

(12)

SOLICITUD de PATENTE

(43) Fecha de publicación: **08/10/2009** (51) Int. Cl: **C12P 21/00** (2006.01)
(22) Fecha de presentación: **08/07/2009** (86) Número de solicitud PCT: **BR 08/00004**
(21) Número de solicitud: **2009007354** (87) Número de publicación PCT: **WO 2008/083453 (17/07/2008)**

(30) Prioridad(es): **08/01/2007 BR PI 0700179-7**

(71) Solicitante:
**OURO FINO PARTICIPAÇÕES E EMPREENDIMENTOS
S.A.
Avenida Independência 3320 Sala 24 14025-230
Ribeirão Preto-SP BR**

(72) Inventor(es):
**CARLOS RICARDO SOCCOL
Rua Pedro Demeterco, 1020, Jardim Das Américas
Curitiba-PR 81530-320 BR
CRISTINA ELISABETE KNOERR
JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA**

(74) Representante:
**JOSE ANTONIO MIRANDA LAMADRID*
Campos Eliseos No. 345, 3er. Piso Distrito Federal
11560 MX**

(54) Título: **PROCESO PARA PRODUCIR BIOMASA Y PROTEINAS MEDIANTE MICROALGAS.**

(54) Title: **PROCESS TO PRODUCE BIOMASS AND PROTEINS BY MICROALGAE.**

(57) Resumen

La presente invención se refiere a un proceso para producir biomasa y proteínas de microalgas, ventajosamente usando como una fuente de desarrollo de dicha microalga los desperdicios de la industria del alcohol, notablemente de las cascarillas de caña de azúcar y del dióxido de carbono que se origina de las cubas de fermentación. El proceso de acuerdo a la presente invención comprende los pasos básicos de la preparación de cascarillas de caña, la adaptación y preparación del inóculo con la microalga *Spirulina platensis* OF 25, el cultivo de la microalga bajo condiciones controladas y el uso de CO₂, la separación de la biomasa de algas y la recirculación opcional de la fase de agua y el proceso hasta que son alcanzados los niveles DQO y DBO aceptables por los reglamentos ambientales.

(57) Abstract

The present invention refers to a process to produce biomass and proteins from microalgae, advantageously using as a source of development of said microalgae rejects from the alcohol industry, notably sugar cane husks and carbon dioxide originating from fermentation vats. The process according to the present invention comprises basic steps of preparation of cane husks, adaptation and preparation of inoculum with the microalga *Spirulina platensis* OF 25, cultivation of the microalga under controlled conditions and use of CO₂, separation of algal biomass and optional recirculation of the water phase in the process until acceptable DQO and DBO levels by environmental regulations are reached.

PROCESO PARA PRODUCIR BIOMASA Y PROTEÍNAS MEDIANTE MICROALGAS

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a un proceso para producir biomasa y proteínas de microalgas, ventajosamente usando como un medio de cultivo de dichas microalgas los desechos de las industrias de alcohol y del azúcar, notablemente las cascarillas de caña de azúcar y el dióxido de carbono que se
10 origina de las cubas de fermentación.

 El proceso de la presente invención también contribuye como una solución para reducir la emisión de cargas contaminantes a los cursos de agua, la desertificación del suelo
15 mediante la combinación de minerales, ya que el presente proceso ofrece una reducción drástica de los valores DQO (demanda de oxígeno químico) y DBO (demanda de oxígeno químico) como esta presente en las cañas de azúcar, así como la emisión de cargas contaminantes a la atmósfera, teniendo en mente el reuso del
20 dióxido de carbono (CO₂) del proceso de fermentación.

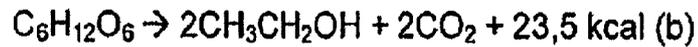
Antecedentes de la Invención

 En Brasil, el etanol es solo producido por medio
25 de procesos de fermentación, en donde las levaduras transforman el jugo, las melasas y/o una mezcla de jugo de caña de azúcar y las melasas en etanol. Esto es un proceso biológico el cual

puede ser representado por medio de la ecuación estequiométrica de Gay Lussac, como se reproduce abajo:



5



La ecuación (b) muestra que, por cada 180 gramos de azúcar consumidos, son producidos 93 gramos de etanol y 88
10 gramos de bióxido de carbono.

Al final de la fermentación, el líquido obtenido es nombrado vino. El vino, o el jugo fermentado, tiene una concentración de etanol, un porcentaje por volumen el cual puede
15 ser de entre 6 grados y 10 grados GL, además de otros componentes líquidos, sólidos y gaseosos. Dentro del vino, además del alcohol (etanol), nosotros podemos encontrar agua bajo tasas las cuales pueden variar de entre 89 por ciento y 93 por ciento, minerales y otras sustancias bajo concentraciones
20 más bajas. El alcohol como está presente en tal vino es recuperado en la parte superior de las columnas de destilación, en donde las sustancias volátiles presentes son separadas por sus puntos diferentes de ebullición. Las cascarillas de caña son tomadas en la base de dichas columnas y constituyen un
25 residuo líquido, generado bajo una proporción promedio de 12 a 15 litros para cada litro de alcohol hidratado producido. El residuo líquido, rico en minerales, entre otros químicos,

representa la fuente más grande de contaminación en la industria del alcohol (etanol) como se obtiene por procesos de fermentación.

5 La composición de las cascarillas de azúcar depende de varios factores, tal como la composición de la materia prima, las características y modo de operación de las columnas de destilación. La tabla 1 presenta características cualitativas y cuantitativas de cascarillas de caña que se
10 originan del mosto de jugo, mosto de melasas y mosto mezclado como se recolecta en plantas en el Estado de Sao Paulo.

Tabla 1 - Caracterización Físico-Química de las cascarillas de azúcar (promedio de 64 muestras de 28 plantas en
15 el Estado de Sao Paulo - Fuente: ELIA NETO, A. & NAKAHODO, T. (en Relatório da Copersucar, Proyecto No. 95000278, Piracicaba, 1995-26 p).

Parámetro	Unidad	Valor Mínimo	Valor Promedio	Valor Máximo	Estándar /l de Alcohol
20 Datos de Proceso					
Brix de Mosto	°B	12,00	18,65	23,65	
Contenido de alcohol de vino	°GL	5,73	8,58	11,30	
Pesa de cascarilla de azúcar	(l/l de alcohol)	5,11	10,85	16,43	10,851
Flujo de referencia	m³/ata	530,00	1906,88	4128,00	
25 Características de cascarilla de azúcar					

	pH	-	3,50	4,15	4,90	
	Temperatura	°C	65	89,16	110,5	
	BOD	mg/l O ₂	6680,00	16949,76	75330,00	175,13g
	PVO	mg/l O ₂	9200,00	28450,00	97400,00	297,60g
5	Sólidos totales (ST)	mg/l	10780,00	25154,71	38680,00	268,90g
	Sólidos totales en suspensión (STP)	mg/l	260,00	3966,84	9500,00	45,71g
	Sólidos fijos en suspensión (SFP)	mg/l	40,00	294,38	1500,00	2,69g
	Sólidos volátiles en suspensión (SVP)	mg/l	40,00	3632,16	9070,00	43,02g
10	Sólidos disueltos totales (SDT)	mg/l	1509,00	18420,06	33680,00	223,29g
	Sólidos volátiles disueltos (SDV)	mg/l	588,00	6579,78	15,000,00	77,98g
	Sólidos disueltos fijos (SDF)	mg/l	921,00	11872,36	24,020,00	145,21g
	Residuos que pueden coagular (RC) (1 hora)	mg/l	0,20	2,29	20,00	2481mL
15	Calcio	mg/l CaO	71,00	515,25	1096,00	5,38g
	Cloruro	mg/l Cl ₂	480,00	1218,91	2300,00	12,91g
	Cobre	mg/l CuO	0,50	1,20	3,00	0,01g
	Hierro	mg/l Fe ₂ O ₃	2,00	25,17	200,00	0,27
	Total fósforo	mg/l P ₂ O ₅	18,00	60,41	188,00	0,65g
20	Magnesio	mg/l MgO	97,00	225,64	456,00	2,39g
	Manganeso	mg/l MnO	1,00	4,82	12,00	0,05g
	Nitrógeno	mg/l N	90,00	356,63	885,00	3,84g
	Nitrógeno en amoníaco	mg/l N	1,00	10,94	65,00	0,12g
	Potasio total	mg/l K ₂ O	814,00	2034,89	3852,00	21,21g
	Sodio	mg/l Na	8,00	51,55	220,00	0,56g
	Sulfato	mg/l SO ₄	790,00	1537,66	2800,00	16,17g
25	Sulfato	mg/l SO ₄	5,00	35,90	153,00	0,37g
	Zinc	mg/l ZnO	0,70	1,70	4,60	0,02g

Formal	mg/l	0,10	0,88	119,00	9,1ml.
Glicerol	mg/l	2,60	5,89	25,00	62,1ml.
Formal (base seca)	mg/l	114,01	403,56	1500,15	44,1g.

