# CONCENTRACIÓN DE CULTIVOS DE MICROALGAS POR UN PROCESO DE ELIMINACIÓN OSMÓTICA DEL MEDIO UTILIZANDO DISOLUCIONES DE GLICEROL.

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuadra en procesos de separación o concentración de microrganismos cultivados en medio líquido, principalmente cultivos de microalgas.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los cultivos de microalgas no suelen ser extremadamente densos, y estos caldos diluidos resultan caros de manipular debido al gran volumen que se necesita procesar (Molina Grima E, Belarbi E, Acién Fernández FG, Robles Medina A, Chisti Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. Biotechnol Adv 20:491-515 (2003)) para la obtención de los bioproductos de interés, por esto se hace indispensable concentrar previamente los cultivos eliminando, al menos parcialmente el medio que los contiene. Entre las técnicas actualmente empleadas para la concentración de los cultivos de microalgas figuran la centrifugación, la floculación y sus variantes (electrofloculación, biofloculación, autofloculación, etc...), siendo la aplicación de todas ellas dependientes del tipo de microalga (tamaño, sustancias que excreta al medio, etc...) y la aplicación para la cual se requiere la biomasa. La centrifugación es eficiente, rápida y sumamente útil cuando se desea recuperar metabolitos de alto valor agregado exentos de contaminantes químicos, pero es costosa energéticamente. Por ejemplo, en el campo de la producción de biocombustibles, se ha reportado que la centrifugación debe evitarse para que la producción neta de energía sea favorable y no se esté consumiendo más energía para la fabricación del biocombustible de la que el propio biocombustible es capaz de ofrecer. La floculación por su parte es eficaz energéticamente hablando, pero no siempre pueden recuperarse los agentes floculantes añadidos, o resultan tóxicos,

excluyendo en ocasiones su uso en el campo de la industria cosmética o alimentaria (Granados MR, Acién FG, Gómez C, Fernández-Sevilla JM, Molina Grima E. Evaluation of flocculants for the recovery of freshwater microalgae. Bioresour Technol 118:102-10 (2012)), (Anthony RJ, Ellis JT, Sathish A, Rahman A, Miller CD, Sims RC. Effect of coagulant/flocculants on bioproducts from microalgae. Bioresour Technol 149:65-70 (2013)), (Sim T-, Goh A, Becker EW. Comparison of centrifugation, dissolved air flotation and drum filtration techniques for harvesting sewage-grown algae. Biomass 16:51-62 (1988)). Además, se requieren grandes dosis de algunos floculantes, empeorando tanto el balance económico como la cantidad de residuos generados con respecto a la cantidad de bioproducto obtenido, más aún en aquellos casos en los que la presencia de estos aditivos en el sobrenadante después de la floculación impide la reutilización del medio por resultar tóxico al propio microrganismo. La autofloculación por su parte evita el problema de la adición de sustancias químicas que posteriormente haya que separar, pero suele ser más lenta que la floculación con adición de agentes floculantes (González-Fernández C, Ballesteros M. Microalgae autoflocculation: An alternative to high-energy consuming harvesting methods. J Appl Phycol 25:991-9 (2013)).

Recientemente se ha propuesto la deshidratación osmótica de microalgas como método de eliminación de agua en cultivos de microalgas de agua dulce utilizando como fluído osmótico agua de mar (Buckwalter P, Embaye T, Gormly S, Trent JD. Dewatering microalgae by forward osmosis. Desalination 312:19-22 (2013)). Si bien la técnica ha sido eficientemente aplicada para el caso específico de microalgas de agua dulce, presenta dos inconvenientes que restringen su aplicación como proceso de concentración de la biomasa, ambos relacionados con el fluido osmótico que se utiliza. El primero de ellos se debe a que el agua de mar sólo puede utilizarse eficazmente para deshidratar cultivos de microalgas de agua dulce, siendo poco o nada eficaces en cultivos de microalgas marinas o de medios hipersalinos. El segundo es que el agua de mar no podría emplearse de forma segura para deshidratar cultivos que vayan a ser destinados al consumo

humano ya que la membrana semipermeable podría ser atravesada por contaminantes químicos que resulten tóxicos según el código alimentario. La presente invención tiene tres claras ventajas con respecto a las técnicas actualmente utilizadas: en primer lugar, que las disoluciones osmóticas que se proponen (disoluciones de glicerol) tienen una fuerza osmótica que permite su utilización en la separación de microrganismos cultivados en medios de agua dulce, marinos o salinos, segundo, que en aplicaciones energéticas permite reutilizar algunas disoluciones de glicerol que se obtienen como residuo de procesos de obtención de biodiesel, mejorando la sostenibilidad del proceso, y tercero que el glicerol es una sustancia actualmente utilizada en la industria farmacéutica y alimentaria, de modo que podría ser de aplicación también en dichos ámbitos. Cabe destacar que actualmente los procesos de refinado del glicerol que se obtiene como residuo en el proceso de obtención de biodiesel son costosos (Ayoub M, Abdullah AZ. Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. Renewable and Sustainable Energy Reviews 16:2671-86 (2012), (Quispe CAG, Coronado CJR, Carvalho Jr. JA. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 27:475-93 (2013)).

