivindicación 16, en donde dicho disolvente orgánico inmiscible en agua se selecciona del grupo que consiste en n-hexano, acetona, éter de petróleo, éter-etílico y combinaciones de los mismos.
- 5 18. Un procedimiento para obtener parafinas que comprende
- i) refinar los lípidos obtenidos de acuerdo al procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 y
 - ii) convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa i) en parafinas.
- 10 19. El procedimiento según la reivindicación 18, en donde la etapa i) se realiza mediante al menos un lavado con NaOH a una concentración entre 5% y 15%.
- 15 20. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19, en donde la etapa ii) comprende un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en desoxigenación, hidrogenación e hidrotratamiento.
- 20 21. El procedimiento según la reivindicación 20, en donde el método de hidrotratamiento comprende
- poner en contacto la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii) con agua,
 - aplicar una temperatura y presión elevadas, y
 - separar la fase orgánica del agua.
- 25 22. El procedimiento según la reivindicación 21, en donde el método de hidroprocesamiento comprende
- hidrogenar la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa ii), y
 - desoxigenar dicha mezcla de lípidos refinados.
- 30 23. El procedimiento según la reivindicación 22, en donde la hidrogenación y desoxigenación de dicha mezcla de lípidos refinados se realiza en la misma etapa o en etapas consecutivas.
- 35 24. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 o 23, en donde el hidroprocesamiento se lleva a cabo a temperatura y presión elevadas.

25. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 24, que comprende adicionalmente un proceso de craqueo catalítico en condiciones adecuadas para convertir las parafinas obtenidas en la etapa ii) en bioqueroseno.
26. El procedimiento según la reivindicación 25, en donde dicho craqueo catalítico emplea un catalizador sólido.
27. El procedimiento según la reivindicación 26, en donde dicho catalizador sólido se selecciona del grupo que consiste en un sistema bifuncional de hidrogenación-deshidrogenación metálico y un componente ácido para craqueo en presencia de hidrógeno.
28. El procedimiento según la reivindicación 27, en donde dicho catalizador sólido es un sistema bifuncional de hidrogenación-deshidrogenación metálico.
29. El procedimiento según la reivindicación 28, en donde dicho catalizador sólido es un componente ácido para craqueo en presencia de hidrógeno.
30. Un procedimiento para obtener biodiesel que comprende
- i) refinar los lípidos obtenidos de acuerdo al procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 y
 - ii) convertir la mezcla de lípidos refinados obtenidos en la etapa i) en biodiesel.
31. El procedimiento según la reivindicación 30, en donde la etapa i) se realiza mediante al menos un lavado con NaOH a una concentración entre 5% y 15%.
32. El procedimiento según las reivindicaciones 30 o 31, en donde el procedimiento de conversión de la mezcla de lípidos refinados de la etapa i) en un biodiésel es una transesterificación.
33. El procedimiento según la reivindicación 32, en donde la transesterificación es catalizada por bases, ácidos o enzimas.

34. Uso del microorganismo según la reivindicación 1 o de la biomasa microbiana rica en triglicéridos según la reivindicación 12 para obtener una biomasa microbiana rica en triglicéridos, para extraer los lípidos de la biomasa microbiana, para obtener parafinas o para obtener biodiesel.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2013/070454

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	<p>WO 2010/147642 A1 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]; SINSKEY ANTHONY JOHN [US]; MACEACH) 23 de diciembre de 2010 (2010-12-23) mencionado en la solicitud todo el documento</p>	2,3
A	<p>----- EP 1 273 664 A1 (IDEMITSU PETROCHEMICAL CO [JP]) 8 de enero de 2003 (2003-01-08) resumen; ejemplos 1, 2 -----</p>	2,3

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES2013/070454

EP 2141217	A1	06-01-2010	AU	2009265573	A1	07-01-2010
			CA	2729651	A1	07-01-2010
			CN	102124080	A	13-07-2011
			EA	201170120	A1	30-08-2011
			EP	2141217	A1	06-01-2010
			JP	2011526640	A	13-10-2011
			KR	20110044950	A	03-05-2011
			NZ	590189	A	29-06-2012
			WO	2010000934	A1	07-01-2010

EP 2407531	A1	18-01-2012	AR	084120	A1	24-04-2013
			EP	2407531	A1	18-01-2012
			EP	2593540	A1	22-05-2013
			US	2012015413	A1	19-01-2012
			WO	2012007646	A1	19-01-2012

US 2010239533	A1	23-09-2010	AR	071493	A1	23-06-2010
			TW	201036554	A	16-10-2010
			US	2010239533	A1	23-09-2010
			US	2012088831	A1	12-04-2012

WO 2010147642	A1	23-12-2010	US	2012171735	A1	05-07-2012
			WO	2010147642	A1	23-12-2010

EP 1273664	A1	08-01-2003	AU	3458700	A	15-10-2001
			EP	1273664	A1	08-01-2003
			WO	0175136	A1	11-10-2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2013/070454

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C12P7/64 C12R1/38
 ADD.
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 C12P C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 141 217 A1 (NESTE OIL OYJ [FI]) 6 January 2010 (2010-01-06) cited in the application paragraphs [0041] - [0046], [0059], [0063]	18-33
A	----- EP 2 407 531 A1 (NESTE OIL OYJ [FI]) 18 January 2012 (2012-01-18) cited in the application abstract	1-34
A	----- US 2010/239533 A1 (APT KIRK E [US] ET AL) 23 September 2010 (2010-09-23) abstract	1-34
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 11 April 2014	Date of mailing of the international search report 24/04/2014
---	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer van Heusden, Miranda
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2013/070454

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010/147642 A1 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]; SINSKEY ANTHONY JOHN [US]; MACEACH) 23 December 2010 (2010-12-23) cited in the application the whole document	2,3
A	----- EP 1 273 664 A1 (IDEMITSU PETROCHEMICAL CO [JP]) 8 January 2003 (2003-01-08) abstract; examples 1,2 -----	2,3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/ES2013/070454

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP 2141217	A1	06-01-2010	AU 2009265573 A1	07-01-2010
			CA 2729651 A1	07-01-2010
			CN 102124080 A	13-07-2011
			EA 201170120 A1	30-08-2011
			EP 2141217 A1	06-01-2010
			JP 2011526640 A	13-10-2011
			KR 20110044950 A	03-05-2011
			NZ 590189 A	29-06-2012
			WO 2010000934 A1	07-01-2010
EP 2407531	A1	18-01-2012	AR 084120 A1	24-04-2013
			EP 2407531 A1	18-01-2012
			EP 2593540 A1	22-05-2013
			US 2012015413 A1	19-01-2012
			WO 2012007646 A1	19-01-2012
US 2010239533	A1	23-09-2010	AR 071493 A1	23-06-2010
			TW 201036554 A	16-10-2010
			US 2010239533 A1	23-09-2010
			US 2012088831 A1	12-04-2012
WO 2010147642	A1	23-12-2010	US 2012171735 A1	05-07-2012
			WO 2010147642 A1	23-12-2010
EP 1273664	A1	08-01-2003	AU 3458700 A	15-10-2001
			EP 1273664 A1	08-01-2003
			WO 0175136 A1	11-10-2001