5 Las cascarillas de caña contienen minerales, materia orgánica y agua estando caracterizadas como un residuo altamente agresivo al ambiente por tener niveles altos de demanda de oxígeno químico y de demanda de oxígeno bioquímico. Hasta el final de los años de 1970, cuando la práctica fue

10 prohibida, los volúmenes crecientes de las cascarillas de azúcar fueron lanzados a los manantiales de superficie, principalmente a los cursos de agua tal como los ríos, las corrientes y ríos pequeños, cerca de las plantas de azúcar y de alcohol. Los efectos causados por dicha práctica se han conocido por mucho

15 tiempo. La carga orgánica como se presentó en las cascarillas de caña provoca la proliferación de microorganismos que consumen el oxígeno como se disuelve en el agua destruyendo la flora y la fauna y provocando dificultades para el uso de fuentes de suministro de agua que puede beberse. Además, la descarga de

20 las cascarillas de caña en los cursos de agua provoca un mal olor y contribuye a empeorar varias enfermedades de parásitos endémicas.

Los estimados muestran que la producción de Brasil

25 de cascarillas de caña para la cosecha de 2006/2007 ha sido de alrededor de 190 billones de litros. Actualmente, el destino de las cascarillas de caña ha sido su pulverización en la tierra,

particularmente en las plantaciones de caña de azúcar y/o su almacenamiento en lagunas de depuración. Sin embargo, el rociado continuo de las cascarillas de caña en las tierras, aún a dosis pequeñas pueden provocar la saturación de catión, especialmente de potasio provocando la lixiviación de sus componentes en las aguas subterráneas. El potasio por sí mismo no es un contaminante de las aguas y de las aguas subterráneas, pero su presencia a altas concentraciones en la tierra favorece la aparición de químicos los cuales, con las cargas neutrales, son fácilmente lixiviados. El complejo formado entre $(K)^+$ y $(NO_3)^-$ proporciona muchas de las preocupaciones ambientales, ya que el nitrato es un contaminante importante para las aguas de superficie subterráneas.

En Brasil, los organismos gubernamentales intentan el imponer restricciones al manejo de dichas cascarillas de caña desde 1978, prohibiendo la descarga de las cascarillas de caña en las aguas de superficie. Una de dichas reglas que regula el uso de las cascarillas de caña establece que las cascarillas de caña pueden solo ser aplicadas a la tierra cuando la concentración de catión total (CTC) para la tierra está abajo de 5%. Si ese valor ya se ha alcanzado, la regla solo permite el uso de una dosis de potasio equivalente al consumo por caña de azúcar en el año en comento, por ejemplo cascarillas de caña equivalente a 185 kilogramos/ha de K_2O . Con tales reglamentos en vigor, varias áreas de cultivo de caña de azúcar sufren restricciones, y el sector ya desarrolla proyectos con el objeto

de transportar las cascarillas de caña a distancias más grandes de lo que se usan actualmente.

Una de las soluciones que está siendo estudiada lidia con la concentración de las cascarillas de caña como una forma para reducir los costos de transporte. El uso del conocimiento técnico/científico para manejar mejor dichas cascarillas de azúcar, teniendo como objetivo un uso más racional con menos impacto ambiental es de vital importancia.

10

Estado del Arte

Las microalgas son organismos que contienen clorofila las cuales realizan la fotosíntesis, cubriendo una variación morfológica, estructural y metabólica amplia, aún incluyendo unos pocos grupos procarióticos. Una amplia parte de estos organismos se encuentra libremente en el agua, formando parte de la fitoplantación, y es la base de la cadena alimenticia en los ecosistemas de agua, siendo responsables por hasta 50% de la fijación de carbón y producción de oxígeno sobre el planeta (OLIVEIRA, A., *Crescimento das diatomáceas bacillario phyceae Chaetocerus sp., Skeletonema costatum e Thalassiosira fluvia tilis em diferentes meios de cultura e em condições controladas de temperatura e salinidade*. Monografía de clase de maestro en cultivo de agua, Departamento de Cultivo de Agua, Universidad Federal de Santa Catarina, Florianopolis, 1993).

Las microalgas han sido clasificadas tradicionalmente bajo varios criterios tales como tipos de pigmentos, la naturaleza química de los productos de reserva y los constituyentes de pared de célula (TOMASSELI, L. La célula microbial en RICHMOND, A. (Editores) texto de cultivo de microalgas: biotecnología y ficología aplicada. Oxford: Ciencia Blackweel Science, página 3-19, 2004). Las microalgas forman un grupo heterogéneo de organismos que cubren todos los microorganismos fotosintetizadores, mediante el hacerlos eucarióticos o procarióticos. Estos son usualmente unicelulares y gram negativos.

El número de especies de microalgas es muy grande, pero aún desconocido. Se estima que puede haber entre 200,000 y unos pocos millones de especies. Las microalgas son fuentes ilimitadas de biomoléculas de interés alimenticio farmacéutico, así como de otras sustancias, comercialmente interesantes (PULZ, O., GROSS, W. Productos valiosos de biotecnología de microalgas. Microbiología y Biotecnología aplicadas, 65 (6), páginas 635-648, 2004).

De acuerdo a RICHMOND, A. Texto de Cultivo de Masa Microalgal, CRC Prensa, U.S.A., 1986, la producción de microalgas puede ser justificada por numerosas ventajas entre estas que pueden estar las que resaltan:

- procesos biológicos deficientes para transformar la energía de sol en materia orgánica y muchas especies crecen más rápidamente que las plantas terrestres lo cual permite la producción de biomasa superior;

5

- su naturaleza de unicélula segura la biomasa con una composición bioquímica única la cual no ocurre con las plantas terrestres, presentado compuestos localizados en partes específicas tales como frutas, hojas, semillas o raíces;

10

- mediante el controlar las condiciones de cultivo ambiental tal como luz, temperatura y nutrientes, muchas especies pueden ser inducidas a sintetizar y acumular concentraciones altas de proteínas, carbohidratos, lípidos, etc.

15 Estos compuestos tienen un alto valor comercial principalmente por ser considerados como de origen natural;

- estas pueden crecer bien en regiones con condiciones de clima extremo. Los cultivos se pueden desarrollar bajo el mar o aguas de estuario, las cuales no pueden ser empleadas convencionalmente en el cultivo de plantas con valor agrícola, o con aguas residuales que se origina de varios procesos de producción tal como la agricultura, el cultivo de ganado, el desperdicio industrial y doméstico;

25

- el ciclo de vida de la mayoría de las microalgas es completado dentro de unas pocas horas,

favoreciendo por tanto la selección de sepas y la mejora genética de las especies.

En relación a la nutrición, para el crecimiento
5 óptimo, las microalgas requieren un número de nutrientes. Entre los diferentes géneros y especies, ocurren muchas variaciones principalmente relacionadas a la cantidad de nutrientes en el medio. Aún así, estas necesidades nutricionales dependen de las condiciones ambientales diferentes (ABALDEJ, C. A., FIDALGO. J.
10 P., TORRES, E., HERRERO, C. Microalgas: Cultivo y aplicaciones. La Coruña: Servicio de Publicaciones, página 210, 1995. Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. La Coruña: Servicio de Publicaciones páginas 210, 1995). Los macronutrientes requeridos por las microalgas son carbón, nitrógeno, oxígeno,
15 hidrógeno y fósforo, además de calcio, magnesio, sulfuro y potasio. En relación a los nutrientes, estos usualmente requieren hierro, manganeso, cobre, molibdeno y cobalto, mientras que unas pocas microalgas también requieren concentraciones de vitamina bajas en el medio de cultivo
20 (GHILLARD, R. R. L. Cultivo de fitoplancton para alimentar invertebrados marinos. En: SMITH, W. L., CHANLEY, M. H. (editores), Cultivo de Animales Invertebrados Marinos, Plenum Press, New York, páginas 29-60, 1975).

25 Los elementos nutricionales más importantes son el carbón, nitrógeno, fosfatos, y sales de magnesio, potasio y calcio. Los elementos a bajas concentraciones tales como

manganeso y cobalto son indispensables en varias actividades metabólicas importantes. Las fuentes de carbón más importantes son los carbohidratos. El nitrógeno se encuentra en el material protéico y sus productos de degradación, siendo suministrados a
5 través de sales de amoniaco.