La deshidratación osmótica utilizando glicerol es un proceso que viene siendo aplicado en la deshidratación de alimentos, los cuales suelen trocearse y ponerse en contacto directo con la disolución de glicerol (Moreira R, Chenlo F, Torres MD, Vázquez G. Effect of stirring in the osmotic dehydration of chestnut using glycerol solutions. LWT - Food Science and Technology 40:1507-14 (2007)), (İspir A, Toğrul İT. Osmotic dehydration of apricot: Kinetics and the effect of process parameters. Chem Eng Res Design 87:166-80 (2009)). La ósmosis directa a través de membranas aplicada a cultivos de microalgas ha sido empleada recientemente utilizando como fluido osmótico el agua de mar (Buckwalter P, Embaye T, Gormly S, Trent JD. Dewatering microalgae by forward osmosis. Desalination 312:19-22 (2013)), siendo aplicable sólo a la deshidratación de cultivos de microalgas de

agua dulce, debido a que cultivos inmersos en medios marinos tendrían una presión osmótica similar o incluso superior al agua de mar, y sería inaplicable en microalgas de medios hipersalinos, donde se podría producir el efecto inverso, es decir, que los cultivos se diluyan aún más.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

A continuación se presentan las definiciones de los términos técnicos y científicos empleados en la presente memoria, según el significado entendido comúnmente por una persona experta en la técnica.

El término "cultivo" y variantes del mismo, tales como "cultivar", se refieren a la presencia de una o más tipos de células en el mismo biorreactor. Como se usa en la presente memoria, los términos "caldo" o "cultivo" indistintamente se refieren también al contenido extraído del biorreactor en un momento determinado, que contiene las células y el medio de cultivo. Los tipos de células pueden ser microorganismos, tales como microalgas o pueden ser células de microalgas cultivadas con un tipo de célula diferente. Los medios de cultivo pueden ser aquellos que refuerzan el crecimiento y/o propagación de al menos una de las células, o un subconjunto de estas. Los medios de cultivo de microalgas contienen comúnmente componentes tales como una fuente de nitrógeno fija, elementos en trazas, opcionalmente una solución reguladora para el mantenimiento del pH y fosfato. Otros componentes pueden incluir una fuente de carbono fija tal como acetato o glucosa y sales tales como cloruro de sodio, particularmente para microalgas de agua de mar. Los ejemplos de elementos en trazas incluyen zinc, boro, cobalto, cobre, manganeso y molibdeno en forma de sal, ácido u otra apropiada para el cultivo. El medio puede contener disueltos además metabolitos excretados por las células que contiene.

La fuente de carbono fija comprende sacarosa y glucosa, fructosa, acetato o glicerol, entre otros. Algunas especies de microalgas pueden ser cultivadas al

utilizar una fuente de carbono fija tal como glucosa o acetato en ausencia de luz. Tal cultivo es conocido como cultivo heterotrófico o heterótrofo.

El término "deshidratación" y variantes del mismo tales como "deshidratar" tal como se usa en la presente memoria se refiere a la eliminación de agua contenida en el medio de cultivo, ya sea pura o acompañada de otras sustancias disueltas en ella.

Se define como ósmosis al movimiento espontáneo de un solvente a través de una membrana semipermeable. Una membrana semipermeable es una membrana que permite el paso del solvente pero no es totalmente permeable a los solutos. El movimiento del solvente se produce sin necesidad de aplicar ninguna fuerza externa, sino que ocurre cuando a ambos lados de la membrana semipermeable existen distintos valores para el potencial químico de dicho solvente. El potencial químico del solvente ($\mu_A$, expresado en $J \cdot mol^{-1}$) dependerá de su potencial químico en estado puro ($\mu_A^*$, expresado en $J \cdot mol^{-1}$), la temperatura a la que se encuentre (T, expresada en K) y la actividad del solvente ($a_A$), según la ecuación:

$$\mu_A = \mu_A^* + 8.314 \cdot T \cdot lna_A$$

La actividad del solvente está íntimamente ligada con la concentración del solvente en la disolución, de modo que modificaciones en la concentración del solvente a ambos lados de la membrana o modificaciones de temperatura pueden ocasionar diferencias de potencial químico que obliguen al solvente en cuestión a moverse desde un lado hacia el otro de la membrana semipermeable. El solvente atraviesa la membrana pasando de la zona de mayor potencial químico a la zona de menor potencial químico hasta que los potenciales a ambos lados de la membrana resultan iguales. La disolución donde el potencial químico del solvente es menor se denomina disolución osmótica. Cuando el solvente que traspasa la membrana es agua, hablamos de deshidratación osmótica. Aunque una membrana ideal para la deshidratación osmótica sólo permite el paso del agua, las membranas reales no son totalmente impermeables a todos los solutos, de modo