Las espirulinas son clasificadas como seres inmóviles procarióticos sin esporas. Su naturaleza procariótica, sus pigmentos ficobiliprotéicos y la producción de
10 oxígeno mediante fotosíntesis las hace diferentes de las algas eucarióticas y de las bacterias fotosintéticas. Las espirulinas viven en un medio líquido, rico en minerales, principalmente compuesto de bicarbonato de sodio y carbonato, con el pH de entre 8 y 11. Las regiones tropicales y subtropicales,
15 calientes y soleadas, son ideales para su cultivo. Además, dichas microalgas son usadas como una fuente de alimentos en la dieta humana, en la dieta animal, teniendo contenidos de proteína altos y conteniendo todos los aminoácidos esenciales bajo proporciones siguiendo las recomendaciones de la FAO
20 (Organización de Alimentos y Agricultura) un Organismo de las Naciones Unidas.

Específicamente, la espirulina microalga es una cianobacteria filamentosa con 1 a 12 μm de diámetro, localizado
25 espiralmente, hasta de 1 milímetro de largo (TOMASELLI, I., Morfología, ultraestructura y taxonomía de *Arthospira* (Espirulina). Fisiología, biología de célula y biotecnología.

Londres: Taylor & Francis, ISBN 0-484-0674-3, 1997). Las
ocurrencias naturales de la espirulina se encuentran en los
lagos de Chad y Africa Central, en Texcoco en México, en Nakaru
y Elementeita en Kenia, y Aranguadi en Etiopia (VONSHAK, A. una
5 espirulina platensis (Arthospira) Fisiología, biología de célula
y biotecnología. Londres: Taylor & Francis, ISBN 0-484-0674-3,
1997). En Brasil la ocurrencia de la espirulina en la laguna de
Mangueira Río Grande do Sul (DURANTE, A. J., REICHERT, C. C.,
DALCANTON, F., MORAIS, M. Aislamiento y cultivo de una cepa de
10 espirulina nativa de la Laguna de Mangueira e influencia de la
espirulina platensis en el crecimiento de una cianobacteria,
toxigénica. Trabajo de conclusión del curso de graduación en
la ingeniería de alimentos, FURG, Río Grande, 2003).

15 La espirulina se resalta así misma entre otras
microalgas, principalmente debido a su contenido de proteína,
vitaminas como B₁₂ y pigmentos como ficocianina y β-caroteno.
Dicha microalga es conocida como GRAS (generalmente reconocida
como segura) por la FDA de los Estados Unidos de América
20 (Administración de Alimentos y Drogas). El contenido de
proteína en la biomasa seca varía de entre 64 y 74%. Estas
proteínas son consideradas como completas, ya que estas tienen
todos los aminoácidos esenciales, resumiendo hasta 47% del peso
de proteína total (COHEN, Z. Los químicos de espirulina. En:
25 (VONSHAK, A. una espirulina platensis (Arthospira) Fisiología,
biología de célula y biotecnología. Londres: Taylor & Francis,

ISBN 0-484-0674-3, 1997). Los sulfuro aminoácidos, metionina y cistina, están presentes en una concentración inferior y aún así representan más de 80% del nivel ideal como se recomendó por la Organización de Alimentos y Agricultura. La biomasa de
5 espirulina en comparación con otros alimentos en términos de proteína es un promedio de 65% arriba de cualquier alimento natural (FALQUET, J. Los aspectos nutricionales de espirulina. Tecnología Antena, 1997. <http://www.antenna.ch>). La NPU (utilización de proteína neta) es experimentalmente dada
10 mediante el calcular el porcentaje de nitrógeno retenido cuando la fuente de proteína investigada es solo el factor nutricional limitante. La utilización de proteína neta para la espirulina varía de entre 53 y 61% u 85 y 92% de utilización de proteína neta de caseína como estándar de huevo original. La PER
15 (proporción de eficiencia de proteína) es la proporción entre la ganancia de masa del animal que esta siendo estudiado, usualmente ratas y la masa de proteínas ingeridas. La proporción de eficiencia de proteína para la espirulina varía de entre 1.80 y 2.60, en contra de la proporción de eficiencia de proteína de
20 2.50 para la caseína de huevo (Falquet, 1997). La espirulina en oposición a otras microalgas, no tiene una pared de célula de celulosa sino que más bien un sobre de mureína relativamente quebradizo. La falta de una pared de célula es una ventaja desde el punto de vista de conservar la integridad de los
25 componentes tal como las vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados ya que esta evita el uso del cocinado para hacer a los nutrientes disponibles (Falquet, 1997). Las moléculas

simples tal como la glucosa, la fructuosa, y la sucrosa están presentes en pequeñas cantidades. Desde el punto nutricional de vista, el único carbohidrato que ocurre en cantidades interesantes es el mesoinsitol fosfato, una fuente excelente de fósforo e inositol orgánico (QUILLET, M. Investigaciones sobre las sustancias glucídicas elaboradas por las espirulinas. Ann Nutr. Aliment. 29. No. 1, páginas 553-561, 1975). Los ácidos nucleicos son usualmente un factor limitante para el consumo de proteínas con origen microbiano ya que durante su metabolismo a través del organismo, es producido el ácido úrico, y las altas tasas pueden causar problemas de gota. Es aconsejable que la ingestión de ácidos nucleicos no supere 4 gramos por día, en caso de una persona adulta. La concentración de ácidos nucleicos en la biomasa de la levaduras es de alrededor de 23%, mientras que en los ácidos nucleicos de espirulina puede variar de entre 4.2 y 6% sobre el peso de la biomasa seca. Por tanto, una ingestión diaria superior de 80 gramos de espirulina puede ser posible para alcanzar el límite diario de ácidos nucleicos. Esta cantidad es de alrededor de ocho veces superior que la dosis de microalgas como se recomendó por el suministro de alimentos (FOX, R. D. Producción y potencial de espirulina. Francia, Edisud, ISBN 2-84744-883-x, 1996). La espirulina produce concentraciones altas de vitamina B12, a alrededor de 11 miligramos por kilogramo de biomasa seca. Las carnes pueden contener concentraciones considerables de dicha vitamina, pero esta está prácticamente ausente en los vegetales (CIEFFERRI, O. Espirulina el microorganismo comestible. Microbiol. Rev. 47,

página 551, 1983). La pro-vitamina A, o el β -caroteno, representa alrededor de 80% de los carotenoides, están presentes en la espirulina. En un kilogramos de biomasa seca de espirulina, la concentración de β -caroteno, es de alrededor de 5 700 y de 1,700 miligramos. La biomasa de espirulina también contiene tocoferoles con polvo antioxidante, a alrededor de 50-190 miligramos/kilogramo sobre la base seca, por ejemplo, niveles comparables al germen de trigo. La espirulina también contiene cantidades bajas de niacina, ácido fólico, ácido 10 pantoténico y biotina (Cohen, 1997). La biomasa de espirulina también es rica en minerales tal como calcio, hierro, fósforo, magnesio y potasio. En términos de los niveles de calcio, hierro y fósforo, los contenidos son similares a la leche. La espirulina contiene contenidos de hierro superiores que los 15 cereales (Falquet, 1997).

Generalmente hablando, las algas necesitan luz, agua, minerales y una cierta cantidad de dióxido de carbono (CO_2) para crecer.

20

De este conocimiento, y a través de los estudios prolongados y experimentos, el solicitante ha concluido que el uso de las cascarillas que se originan de la destilación del mosto en las plantas de alcohol, así como el CO_2 del proceso de 25 fermentación, presenta un gran potencial para producir biomasa de alga de varios géneros y especies, notablemente espirulina,

para la aplicación en los alimentos humanos y animales así como para la producción de otras moléculas de interés comercial.

Síntesis de la Invención

5

Las microalgas, cuando se cultivan en medios apropiados, pueden duplicar su biomasa diariamente. Esta característica, agregada a las habilidades de cultivo simple, hacia la microalga el objeto principal de interés de la presente
10 invención.

La presente invención tiene por tanto el objeto específico de proporcionar un proceso para producir biomasa y proteínas de microalgas, ventajosamente usando cascarillas de
15 caña y dióxido de carbono originándose de fermentadores, como se generan por la industria del alcohol, como un medio o sustrato de cultivo.

Más específicamente, la presente invención tiene
20 el objeto de proporcionar un proceso para producir biomasa de microalgas de cascarillas de azúcar y dióxido de carbono, generado como desperdicios por la industria del alcohol, usando la caña de azúcar y sus derivados.