que la deshidratación osmótica implica también el movimiento de algunas de las sales y otras sustancias presentes en el medio acuoso hacia la disolución osmótica. En la presente invención se propone llevar a cabo un proceso de deshidratación osmótica poniendo en contacto el cultivo de microalgas con una solución de glicerol, a través de una membrana semipermeable. El cultivo de microalgas a deshidratar, consiste en una suspensión de microalgas en un medio acuoso que contiene además sales minerales, que puede contener algún producto orgánico adicionado (como glucosa, pequeñas cantidades de glicerol, acetato, etc..., según el medio de cultivo empleado para el crecimiento celular) y que puede contener asímismo metabolitos que puedan haber excretado las microalgas a dicho medio que las contiene. La membrana semipermeable que se utiliza es una membrana que permite el paso del agua y de algunas sales a través de ella, pero no de las microalgas, como es la membrana de diálisis de Spectrum Labs (MWCO: 12-14.000, Standard Regenerated Cellulose (RC), 2 ml/cm y 16 mm de diámetro, Spectrum labs, USA), pero no está sólo limitada a esta membrana. Para hacer que el agua fluya espontáneamente a través de la membrana, se introduce el cultivo en la zona interior de la membrana en forma de tubo y se coloca en el lado opuesto al que contiene al cultivo una disolución de glicerol. La diferencia de potencial químico para el agua entre ambos lados de la membrana fuerza el paso del agua hacia la disolución de glicerol, concentrándose el cultivo de microalgas. Tanto el glicerol comercial puro como el glicerol denominado "crudo" ofrecen una diferencia de potencial químico para el agua elevado, permitiendo que el agua del medio de cultivo sea transferida a la disolución de glicerol, incluso en los casos en los que el medio de cultivo contenga un alto contenido en sales (situación que reduce el potencial químico del agua en el medio de cultivo). El uso de disoluciones de glicerol como solución osmótica permite un amplio rango de aplicaciones, y específicamente permite la eliminación del agua por ósmosis en cultivos realizados en medios de mayor salinidad que los que actualmente se deshidratan por ósmosis utilizando como fluído osmótico el agua de mar. Las disoluciones de glicerol pueden ser de distintas calidades según el objetivo final.

Por ejemplo, el uso del glicerol está ampliamente difundido en la industria alimentaria y farmacéutica, constituyendo un producto totalmente inocuo que no presentaría problemas de contaminación en este campo. Esto es una mejora con respecto a la utilización de sustancias floculantes, las cuales suelen tener que ser separadas de la biomasa previo al aprovechamiento de la misma, o bien no resultan aptas para el consumo.

Otra ventaja de emplear este proceso radica en que no es necesario gastar energía convencional para que el agua fluya desde el cultivo hacia la disolución de glicerol, ya que la ósmosis constituye un proceso espontáneo. Esta ventaja es especialmente relevante cuando se pretende utilizar la biomasa para producir energía, ya que el coste energético de la eliminación del agua por métodos convencionales como por ejemplo la centrifugación y/o la liofilización del cultivo es elevado. En caso de tratarse de una aplicación de producción de biomasa para la obtención de biocombustibles, puede aprovecharse una disolución de glicerol crudo como fluído osmótico. El glicerol crudo es el residuo que queda cuando el aceite o bien los ácidos grasos extraídos de una biomasa se combinan con un alcohol, dando como subproducto glicerol. Este glicerol está mezclado con impurezas, y debe ser purificado para proceder a su uso dentro de otros procesos productivos. Sin embargo, puede ser utilizado antes de entrar en el proceso de purificación para deshidratar cultivos de microalgas tal como se propone en esta invención. La reutilización de residuos es una clara ventaja medioambiental, y el uso de esta técnica de deshidratación en reemplazo de otras que consumen energía constituye una mejora, tanto en la economía del proceso como el factor medioambiental.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las figuras 1, 2, 3 y 4 muestran los resultados obtenidos en los ejemplos de aplicación de la presente invención.

Figura 1. Eliminación de sales del cultivo de la microalga *Porphyridium cruentum*. El cultivo se encuentra confinado en una membrana semipermeable y todo el conjunto sumergido en agua destilada. La figura permite ilustrar los mg de sales totales que son eliminados por litro de cultivos a diversos tiempos de tratamiento, para obtener un cultivo de menor salinidad.

Figura 2. Eliminación de medio del cultivo previamente dializado de la microalga *Porphyridium cruentum*. La muestra se pone en contacto con glicerol a través de una membrana semipermeable. En esta figura se puede observar cómo durante el tratamiento osmótico que se detalla en esta invención se va reduciendo la masa total de cultivo contenida dentro de la membrana semipermeable gracias principalmente a la pérdida de agua.

Figura 3. Deshidratación osmótica de cultivos de microalgas de agua dulce por transferencia de agua a través de una membrana semipermeable hacia una disolución de glicerol. En esta figura se puede observar cómo durante el tratamiento osmótico que se detalla en esta invención se va reduciendo la masa total de cultivo contenida dentro de la membrana semipermeable gracias principalmente a la pérdida de agua en una microalga cultivada en medio basado en agua dulce. Los símbolos representan los datos de: ● *Choricystis minor*, R=26.5; o *Choricystis minor*, R=26.5; ▼ *Scenedesmus* sp., R=21.4; △ *Scenedesmus* sp., R=21.4; ■ *Neochloris sp.*, R=6.4; □ *Neochloris* sp., R=6.4; ◆ *Neochloris* sp. de cultivo heterotrófico, R=6.8; ◇ *Neochloris* sp. de cultivo heterotrófico, R=6.8. Siendo R la relación másica entre la solución osmótica y el cultivo al inicio del experimento.

Figura 4. Deshidratación osmótica de la microalga marina *Picochlorum* sp. y la micoalga hipersalina *Dunaliella salina* utilizando como fluidos osmóticos disoluciones de glicerol. En esta figura se puede observar cómo durante el tratamiento osmótico que se detalla en esta invención se va reduciendo la masa total de cultivo contenida dentro de la membrana semipermeable gracias

principalmente a la pérdida de agua en cultivos de salinidad comparable al agua de mar o superior. Los símbolos representan los datos de: ● *Picochlorum* sp, usando como solución osmótica glicerol puro; O *Picochlorum* sp, usando como solución osmótica glicerol crudo; ▼ *Picochlorum* sp, usando como solución osmótica glicerol puro; △ *Picochlorum* sp, usando como solución osmótica glicerol crudo; ■ *Dunaliella salina,* usando como solución osmótica glicerol puro; □ *Dunaliella salina,* usando como solución osmótica glicerol crudo; ◆ *Dunaliella salina,* usando como solución osmótica glicerol puro; ◇ *Dunaliella salina,* usando como solución osmótica glicerol crudo.

## MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

El cultivo debe retenerse en dispositivos fabricados usando la membrana semipermeable (en forma de tubo, sacos, frascos, casetes, etc...) y ponerse en contacto durante el tiempo adecuado a través de dicha membrana con la disolución de glicerol. Como alternativa, se puede proporcionar agitación a uno o ambos lados de la membrana semipermeable. Como alternativa, se puede disponer el flujo o circulación del cultivo o de la disolución osmótica operando en semicontinuo. Como alternativa, se puede disponer el flujo o circulación del cultivo y de la disolución osmótica operando en continuo. Como alternativa se puede modificar la temperatura de trabajo a uno o ambos lados de la membrana semipermeable. La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

**Ejemplo 1-** Eliminación de sales y deshidratación osmótica de un cultivo de *Porphyridium cruentum* con miras a la extracción de β-ficoeritrina con posibles aplicaciones alimentarias, farmacéuticas, medicinales, etc....

Objetivo: obtener un concentrado del cultivo de *Porphyridium cruentum* con menor salinidad que el cultivo original.

Para procesar 60 ml de muestra, se corta una porción de 40 cm de un tubo de membrana de diálisis (MWCO: 12-14.000, Standard Regenerated Cellulose (RC),

2 ml/cm y 16 mm de diámetro, Spectrum labs, USA). El tubo se sumerge durante 30 minutos en un recipiente que contiene agua desionizada para eliminar el conservante, según indicaciones del fabricante. Se cierra uno de los extremos del tubo con la pinza de cierre del tubo y se introducen los 60 ml de cultivo con la ayuda de una pipeta, cerrando después también el otro extremo del tubo.

Primer paso: Diálisis.

El tubo es introducido en un recipiente de 2 L de capacidad que contiene 1000 ml de agua destilada. Antes de comenzar el tratamiento de diálisis (t=0), después de los primeros 5 minutos de tratamiento y posteriormente cada 15 minutos se mide la conductividad del agua con objeto de realizar el seguimiento del proceso de diálisis del cultivo. Los datos se muestran en la figura 1, donde se puede observar una reducción del contenido en sales de aproximadamente 35 mg·L de cultivo$^{-1}$ transcurrida una hora de tratamiento. Esta cantidad se ha calculado según la fórmula:

$$\textbf{\textit{Reducción del contenido en sales del cultivo}} = \frac{(K_0 - K_t)}{K_0} \cdot 0.64$$

donde $K_0$ representa la conductividad inicial del cultivo en μS·cm$^{-1}$, $K_t$ representa la conductividad del cultivo en μS·cm$^{-1}$ medida a cualquier tiempo t, que para el dato anterior es una hora y 0.64 es el factor de conversión de unidades.

Segundo paso: Concentrado de la biomasa.

El mismo tubo conteniendo la muestra de cultivo recientemente dializada es introducido en un recipiente de 2 L de capacidad que contiene 250 ml de glicerol apto para el uso alimentario. Antes de comenzar el tratamiento de deshidratación y después entre 5 a 15 minutos de tratamiento se extraen la membrana con la muestra contenida en ella del recipiente que contiene el glicerol, se seca el exterior de la membrana con papel absorbente limpio y se pesan la bolsa y su contenido. Los datos obtenidos se muestran en la figura 2.

Resultado: La concentración del cultivo aumenta desde 0.5 g·L$^{-1}$ hasta 1.25 g·L$^{-1}$.

El flujo de agua durante los primeros 30 minutos de deshidratación osmótica con glicerol es de 2.9 L·h$^{-1}$·m$^{-2}$. Se obtiene un concentrado de células de *Porphyridium cruentum*, de muy bajo contenido en sales del cual puede obtenerse directamente

un extracto de β-ficoeritrina rompiendo las células con tampón e introduciéndolo después de centrifugarlo en una columna de lecho expandido según patente P201200502.

**Ejemplo 2**- Deshidratación osmótica de cultivos de microalgas de agua dulce procedentes de cultivos autotróficos y heterotróficos utilizando glicerol como fluido osmótico. Los cultivos de microalgas utilizados han sido: *Choricystis minor, Neochloris* sp. autotrófico y *Neochloris* sp. heterotrófico y *Scenedesmus* sp. autotrófico.

Para procesar 60 ml de muestra, se corta una tira de 40 cm de un tubo de membrana de diálisis (MWCO: 12-14.000, Standard Regenerated Cellulose (RC), 2 ml/cm y 16 mm de diámetro, Spectrum labs, USA). El tubo se sumerge durante 30 minutos en un recipiente que contiene agua desionizada para eliminar el conservante, según indicaciones del fabricante. Se cierra uno de los extremos del tubo con la pinza de cierre del tubo y se introducen los 60 ml de cultivo con la ayuda de una pipeta, cerrando al finalizar el otro extremo del tubo. El tubo es introducido en un recipiente de 2 L de capacidad que contiene entre 250 y 1000 g de glicerol, según el experimento. La relación másica glicerol: muestra (parámetro R indicado en las gráficas) utilizada cada vez ha sido: para *Neochloris* sp. procedente de cultivo autotrófico: 6.4, para *Neochloris* sp. procedente de cultivo heterotrófico: 6.8, para *Scenedesmus* sp. 21.4, y para *Choricystis minor*: 26.5. Antes de comenzar el tratamiento de deshidratación, cada 5 minutos durante la primera media hora y después a intervalos más espaciados de tratamiento se extrae la bolsa del recipiente que contiene el glicerol, se seca el exterior de la membrana con papel absorbente limpio y se pesan la bolsa y su contenido, llamando a la masa del cultivo más la bolsa al inicio $M_0$, y $M_t$ a dicha masa medida en cualquier tiempo t. El porcentaje de masa de líquido eliminado se ha calculado como:

$$\textbf{Porcentaje de masa de líquido eliminado} = \frac{M_0 - M_t}{M_0} \cdot 100$$

Los datos obtenidos han sido representados en la figura 3.