25 Aún más específicamente, la presente invención tiene el objeto de proporcionar un proceso de producción de microalgas de cascarillas de caña y de dióxido de carbono

generado como desperdicios en la industria del alcohol mediante el uso de caña de azúcar y de sus derivados, siendo las microalgas seleccionadas de uno o más géneros (especies) del grupo que comprende espirulina (sp, *platensis*, *maxima*, *major*,
5 *subsalsa*, *geitleri*, *subtilissima*, *labyrinthiformis*); *Skeletonema* sp; *Chaetoceros* sp; *Scenedesmus* sp (*bijugatus*, *incrassatulus*, *ocultus*, *quadricauda*, *dimorphus*); *Anacystis* sp (*nidulans*, *cyanea*, *thermalis*); *Porphyridium* *cruentum*; *Cryptothecodinium* *cognii*; *Euglena* sp (*gracilis*); *Cryptothecodinium* *cohnii*;
10 *Haematococcus* *pluvialis*; *Anabaena* sp (*variabilis*, *cylindrica*, *hassali*, *planctonica*); *Dunaliella* sp (*salina*, *bardaeil*, *tertioleta*); *Chlamydomonas* sp (*reinhardii*); *Chlorella* sp (*vulgaris*, *kessleri*, *pyrenoidosa*, *mannophila*, *protothecoides*, *salina*, *homosphaera*, *stigmatophora*, *luteoviridis*, *regularis*,
15 *ellipsoidea*, *variegata*, *sorokiniana*, *emersonii*); *Trichodesmium*, *Microcoleus*; *Ankistrodesmus* sp (*densus*, *braunii*, *falcatus*, *fusiformis*, *gracilis*); *Isochrysis* *galbana* (Parke); *Tetraselmis* sp (*tetrathele*, *suecia*); *Oscillatoria* sp (*limnetica*, *curviceps*, *splendida*); *Nostoc* *muscorum* y *Botryococcus* *braunii*. Sin embargo,
20 la presente invención puede comprender otros géneros (especies) de más de aquellos reportados aquí.

Un objeto especialmente contemplado por la presente invención es el uso de espirulina *platensis* OF 25 en un
25 proceso para producir biomasa y proteínas de cascarillas de caña y dióxido de carbón generado como desperdicios en la industria del alcohol/etanol.

Por tanto, en síntesis, la presente invención tiene los objetos de reciclar y usar las cascarillas de caña como un medio de cultivo para la producción de biomasa de alga rica en proteínas y otros productos con interés comercial, notablemente la biomasa de espirulina, así como para hacer el efecto de CO₂ que se origina de los cubos de fermentación en el cultivo de dichas microalgas y para promover la reducción de los niveles DQO y DBO de las cascarillas de caña como se descargan en el proceso de fermentación.

Descripción de las Figuras

Las figuras anexas servirán para proporcionar un mejor entendimiento de los objetos y procesos de la presente invención. Unos de estos se refieren al cultivo de la microalga *espirulina platensis* OF 25, pero deberá de entenderse que el proceso no es ni exclusivo ni está limitado al cultivo de dicha microalga, y que puede claramente ser usado para otros géneros y especies.

La Figura 1 muestra un diagrama de flujo que indica los pasos principales de un proceso de producción típico para alcohol hidratado, notablemente el etanol, de los derivados de caña de azúcar.

La Figura 2 muestra un diagrama de flujo que indica los pasos principales del proceso de cultivo de espirulina *platensis* OF 25 en las cañas de azúcar y CO₂ de la presente invención.

5

La Figura 3 muestra un diagrama de flujo del proceso de producción para la biomasa de algas de la presente invención usando la microalga espirulina *platensis* OF 25 y las condiciones de inoculación del primer ciclo.

10

La Figura 4 muestra un modelo de esquema de fotobioreactores de columna como se usaron en los experimentos del proceso de la invención.

15

La Figura 5 muestra un modelo de horno con sus dimensiones correspondientes con un fotoperíodo como se usó en los experimentos con los fotobioreactores de tubo de la presente invención.

20

La Figura 6 muestra un arreglo de fotoboreactores de los estantes de horno con el fotoperíodo durante los experimentos para probar las cascarillas de caña bajo diferentes proporciones de aire: CO₂ como por la presente invención.

25

La Figura 7 es una gráfica que muestra la evolución del crecimiento en términos de biomasa de la espirulina *platensis* OF 25 como se produjo en el cultivo de

cascarilla de caña diluida (50%) bajo diferentes niveles de CO₂ y su comparación con el medio Zarrouk.

Detalles de la Invención

5

Los estudios llevados a cabo por el solicitante han mostrado que las cascarillas de caña prácticamente contienen todos los elementos minerales así como numerosos compuestos orgánicos como se requieren para el cultivo de varios géneros y especies de microalgas.

10

Por tanto el proceso para producir la biomasa y proteínas de las microalgas de la presente invención ventajosamente usa las cascarillas de caña y el dióxido de carbono (CO₂) producido como residuos en el proceso para fermentar jugo de caña de azúcar, melasas o sus mezclas para producir alcohol, notablemente el etanol anhidro hidratado.

15

Las cascarillas de caña como se usan para los estudios y experimentos del proceso de la presente invención fueron suministrados por la compañía Jardest S. A. Açúcar e Álcool, Jardinópolis/SP, Brasil, que ahora se llamará "Cascarillas de Caña Jardest". La Tabla 2 presente la composición típica de las "Cascarillas de Caña Jardest".

20

25

TABLA 2 - COMPOSICIÓN DE CASCARILLAS DE CAÑA JARDEST

Componente	Unidad	Cascarillas de Caña Hardest
Nitrógeno	%	0,60
Fósforo	Ppm P_2O_5	450,00
Potasio	% K_2O	0,42
Calcio	Ppm	357,00
Magnesio	Ppm	615,00
Sulfuro	Ppm	145,00
Hierro	Ppm	330,00
Manganeso	Ppm	15,00
Cobre	Ppm	5,00
Zinc	Ppm	18,00
Boro	Ppm	37,00
Sodio	Ppm	38,00
Cobalto	%	ANS
Molibdeno	%	ANS
Aluminio	Ppm	ANS
Cloro	%	ANS
Níquel	%	ANS
Carbón Orgánico	%	ANS
Materia Orgánica	%	5,00
pH	-	3,80

	Densidad	g/ml	0,98
	Proporción C/N	-	4/1
5	Conducción Eléctrica	$\mu\text{S/s}$	ANS
	DQO	mg/l O ₂	30.150,00
	DBO	mg/l O ₂	19.740,00

El proceso de la presente invención comprende la
 10 producción a gran escala de biomasa de alga mediante el uso CO₂
 como se genera durante la fermentación de alcohol así como las
 cascarillas de caña que se originan del paso de destilación en
 las plantas de alcohol.

15 La figura 1 presenta un diagrama de flujo
 simplificado de las operaciones unitarias más importantes de la
 planta de producción de etanol de la fermentación de azúcares
 como se derivaron de caña de azúcar y/o de otra clase de
 carbohidrato. Las cascarillas de caña como se generaron por la
 20 destilación del mosto fermentado se condujeron mediante bombeado
 a través de tubos y/o por el uso de gravedad y/o de canales o
 mediante el uso de camiones cisterna hasta la planta de
 producción de microalgas.

25 En la planta de producción de microalgas, como se
 mostró por la figura 2, las cascarillas de caña pueden ser
 transferidas directamente a los tanques de cultivo o almacenarse

en recipientes apropiados, preferente mente sellados para evitar la contaminación externa, y pueden sufrir un tratamiento previo con propósitos de preservación física, química y/o biológica.

5 Los estudios como se hicieron por el solicitante han mostrado que las cascarillas de caña incluyen, además de agua, considerables concentraciones de minerales, especialmente potasio, fósforo, sulfuro, cobalto, molibdeno, manganeso y zinc entre otros. También se notó que los compuestos orgánicos tales
10 como los azúcares residuales, biomasa y fragmentos de levadura, proteínas solubles, etc., como se desee están presentes en las cascarillas de caña hacen un sustrato excelente para el cultivo de varios grupos (especies) de algas.

15 Los rendimientos en términos de biomasa como se obtuvieron son compatibles con los medios clásicos como se describieron por la literatura internacional. Nosotros también concluimos que las cascarillas de caña pueden ser usadas para cultivar algas para la producción de biomasa proteica como se
20 describió por los destiladores de alcohol, y si se requiere puede diluirse en agua, agregando o no otros químicos con el propósito de ajustar su pH y/o para complementar los macronutrientes y/o micronutrientes dados. En algunos casos, las cascarillas de caña pueden ser filtradas y/o clarificadas
25 mediante el uso de carbón activado, cama de arena con diferentes granulometrías o agentes de floculación, dependiendo de la concentración de sólidos en suspensión en diferentes tipos de

cascarillas de cañas. Nosotros hemos notado que la pasteurización y/o esterilización del vagazo de caña no proporciona una diferencia significativa en la producción de biomasa, y por tanto no es requerida una operación de unidad, 5 aún cuando esta puede ser usada cuando sea necesario.