Transcurridas dos horas de tratamiento se logra la eliminación de más del 75% en peso del medio inicial. Resultados: Los flujos de agua obtenidos en los primeros 30 minutos de tratamiento se encuentran en el rango de 3.69 a 4.65 $L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$. Los cultivos al cabo de una hora han perdido entre el 55% y el 75% del volumen. En el caso por ejemplo de *Neochloris* sp. que comenzó el tratamiento teniendo una concentración de 2,5 $g \cdot L^{-1}$, al finalizar el mismo la concentración era de 7,5 $g \cdot L^{-1}$.

**Ejemplo 3**- Aplicación general: Deshidratación osmótica de cultivos de microalgas marinas e hipersalinas utilizando o bien glicerol o bien glicerol crudo sintético procedente de la síntesis de biodiesel como fluido osmótico. Los cultivos de microalgas utilizados han sido: *Picochlorum* sp, *Porphyridium cruentum* y *Dunaliella salina*.

Para procesar 60 ml de muestra, se corta una tira de 40 cm de un tubo de membrana de diálisis (MWCO: 12-14.000, Standard Regenerated Cellulose (RC), 2 ml/cm y 16 mm de diámetro, Spectrum labs, USA). El tubo se sumerge durante 30 minutos en un recipiente que contiene agua desionizada para eliminar el conservante, según indicaciones del fabricante. Se cierra uno de los extremos del tubo con la pinza de cierre del tubo y se introducen los 60 ml de cultivo con la ayuda de una pipeta, cerrando al finalizar el otro extremo del tubo. El tubo es introducido en un recipiente de 2 L de capacidad que contiene 250 g de glicerol puro o bien 250 g de glicerol crudo sintético de la siguiente composición: 80.5% (w/w) de glicerol (GPR Rectapur®, 98 g-100g de pureza), 10.1 % (w/w) de agua destilada, 5.2% (w/w) de cloruro de sodio (SigmaAldrich, AGS Grade, 99 g·100g de pureza), 0.4% (w/w) cloruro de potasio (SigmaAldrich, AGS Grade, 99 g·100g de pureza), 2% (w/w) metanol (Sigma Aldrich, 99,8g· 100 g de pureza), 2% (w/w) ácido oleico (Fluka). Antes de comenzar el tratamiento de deshidratación, cada 5 minutos durante la primera media hora y después a intervalos más espaciados de tratamiento se extrae la bolsa del recipiente que contiene el glicerol, se seca el exterior de la membrana con papel absorbente limpio y se pesan la bolsa y su

contenido. Llamando a la masa del cultivo más la bolsa al inicio $M_0$, y $M_t$ a dicha masa en cualquier tiempo t. El porcentaje de masa de líquido eliminado se ha calculado como:

$$\textbf{\textit{Porcentaje de masa de líquido eliminado}} = \frac{M_0 - M_t}{M_0} \cdot 100$$

Los datos obtenidos han sido representados en la figura 4.

Resultados: al cabo de una hora se han podido eliminar entre un 45% y un 55% de la masa total de medio y al transcurrir dos horas entre un 55% y un 65%.

RESUMEN

Concentración de cultivos de microalgas por un proceso de eliminación osmótica del medio utilizando disoluciones de glicerol.

La presente invención consiste en concentrar cultivos de microalgas mediante un proceso económico y de bajo consumo energético pudiendo reaprovechar el glicerol residual de la síntesis de biodiesel.

La disolución de glicerol constituye la solución osmótica, que se pone en contacto con el cultivo de microalgas a través de una membrana semipermeable. La diferencia de presión osmótica entre el cultivo y la disolución de glicerol hace que el agua se transfiera al glicerol, lográndose así, sin adición de químicos ni gasto energético adicional la concentración del cultivo.

Este procedimiento, permite que en los procesos posteriores al cultivo de microalgas se manejen menores volúmenes, con el subsecuente recorte en el gasto de equipos, suministros y energético.

Alternativas: centrifugación, floculación, ósmosis con agua de mar.

## REIVINDICACIONES

1. Proceso de concentración de cultivos de microalgas por eliminación osmótica del medio utilizando disoluciones de glicerol que consiste en permitir el paso del agua contenida en el caldo de cultivo a través de una membrana semipermeable hacia la disolución de glicerol.

2. Procedimiento según la reivindicación 1 caracterizado por, que las células a concentrar comprenden células cultivadas en medios acuosos.

3. Procedimiento de concentración de cultivos de microalgas, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado por, que utiliza como disolución osmótica glicerol o disoluciones acuosas de glicerol o glicerol crudo proveniente de un proceso de síntesis de biodiesel.