La inoculación de la producción de biomasa es extendida de cultivos en escala de laboratorio, pasando a través de reactores a escala de volumen creciente hasta la formación de 10 una biomasa de algas suficiente para empezar el cultivo en los tanques de producción. Los tanques para propagarlos inoculados pueden tener diferentes formas y/o tamaños, abiertos o cerrados, airados o no, agitados o no, continuos, semicontinuos, o no continuos, alimentados o no; horizontales o verticales, de tipo 15 de pista de carreras, en placas o tubos, ovales, circulares, rectangulares, cuadrados, etc.

Producción de microalgas en el medio de cultivo con base en las cascarillas o vagazo de caña como se describe 20 por la presente invención puede hacerse de acuerdo al diagrama de flujo como se mostró por la figura 2. Los cultivos en aire abierto comprenden el uso de tanques naturales o artificiales, con volumen que varía entre unas pocas docenas de litros a varios millones de litros. Estos tanques ocupan áreas grandes y 25 pueden aún alcanzar en promedio 10,000 metros cuadrados en el caso de un tanque único. No es aconsejable el usar tanques profundos, estos generalmente no deben superar de 0.5 metros de

columna de agua como para no dificultar la penetración de luz, reduciendo por tanto el proceso de fotosíntesis. Los tanques como se usan para producir las algas del vagazo de caña pueden ser horizontales o verticales, de pista de carreras, en placas o 5 tubos, ovals, circulares, rectangulares, cuadradas, etc., continuos, semicontinuos o no continuos, alimentados o no, agitados o no. Cuando se usaron el sistema de agitación más común usa cuchillas, las cuales son agitadas mecánicamente y distribuidas a espacios regulares a través de superficie del 10 tanque o después se localizan en los extremos o en el centro del tanque.

Simultáneamente con la agitación con las cuchillas, nosotros podemos inyectar aire, comprimido o no. Tal 15 aire puede ser filtrado o no. Los reactores pueden ser cerrados mediante el usar una cubierta removible, pero por obvias razones, tal cubierta será construida con un material transparente o translúcido para la luz natural o artificial.

20 El dióxido de carbono (CO_2) como se produjo en las plantas de alcohol durante la fermentación será recuperado sobre la parte superior de los fermentadores por medio de un colector acoplado a este, desde el cual tales gases son entregados a través de tubos apropiados a los tanques de producción de algas, 25 en donde este es distribuido a través de los difusores adentro del medio de cultivo a base de vagazo de caña. La cantidad de CO_2 como se liberó al medio debe ser suficiente para su

concentración para alcanzar un valor de alrededor de 0.1 a 100 por ciento. El dióxido de carbono como se produjo durante la fermentación de alcohol en cantidades altas puede ser comprimido y/o purificado y almacenado en depósitos presurizados antes de ser inyectado adentro de los tanques de producción de algas. Un ejemplo de la purificación de dióxido de carbono puede hacerse a través del paso de gases que se originan de fermentadores a través de tres llenados en torres de lavado. La primera torre contiene una solución de alcohol diluida que actúa como un purificador primario y remueve la mayoría del alcohol al ser llevado por el gas. Los dos depuradores que siguen en los cuales el líquido lavado es agua no aireada, se remueven la mayoría de las impurezas solubles en agua. El líquido de lavado regresa a los fermentadores o a la unidad de destilación mediante bombeo para recuperar el alcohol residual llevado en este y el gas depurado es subsecuentemente tratado para suministrar un gas sin olor el cual puede ser almacenado por compresión en tanques que se van a usar posteriormente para el cultivo de microalgas.

20

La separación o cosecha de la biomasa de algas como se produjeron puede hacerse continuamente, semicontinualmente, o discontinuamente, manualmente, o mecánicamente, floculada o no, mediante el uso de centrifugos, filtros, filtros de prensa, rejillas, decantadores o remolinos. La biomasa puede ser extrudida o no, puede ser secada

naturalmente o en secadoras de cama fija o móvil, o mediante atomización (rociado más seco) o tambor giratorio.

La figura 3 muestra un diagrama de flujo del
5 proceso para producir proteínas de microalgas desde las
cascarillas de caña y dióxido de carbono de la presente
invención, comprendiendo los pasos básicos que siguen:

El proceso para producir la biomasa y las
10 proteínas, de microalgas de acuerdo a la presente invención
comprende los siguientes pasos básicos:

(i) la adecuación de las cascarillas o vagazo de
caña mediante el agregar el agua y el álcali hasta que es
15 alcanzado un valor de pH de alrededor de 6.0-11.0;

(ii) entregar las cascarillas de caña ajustadas
previamente a un tanque de inoculación;

20 (iii) agregar las microalgas al tanque de
inoculación hasta que es alcanzada una concentración de
alrededor de 0.2 g/l de biomasa inicial en el medio de cultivo
con base en las cascarillas de caña;

25 (iv) la entrega de cascarillas de caña
inoculadas a un tanque de cultivo de biomasa de algas;

(v) inyección de aire conteniendo 0.1-100 por ciento de dióxido de carbono altamente puro al tanque de cultivo de biomasa de algas;

5 (vi) manteniendo la biomasa de algas a una temperatura promedio de entre 25 y 35 grados centígrados bajo una intensidad de luz natural;

(vii) la entrega de biomasa de algas a una
10 unidad de separación, en donde una fracción de la biomasa de algas y la fracción de supernadante de agua será generada;

(viii) reciclado de la fracción de supernadante de agua al tanque de inoculación.

15

Opcionalmente, el proceso incluye un paso (ix) de repetición de los pasos (iii) a (viii) hasta que es alcanzado un valor DQO de alrededor de 17 miligramos/l O₂ y un DBO inferior de alrededor de 5 mg/l O₂ en la fracción de supernadante de agua
20 como se produjo en el paso (vii). También, el proceso puede opcionalmente incluir tres o más ciclos de procesamiento para una carga única de cascarillas de caña.

Como se describió anteriormente, en el proceso de
25 la presente invención, el primer supernadante es generado por el paso (vii) que es inoculado para servir como un sustrato para un segundo ciclo de producción de la biomasa de algas;

permitiendo por tanto el establecer un procedimiento de cultivo optimizado para las microalgas, usando completo todo el material orgánico e inorgánico como esta presente en las cascarillas de caña. El tiempo de cultivo de alga en el tanque es usualmente de alrededor de 14 días, pero pueden ser usados periodos más prolongados o más cortos, dependiendo de las condiciones de procesamiento, origen y calidad de las cascarillas de caña, de las microalgas y otros factores.

Después del cultivo y primer filtrado (primer ciclo), el supernadante usualmente presenta un pH de alrededor de 8.5 a 9.0, sin necesidad de corrección, ya que este está dentro de un rango igual para el cultivo de microalgas. Entre más alto el pH, más fácilmente el CO₂ será disuelto en el medio de cultivo. Los supernadantes de agua recirculados también pueden ser mezclados con cascarillas de caña pura en diferentes fases, como una forma para enriquecerlas con los compuestos orgánicos y minerales antes de la inoculación con una biomasa de microalgas activa para llevar a cabo un nuevo ciclo o carga.

Ventajosamente, el flujo de alimentación de aire desde el tanque de cultivo de la biomasa de alga es enriquecido con alrededor de 5-15 por ciento de CO₂, el cual es empacado en cilindros a 58.3 kgf/centímetro cuadrado de presión y contiene un alto grado de pureza de más de 99.8 por ciento. El porcentaje de dióxido de carbono preferido en la presente invención es de alrededor de 15 por ciento.

Aún más ventajosamente, al completarse cada ciclo y después de la remoción de la biomasa de algas, los supernadantes de agua son inoculados de nuevo con una biomasa de microalgas activa de manera que la concentración inicial en los tanques de biomasa de algas es de alrededor de 0.2 gramos por litro de biomasa en el medio de cultivo basado en mascarillas de caña. En forma similar, nosotros preferimos que la intensidad ligera en los tanques de biomasa de algas sea de alrededor de 1,500 lux 12 horas/12 horas día.

Además de no pasar a través de los procesos de esterilización, el reciclado de supernadante de agua garantiza el suceso económico y ambiental del proceso de la presente invención ya que proporciona el uso completo de los elementos orgánico e inorgánico como se presenta en las cascarillas de caña para producir una biomasa de algas.

Además, el tratamiento biológico de las cascarillas de caña mediante el uso de microalgas es obtenido con unja reducción consecuente de las tasas de DQO y DBO alta como se presenta en tales desperdicios de plantas de alcohol. Tal tratamiento biológico se hace más significativa después de tres o más ciclos de procesamiento desde una carga única de cascarillas de caña como por el proceso de la presente invención.

El proceso de la presente invención también contribuye a las leyes ambientales actuales ya que es una tecnología sostenible y ecológicamente correcta y tiene como su producto final la biomasa de algas rica en proteínas, además de
5 promover la liberación de oxígeno al ambiente. Por tanto, el proceso de la presente invención es extremadamente importante en términos de reducción del impacto ambiental como se genera por las plantas de alcohol.

10 Los estudios de laboratorio han mostrado que en cada ciclo de cultivo, la cantidad final de biomasa como se obtuvo disminuye. Esto ocurre como una función del hecho de que los micronutrientes y los macronutrientes, están presentes en el supernadante reciclado se agotan mientras que la biomasa de alga
15 es producida en los diferentes ciclos. Por tanto, para mantener los ciclos subsecuentes bajo tasas de rendimiento equivalentes en términos de biomasa global, se requiere el complementar el supernadante con una fracción de cascarillas de caña frescas para compensar la cantidad de micronutrientes y de
20 macronutrientes como se pierden en los ciclos previos. Sin embargo, en los casos en los cuales el objeto principal es el de reducir la carga de contaminantes del vagazo de caña, dichas sustituciones pueden ser evitadas.

25 Para evaluar el crecimiento de las algas bajo diferentes condiciones experimentales como se estudió, las muestras (duplicadas) se han recolectado cada dos días para el

análisis de peso seco. La biomasa fue filtrada con vacío a través de un filtro de papel de 0.45 μm , se lavó subsecuentemente con agua destilada y se secó por 24 horas en un horno a 100° C. Los datos son compilados en la Tabla 3 dada
5 abajo.

TABLA 3 - BIOMASA DE ALGAS PRODUCIDA EN DIFERENTES CICLOS DE REUSO DE SUPERNADANTES DE CASCARILLA DE CAÑA

10

Tiempo de cultivo (días)	Condición de Supernadante	X (g/l) Aire + 15% CO ₂
0	Comenzando	0,211
14	1er. Ciclo	4,470
28	2do. Ciclo	3,043
42	3er. Ciclo	2,154

15

Nosotros podemos notar que sobre la Tabla anterior que a través de los ciclos, los micronutrientes y los macronutrientes son consumidos. Nosotros hemos también notado
20 una reducción de los valores de DQO y DBO después del primero y el segundo ciclos de cultivo, llegando a tasas muy cerca de cero después de la conclusión del tercer ciclo, como se mostró por la Tabla 4 dada abajo. El análisis DBO y DQO se han tomado de acuerdo a los métodos estándar para el examen de agua de agua
25 de desperdicio vigésima edición 1998, Hach Company y WTW.

TABLA 4 - REDUCCIÓN DE NIVELES DE DQO Y DE DBO JUNTO CON LOS CICLOS DE RECICLADO DE SUPERNADANTES DE CASCARILLAS DE CAÑA

Condición	Tiempo (días)	DQO (mg/l O ₂)	DBO (mg/l O ₂)
Comenzando	0	14790	10034
1er. Ciclo	14	2935	1115
2do. Ciclo	28	308	83
3er. Ciclo	42	17	< 5

La presente invención será descrita adicionalmente por medio de los ejemplos que siguen los cuales, no limitan su alcance, representando una incorporación preferida.

MICROALGA SPIRULINA PLATENSIS OF 25

La espirulina *platensis* OF 25, seleccionada del banco de cultivos de la compañía Ouro Fino Saúde Animal Limitada, fue la microalga considerada para los estudios específicos del proceso de la presente invención, aún cuando otras microalgas, solas o en mezclas, pueden ser igualmente empeladas para la producción de biomasa y proteínas de cascarillas de caña y dióxido de carbono como se generó por las plantas de alcohol.

La espirulina *platensis* OF 25 presenta un crecimiento alto bajo rangos de temperatura de entre 25 y 35° C bajo un pH ligeramente alcalino. Estas características

fisiológicas de la espirulina *platensis* OF 25 proporcionan un gran potencial para su cultivo en cascarillas de caña, ya que ese residuo, cuando se descarga por las destilerías de alcohol, presenta altas cargas orgánicas y minerales.

5

Además, los rangos de temperatura considerados como óptimos para el cultivo de la espirulina *platensis* OF 25 están cerca de las temperaturas promedio de las regiones brasileñas en donde se cultiva la caña de azúcar, exactamente en
10 donde las plantas de alcohol están instaladas. Por tanto, el requerimiento de calentar los tanques de producción de algas también llamado fotobioreactores es prácticamente eliminado.

La espirulina así como otras microalgas, requieren
15 además una fuente de carbón, una fuente nitrógeno, fósforo y otros micronutrientes (Vonshak, 1997). Aún cuando la espirulina puede crecer fotoautotrópicamente, la colección de CO_2 del aire depende del pH del medio de cultivo. Entre más alto es el pH del medio, más fácilmente el CO_2 de la atmósfera emigra al
20 interior y se convierte en CO_3^{2-} . A un pH arriba de 11, sin embargo, la espirulina no crece, probablemente debido al efecto de una alcalinidad mayor sobre los procesos metabólicos o también a la inhabilidad de las microalgas para asimilar el carbón en la forma de CO_3^{2-} . Por tanto, en los cultivos de la
25 microalga espirulina, una fuente externa de carbón es usualmente requerida en la forma de HCO_3^- , una especie participante en el equilibrio:



Este es la fuente de carbón más probablemente asimilada por la espirulina (BINAGHI, L., A. D., LODI, A., COVEERTI, A., BORGHI, M. D. Carga y toma de suministro-carga de dióxido de carbono por espirulina *platensis*. Proceso bioquímico, 38, páginas 1341-1346, 2006).

En la producción de microalgas, los términos financieros más altos son primariamente los costos de trabajo hombre y los costos subsecuentes con el medio de cultivo. El medio ZARROUK (ZARROU, C. Contribución al estudio de una cianofícea: influencia de diversos factores físicos y químicos sobre el crecimiento y fotosíntesis de espirulina máxima Geitler. PhD Tesis, Universidad de Paris, 1966) es tradicionalmente usado para el cultivo de espirulina. Por tanto, las posibilidades para reducir los costos del medio Zarrouk para el cultivo de espirulina son significativamente deseables.

20

Las Tablas 5, 5A, y 5B se refieren a concentraciones de todos los elementos químicos presentes en el medio Zarrouk como se usó en el manejo y perforación de la espirulina *platensis* OF 25 durante el proceso experimental completo de la presente invención. La línea madre de espirulina *platensis* OF 25 fue cultivada en el medio Zarrouk y se preservó en un congelador a una temperatura de -80° C.

25

TABLA 5 - COMPONENTES DE MEDIO ZARROUK PARA EL CULTIVO DE
SPIRULINA PLATENSIS OF 25

	Componente	Concentración g/l
5	NaHCO ₃	16.8
	K ₂ HPO ₄	0.5
10	NaNO ₃	2.5
	K ₂ SO ₄	1.0
	NaCl	1.0
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
15	CaCl ₂	0.04
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01
	EDTA	0.08
	Solución A5	1 ml
20	Solución B6	1 ml

TABLA 5A - COMPOSICIÓN SOLUCIÓN A5

Componente	Concentración g/l
H_3BO_3	2,86
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,81
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,222
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,079
$NaMoO_4$	0,015

10

TABLA 5B - COMPOSICIÓN SOLUCIÓN B6

Componente	Concentración g/l
NH_4VO_3	22.96
$K_2Cl_2(SO_4)_2 \cdot 24H_2O$	96.00
$NiSO_4 \cdot 7H_2O$	47.85
$Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$	61.10
$TiOSO_4 \cdot H_2SO_4 \cdot 8H_2O$	0,015
$CO(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	43.98

15

20

EJEMPLO 1: ADAPTACIÓN DE MICROALGAS A CASCARILLAS DE CAÑA

Los estudios de adaptación previa para la espirulina *platensis* OF 25 mezclas crecientes (5, 25, 50, 75, 5 100%) de cascarillas de caña para el medio de cultivo Zarrouk fueron evaluadas. Este mismo procedimiento puede ser aplicado si es justificable para otros géneros y/o especies de microalgas cuando se cultivan en cascarillas de caña, incluyendo mediante el empleo de otros medios distintos al Zarrouk, pero más 10 específicos para cada grupo de algas. Esta adaptación se hizo en botellas ErlenMeyer de 250 mililitros conteniendo 50 mililitros del medio o en otro sistema de cultivo similar. Considerando que el medio conteniendo 5% de cascarillas de caña + 95% de medio Zarrouk fue usado para inocular el medio 15 conteniendo 25% de cascarillas de caña y después subsecuentemente hasta el cultivo final en cascarillas de caña pura de un cultivo adaptado previamente. Las botellas fueron entregadas a un incubador de tipo "Shaker" de marca TECNAL, modelo TE-421 conteniendo un fotoperíodo, temperatura y 20 agitación controladas o en otros sistemas teniendo los mismos objetos. Los cultivos fueron encubados por un periodo de 14 días, durante el cual los siguientes estándares preferenciales fueron mantenidos a una temperatura constante de 30° C ($\pm 2^\circ$ C), 110 revoluciones por minuto de agitación, 1,500 la intensidad de 25 irradiación de luz por periodos de 12 horas alternando con 12 horas de oscuridad. La intensidad de luz dentro de la

incubadora fue diariamente evaluada, en este caso usando un medidor de luz digital Minip MLM 101. Para seguir el crecimiento de las algas, las muestras fueron tomadas cada dos días para el análisis de peso seco. La biomasa de algas como se formó después de 14 días de cultivo fue vaciada de filtro a través del papel de filtro milipore con 0.45 μm de poros, seguido por el lavado con agua destilada y el secado por 24 horas en un horno a 100° C. Los resultados como se contuvieron en las Tablas 6 y 7 abajo representan el promedio de tres determinaciones para cada una de las condiciones estudiadas.