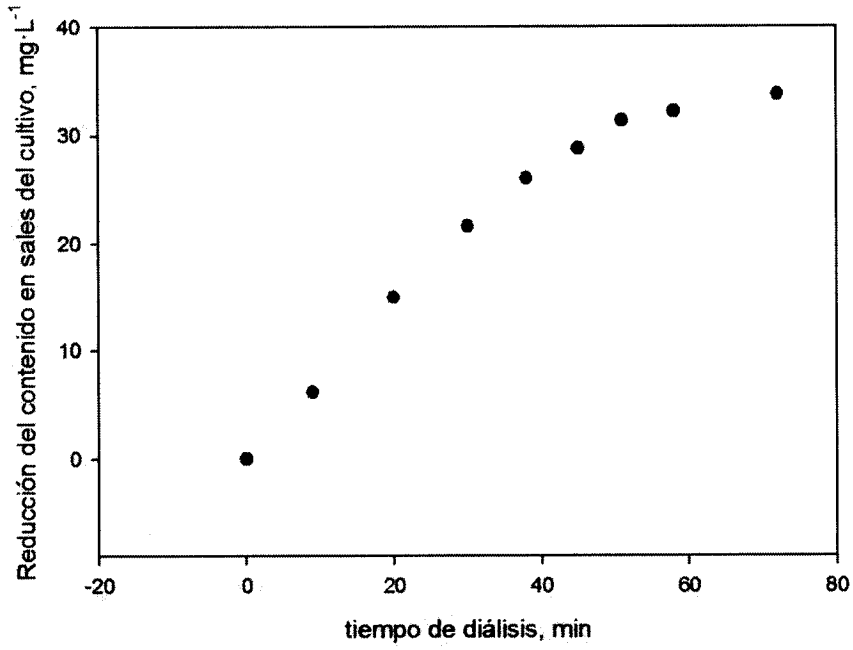


Figura 1.

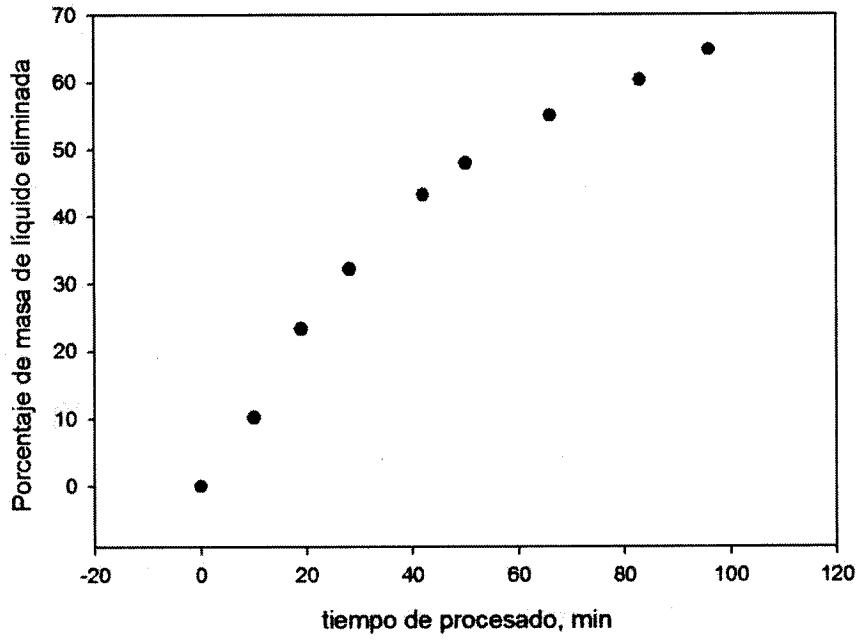


Figura 2.

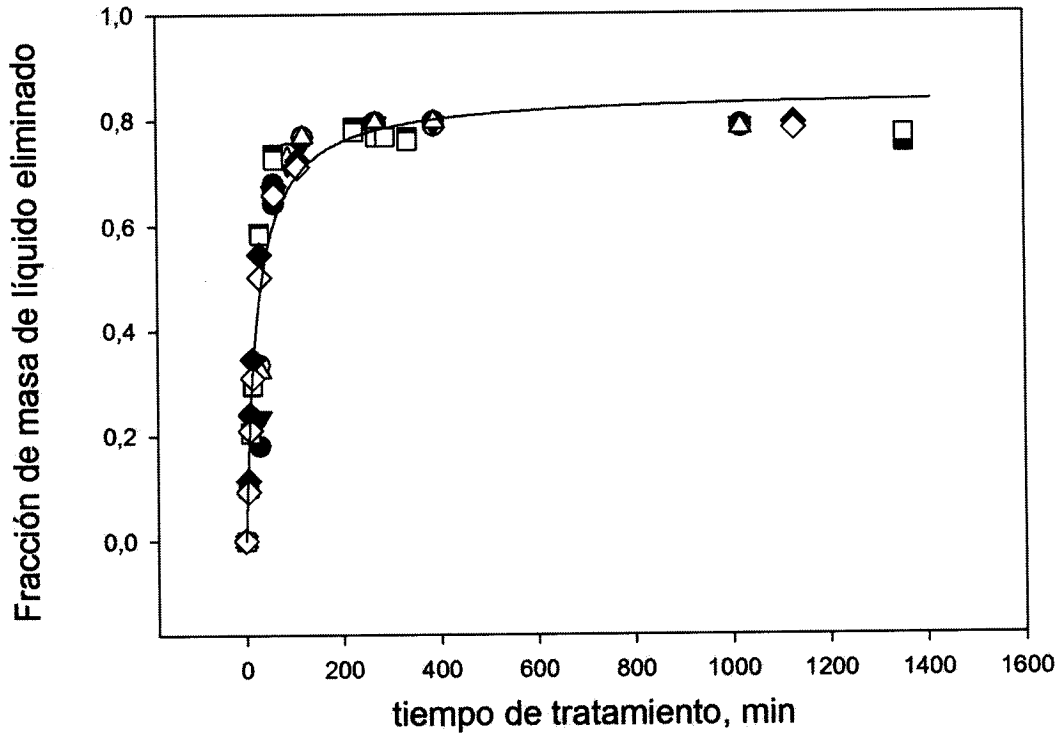


Figura 3.