TABLA 6 - ADAPTACIÓN DE *SPIRULINA PLATENSIS* OF 25 BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CASCARILLA DE CAÑA

Medio ZARROUK (%)	Cascarillas de Caña (%)	Biomasa de alga de inicio (g/l)	Biomasa de alga final (g/l)	Biomasa de alga Δ (g/l)
100	0	0,197	2,951	2,754
95	5	0,211	2,780	2,569
90	25	0,199	2,162	1,963
80	50	0,195	1,875	1,680
75	75	0,205	1,377	1,172
70	90	0,199	0,845	0,646
60	100	0,203	0,543	0,340

Este proceso para adaptar previamente las microalgas a las cascarillas de caña permite obtener resultados más expresivos en términos de rendimiento final diario de

biomasa en comparación con un proceso en el cual las microalgas no pasan a través de esta adaptación previa (Tabla 7).

**TABLA 7 - EFECTO DE ADAPTACIÓN DE *SPIRULINA PLATENSIS* OF 25
EN CASCARILLAS DE CAÑA DILUIDAS SOBRE LA PRODUCCIÓN
DE BIOMASA DE ALGAS**

Condición	Biomasa (g/l)
Producción de biomasa de <i>espirulina platensis</i> OF 25 cultivada en cascarillas de caña (50%) + agua destilada (50%) con una inoculación adaptada previamente	1,464
Producción de biomasa de <i>espirulina platensis</i> OF 25 cultivada en cascarillas de caña (50%) + agua destilada (50%) sin un inóculo adaptado previamente	0,633

EJEMPLO 2: PREPARACIÓN DE INÓCULO

Este proceso se hizo en botellas ErlenMeyer de 500 mililitros conteniendo 90 mililitros de cascarillas de caña pura o mezcladas con agua. Las botellas no esterilizadas fueron inoculadas con 10 mililitros de un cultivo activo de *espirulina platensis* OG 25 adaptado en un medio conteniendo Zarrouk + cascarillas de caña (1:1) de manera que la concentración de biomasa de algas inicial permanece bajo valores de por lo menos de botellas de 0.15 g/l y se entregaron a una incubadora de "Shaker" y se cultivaron bajo las mismas condiciones como se establece por el ejemplo 1. La biomasa de algas como se obtuvo

fue empleada para inocular fotobioreactores tubulares como aquellos mostrados por la figura 4.

EJEMPLO 3: CULTIVO DE SPIRULINA PLATENSIS OF 25 BAJO

5 **CONCENTRACIONES DE CASCARILLAS DE CAÑA PURA Y DILUIDAS DEN AGUA**

La espirulina *platensis* OF 25 fue cultivada en cascarillas de caña pura y se diluyó en agua como el único medio de cultivo, justo teniendo su pH inicial ajustado a 8.0 con 3N
10 de NaOH. La Tabla 8 abajo presenta las diluciones probadas principales.

En estos experimentos, los fotobioreactores de vidrio tubular de 52 centímetros de altura con 8 centímetros de
15 diámetro fueron usados, con un volumen total de 21, justo como se muestra por la figura 4. Los fotobioreactores fueron llenados con 1.8 l de cascarillas de caña y cascarillas de caña diluidas no esterilizadas y se incubaron con cultivo activo de espirulina *platensis* OF 25 como se adaptó previamente en las
20 cascarillas de caña, seguido por el método como se describe por el ejemplo 2, hasta que la concentración de biomasa de algas al inicio del cultivo alcanza alrededor de 0.2 g/l. La agitación y la aireación de los fotobioreactores fueron proporcionados a través de un flujo de aire atmosférico de 1 v/v/m (volumen de
25 aire por volumen de medio) pasado a través de cañas de vidrio pequeño con piedras porosas en sus extremos para aumentar la

difusión de los gases adentro del medio de cultivo líquido con base en las cascarillas de caña, como se mostró por la figura 4.

Los experimentos fueron llevados a cabo en un
5 cuarto climatizado de 3.5 metros por 2.5 metros por 2.5 metros
con temperatura controlada dentro del rango de 30° C (\pm 2° C)
mediante el uso de un acondicionador de aire de división, marca
Consul Ambiente (12,000 BTU/h). En ese cuarto, dos hornos con
fotoperíodos para un medidor completo de control de clima marca
10 digital cyclomatic modelo PROGS 1 con un suministro de 220 V AC
conteniendo dos lámparas fluorescentes de luz diurna de 20
watts, con dos reactores electrónicos y un proveedor de 4 puntos
auxiliar por anaquel, sistema de funcionamiento manual y
automático y una estructura de acero cubierta por formica blanca
15 para mejorar la iluminación, como se mostró por la figura 5. La
iluminación de los fotobioreactores fue de 1,500 Lux como se
suministró por las lámparas fluorescentes de tipo de luz diurno
para un período de doce horas, alternando con doce horas de
oscuridad. El tiempo de cultivo fue de 14 días para todos los
20 experimentos.

Cada horno tuvo tres anaqueles con fotoperíodo,
cada uno comprendiendo seis fotobioreactores. El arreglo de
dichos fotobioreactores está esquemáticamente representado por
25 la figura 6.

El volumen de los cultivos fue mantenido constante mediante reposición diaria de agua destilada para compensar las pérdidas por evaporación.

5 **TABLA 8 - CULTIVO DE *SPIRULINA PLATENSIS* OF 25 BAJO
CONCENTRACIONES DE CASCARILLA DE CAÑA CRECIENTES**

	Cascarillas de Caña (%)	H ₂ O Destilada (%)	Biomasa de alga de inicio (g/l)	Biomasa de alga final (g/l)	Biomasa de alga Δ (g/l)
10	75	25	0,205	3,374	3,169
	50	50	0,195	3,162	2,967
	25	75	0,199	1,435	1,236
	0	100	0,197	0,974	0,777

La biomasa de algas fue filtrada con vacío a través de un papel de filtro milipore de 0.45 μm y subsecuentemente se lavó con agua destilada y se secó por 24 horas en un horno a 100° C. Los resultados, se presentaron por la Tabla 8 representan el promedio de dos fotobioreactores para una condición experimental única en el cultivo de *espirulina platensis* OF 25 bajo diferentes concentraciones de cascarilla de caña. Los mejores resultados en términos de biomasa de algas, se formaron después de 14 días de cultivos fueron alcanzados con cascarillas de caña diluidas conteniendo respectivamente 75% y 50% de agua, pero también puede observarse que, en otras condiciones estudiadas, una producción expresiva de biomasa de algas también ocurrió.

Los resultados como se obtuvieron han mostrado que las cascarillas de caña diluidas o puras constituyen un sustrato excelente del cultivo de espirulina *platensis* OF 25.

5 **EJEMPLO 4: INFLUENCIA DE CO₂ PARA EL CULTIVO DE SPIRULINA**
 PLATENSIS OF 25 EN 50% DE CASCARILLAS DE CAÑA DILUIDAS

Los experimentos en escala de banca se han hecho en fotobioreactores tubulares. Los cultivos fueron mantenidos a
10 30° C con un fotoperíodo de doce horas y una iluminación de 1,500 Lux ($\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$).

Los experimentos se llevaron a cabo en 14 (catorce) cargas de día en fotobioreactores tubulares de vidrio
15 de 52 centímetros de largo con 8 centímetros de diámetro y un volumen total de dos litros (1.8 litros de volumen de trabajo) como sed representó por la figura 4. Todos los cultivos fueron mantenidos bajo agitación constante con un flujo de aire atmosférico filtrado de 1.0 v/v/m. La adición de la fuente
20 complementaria de carbón fue hecha mediante el agregar CO₂ al aire a través de una mezcladora bajo las concentraciones de 5%, 10% y 15% (v/v) como se representó esquemáticamente por la figura 6.