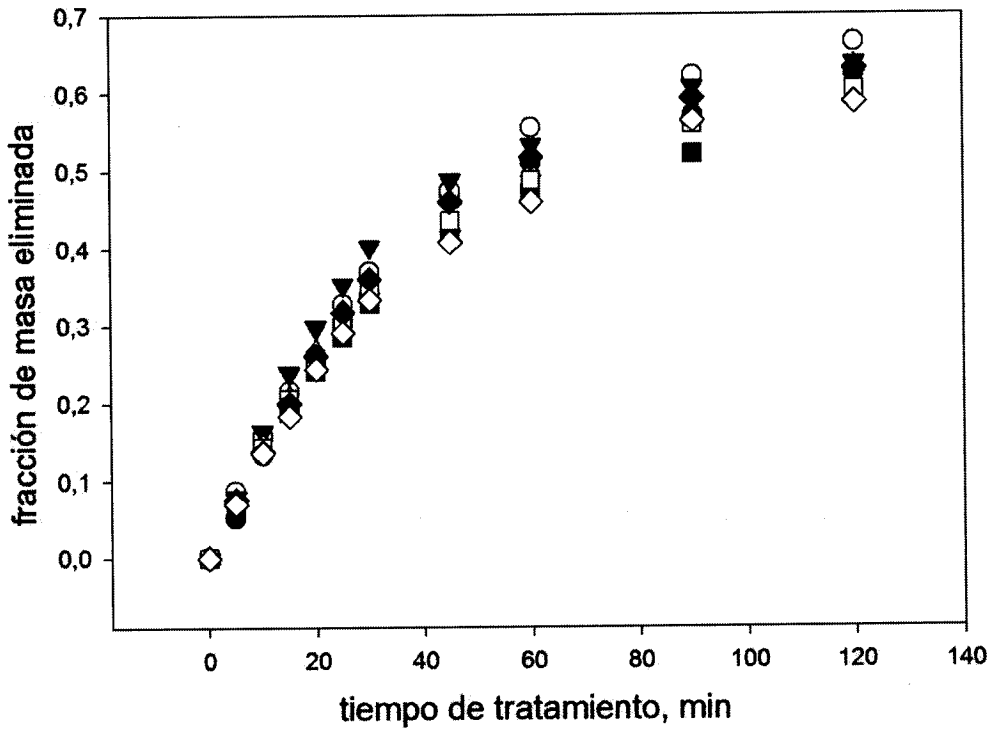


Figura 4.

MINISTERIO
DE INDUSTRIA, ENERGÍA
Y TURISMO

Oficina Española
de Patentes y Marcas

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
Universidad de Almería - OTRI
Ctra. de Sacramento s/n, Edf. Central
04120 Almería

Madrid, a 9 de octubre de 2014

**Traslado del Informe sobre el Estado de la Técnica de la solicitud de Patente Nacional 201400232**

La Oficina Española de Patentes y Marcas (OEPM), en cumplimiento con lo dispuesto en el artículo 29 del Reglamento de Ejecución de la Ley 11/1986 de Patentes (RD 2245/1986), le traslada el Informe sobre el Estado de la Técnica (IET) que incluye la Opinión Escrita correspondiente a la solicitud.

Los documentos citados en el Informe sobre el Estado de la Técnica y, en particular los documentos relativos a Literatura no Patente, pueden estar sujetos a Derechos de autor. La distribución de estos documentos ha de entenderse como parte de un procedimiento administrativo y como tal su transmisión debe entenderse a la luz del art. 31.bis 1 del Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia y que establece que "No será necesaria autorización del autor cuando una obra se reproduzca, distribuya o comunique públicamente con fines de seguridad pública o para el correcto desarrollo de procedimientos administrativos, judiciales o parlamentarios".

Antes de copiar o distribuir estos documentos, debe comprobarse si se requiere permiso del autor o editor u otro posible poseedor del derecho. Cuando no haya derechos de terceros afectados, los documentos podrán ser reproducidos junto con una indicación de la fuente.

El procedimiento continuará con la publicación en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial (BOPI) del anuncio de la publicación de la solicitud de patente y del anuncio de la publicación del IET. Dicha fecha de publicación le será notificada oportunamente.
Atentamente,

Fdo.: Ana María Redondo Mínguez
Jefe de Servicio de AA

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201400232

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 12.03.2014

(32) Fecha de prioridad:

# INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| **Categoría** | (56) **Documentos citados** | **Reivindicaciones afectadas** |
|---|---|---|
| A | US 2013341272 A1 (GORMLY SHERWIN et al.) 26.12.2013, párrafos 12,23,27-30; figura 1; reivindicaciones 1,8. | 1,2 |
| A | US 2011192073 A1 (KALE ANIKET) 11.08.2011, párrafos 114-119; figura 1. | 1,2 |
| A | SMITH, C et al. The effects of osmotic tissue dehydratation and air drying on morphology and energy transfer in two species of *Porphyra*. Plant Physiol, 1986, vol. 80, páginas 843-847. | |
| A | US 6033887 A (CHARPENTIER MONIQUE) 07.03.2000, columna 10, líneas 56 – columna 11, línea 19. | |
| A | US 2013220581 A1 (HERRON JOHN R et al.) 29.08.2013, párrafos 18-43. | |
| A | MILLEDGE, J.J. y HEAVEN, S. A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. Rev. Environ Sci Biotechnol., 2013, vol. 12, páginas 165-178. | |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

| **Fecha de realización del informe** | **Examinador** | **Página** |
|---|---|---|
| 09.10.2014 | A. I. Polo Díez | 1/4 |

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

***C12N1/12*** (2006.01)
***C12N1/02*** (2006.01)
***B01D61/00*** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, B01D

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, HCAPLUS, BD-TXTE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.10.2014

**Declaración**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)** | Reivindicaciones | 1-3 | **SI** |
| | Reivindicaciones | | **NO** |
| **Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)** | Reivindicaciones | 1-3 | **SI** |
| | Reivindicaciones | | **NO** |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|---|---|---|
| D01 | US 2013341272 A1 (GORMLY SHERWIN et al.) | 26.12.2013 |
| D02 | US 2011192073 A1 (KALE ANIKET) | 11.08.2011 |
| D03 | SMITH, C et al. | 1986 |
| D04 | US 6033887 A (CHARPENTIER MONIQUE) | 07.03.2000 |
| D05 | US 2013220581 A1 (HERRON JOHN R et al.) | 29.08.2013 |
| D06 | MILLEDGE, J.J. y HEAVEN, S | 2013 |

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la invención, según la primera reivindicación, es un procedimiento para concentrar cultivos de microalgas que utiliza una disolución de glicerol y una membrana semipermeable que permite el paso del agua del caldo de cultivo de las microalgas hacia la disolución de glicerol.

Las reivindicaciones dependientes 2 a 3 concretan algunos detalles del procedimiento.

**Novedad y actividad inventiva (art 6.1 y 8.1 de la L.P)**

El documento D1 describe un sistema de concentración o deshidratación de soluciones de biomasa (microalgas) que incluye una etapa de ósmosis utilizando una membrana semipermeable y una solución con un agente osmótico, mencionándose entre estos últimos la sal o el azúcar (párrafos 12, 23, 27-30, figura 1, reivindicaciones 1, 8)

El documento D2 se refiere a un procedimiento para llevar a cabo una extracción de lípidos y proteínas de un cultivo de microalgas. Previamente a la extracción, la biomasa de algas se debe concentrar desecándola por cualquier método conocido. Un método especialmente recomendado es la desecación con solventes orgánicos miscibles en agua como el etanol, el glicerol, etc. Las microalgas en contacto con estos solventes sedimentan, eliminando luego el solvente y el agua por sifonación o decantación (párrafos 114-116, 119)

El documento D3 realiza una deshidratación osmótica de macroalgas marinas utilizando agua salada con una concentración salina de diez veces el agua de mar.

En el documento D4 se divulga unas esferas de alginato que contienen microorganismos, preferiblemente levaduras de vinificación, que han sido desecadas para su conservación y posterior uso. En la descripción (columna 10, líneas 56-columna 11, línea 19), se explica que las esferas de alginato se someten a una deshidratación osmótica utilizando glicerol, glucosa o sacarosa o combinaciones de estos productos. Al cabo de un tiempo en contacto con cualquiera de ellos las esferas sedimentan y se pueden separar y secar.

En el documento D5 se utiliza la un procedimiento de ósmosis para el obtener agua de reposición para torres de enfriamiento. El procedimiento consiste en emplear disoluciones de diferentes orígenes (agua salada, aguas residuales, zumos, etc.) y ponerlas en contacto a través de una membrana semipermeable con un agente osmótico (preferiblemente glicerol). El agua pasa a través de la membrana de las disoluciones hacia la solución con el osmolito lográndose concentrar las disoluciones entrantes y aprovechar el agua para agua de reposición (párrafos 18, 30-43).

El documento D6 es una revisión sobre los procedimientos de cosechado y deshidratado de las microalgas.

Ningún documento del estado de la técnica describe un procedimiento como el descrito en la reivindicación 1 que utilice para concentrar microalgas una disolución de glicerol y una membrana semipermeable.

Por ello, tanto la primera reivindicación como las reivindicaciones dependientes 2 y 3 cumplen el requisito de novedad.

El documento D1 es el más cercano del estado de la técnica ya que trata de concentrar microalgas mediante un procedimiento osmótico en el que se utiliza como agente osmótico el agua o el azúcar. La diferencia de este documento con la solicitud es que en esta se utiliza glicerol, lo que a diferencia del agua con sal permite utilizarlo con microalgas marinas y aprovechar el glicerol residual de los procesos de obtención de biodiesel. Aunque el glicerol se ha utilizado para deshidratar microalgas (D2) o esferas de alginato (D4) o como osmolito en combinación con membranas semipermeables en procesos de ósmosis forzada para obtención de agua de reposición (D5), ninguno de estos procesos sugiere su utilización para concentrar microalgas u organimos marinos en un procedimiento como el de la reivindicación 1 de la solicitud, en el que el agua salada del cultivo de microalgas debe pasar a través de una membrana semipermeable hacia la disolución de glicerol.

En consecuencia, se considera que las tres reivindicaciones cumplen el requisito de actividad inventiva, pues la invención no resulta evidente para un experto en la materia a la vista del estado de la técnica.