25 Los cultivos fueron iniciados con una concentración de célula de alga bioactiva de alrededor de 0.20 g/l. Los cultivos fueron mantenidos a través del tiempo de

cultivo (catorce días) sin una corrección de pH o ajuste de pH. Los volúmenes de cultivo fueron mantenidos constantes por medio de la posición de área de agua que se perdió por evaporación.

5 La mezcla de aire/CO₂ de salida de la mezcladora de gas fue llevada a cabo a través de mangueras de silicona de 8 milímetros hasta los fotobioreactores tubulares, de acuerdo al modelo esquemático de las figuras 4 y 6. En ese estudio, los fotobioreactores tubulares fueron llenados en justo con 50% de
10 cascarillas de caña diluidas ya que, bajo condiciones del ejemplo 3, un rendimiento de biomasa de algas considerable en volumen fue obtenido, así como las cascarillas de caña.

 Las condiciones de incubación e inoculación de los
15 fotobioresactores fueron idénticas al ejemplo 3. Todos los experimentos se han llevado a cabo en tres copias y los resultados expresan el promedio de dichas determinaciones.

 De los ejemplos arriba descritos y la gráfica como
20 se mostró por la figura 7, es posible el realizar que la adición de CO₂ ejerce un efecto positivo en la producción de biomasa de la espirulina *platensis* OF 25 cultivada en un medio basado sobre las cascarillas de caña diluidas (50%) en comparación con el cultivo recibiendo justo aire atmosférico. La concentración
25 superior de la biomasa de algas como se obtuvo fue de 4.47 g/l después de 14 días de cultivo en un fotobioreactor tubular con la mezcla (aire + 15% de CO₂), mientras que en el cultivo

residiendo justo aire, la concentración final de biomasa fue de 2.98 g/l. Cuando la espirulona *platensis* OF 25 fue cultivada en el medio Zarrouk con la adición de 15% de CO₂, la concentración de biomasa fue de 5.094 g/l. Nosotros resaltamos, sin embargo, 5 que es extremadamente costoso el medio de cultivo en comparación con las cascarillas de caña, el cual es un residuo industrial indeseable del cual cientos de billones de litros son producidos en Brasil.

10 Nosotros también resaltamos que los expertos en el arte reconocerán que los valores superiores y/o inferiores pueden ser obtenidos con espirulina *platensis* OF 25 y/u otros géneros y/o especies de microalgas son cultivados a niveles de CO₂ no probados en estos ejemplos. Lo mismo ocurre con el medio 15 de producción de biomasa de algas, por ejemplo los resultados obtenidos fueron para la muestra de "cascarillas de caña Jardest" y claramente los resultados superiores y/o inferiores a esos presentados en los ejemplos pueden ser alcanzados, ya que son usadas nuevas muestras de cascarillas de caña originándose 20 de diferentes plantas de alcohol localizadas en diferentes regiones, de diferentes variedades de caña de azúcar, de diferentes modelos de reactor y escalas de cultivo, para la producción de laboratorio, de banca, piloto o industrial.

R E I V I N D I C A C I O N E S

1. Un proceso para la producción de biomasa y proteínas de microalgas, para la alimentación humana o animal, así como para otros usos, caracterizado porque tiene como el medio de cultivo de dichas microalgas las cascarillas de caña y el dióxido de carbono.

2. El proceso para la producción de biomasa y proteínas de microalgas, tal y como se reivindica en la cláusula 1, caracterizado porque el hecho de que las cascarillas de caña y el dióxido de carbón de las cubas de fermentación son generadas como desperdicios de la industria del alcohol anhidro e hidratados.

3. El proceso para la producción de biomasa y proteínas de microalgas, tal y como se reivindica en la cláusula 2, caracterizado porque el hecho de que la industria del alcohol hidratado y anhidro usa caña de azúcar y sus derivados como una fuente de materia prima.

4. El proceso para la producción de biomasa y proteínas de microalgas, tal y como se reivindica en la cláusula 1, caracterizado porque el hecho de que las microalgas son seleccionadas de uno o más géneros (especies) del grupo que comprende *espirulina* (*sp*, *platensis*, *maxima*, *major*, *subsalsa*, *geitleri*, *subtilissima*, *labyrinthiformis*); *Skeletonema sp*;

Chaetoceros sp; *Scenedesmus* sp (*bijugatus*, *incrassatulus*,
ocultus, *quadricauda*, *dimorphus*); *Anacystis* sp (*nidulans*,
cyanea, *thermalis*); *Porphyridium cruentum*; *Cryptothecodinium*
cognii; *Euglena* sp (*gracilis*); *Cryptothecodinium* *cohnii*;
5 *Haematococcus pluvialis*; *Anabaena* sp (*variabilis*, *cylindrica*,
hassali, *planctonica*); *Dunaliella* sp (*salina*, *bardaeil*,
tertioleta); *Chlamydomonas* sp (*reinhardii*); *Chlorella* sp
(*vulgaris*, *kessleri*, *pyrenoidosa*, *mannophila*, *protothecoides*,
salina, *homosphaera*, *stigmatophora*, *luteoviridis*, *regularis*,
10 *ellipsoidea*, *variegata*, *sorokiniana*, *emersonii*); *Trichodesmium*,
Microcoleus; *Ankistrodesmus* sp (*densus*, *braunii*, *falcatus*,
fusiformis, *gracilis*); *Isochrysis galbana* (Parke); *Tetraselmis*
sp (*tetrathele*, *suecia*); *Oscillatoria* sp (*limnetica*, *curviceps*,
splendida); *Nostoc muscorum* y *Botryococcus braunii*.

15

5. El proceso para la producción de biomasa y
proteínas de microalgas, tal y como se reivindica en la cláusula
4, caracterizado porque la microalga es *Spirulina platensis* OF
25.

20

6. El proceso para la producción de biomasa y
proteínas de microalgas, caracterizado porque comprende los
pasos básicos siguientes:

25

(i) la adecuación de las cascarillas de caña
mediante el agregar el agua y el álcali hasta que es alcanzado
un valor de pH de alrededor de 6.0-11.0;

(ii) la entrega de cascarillas de caña preajustadas a un tanque de inoculación;

5 (iii) la adición de microalgas al tanque de inoculación hasta que es alcanzada una concentración de alrededor de 0.2 g/l de biomasa inicial en el medio de cultivo con base en las cascarillas de caña;

10 (iv) la entrega de cascarillas de caña inoculadas a un tanque de cultivo de biomasa de algas;

(v) la inyección de aire conteniendo 0.1-100 por ciento de dióxido de carbono altamente puro al tanque de cultivo
15 de biomasa de algas;

(vi) mantener la biomasa de algas a una temperatura promedio de entre 25 y 35 grados centígrados bajo una intensidad de luz natural;

20

(vii) la entrega de biomasa de algas a una unidad de separación, en donde una fracción de la biomasa de algas y la fracción de supernadante de agua será generada;

25 (viii) reciclar la fracción de supernadante de agua al tanque de inoculación.

7. El proceso para la producción de biomasa y proteínas de microalgas, tal y como se reivindica en la cláusula 6, caracterizado porque el hecho de que en el paso (v), el porcentaje de dióxido de carbono en el flujo de aire varía entre 5 y 15%.

8. El proceso para la producción de biomasa y proteínas de microalgas, tal y como se reivindica en la cláusula 5, caracterizado porque el porcentaje de dióxido de carbono en el flujo de aire es de alrededor de 15%.

9. El proceso para la producción de biomasa y proteínas de microalgas, tal y como se reivindica en la cláusula 6, caracterizado porque la biomasa de algas es mantenida por un período de alrededor de 14 días en el tanque de cultivo.

10. El proceso para la producción de biomasa y proteínas de microalgas, tal y como se reivindica en la cláusula 6, caracterizado porque las cascarillas de caña y dióxido de carbono originadas de la industria de alcohol hidratado y/o anhidro usando caña de azúcar y sus derivados como una fuente de materia prima.

11. El proceso para la producción de biomasa y proteínas de microalgas, tal y como se reivindica en la cláusula

6, caracterizado porque el hecho de que la microalga es *espirulina platensis* OF 25.

12. El proceso para la producción de biomasa y proteínas de microalgas, tal y como se reivindica en la cláusula 6, caracterizado porque el hecho de que la adición del agua en el paso (i) se hace en una proporción de alrededor de 50% (v/v).

13. El proceso para la producción de biomasa y proteínas de microalgas, tal y como se reivindica en la cláusula 6, caracterizado porque el hecho de que después de que es completado cada ciclo y después de la remoción de la biomasa de alga, los supernadantes son de nuevo inoculados con biomasa activa para microalgas de manera que la concentración inicial en los tanques de la biomasa de algas permanece alrededor de 0.2 gramos por litro en el medio de cultivo basado sobre las cascarillas de caña.

14 El proceso para la producción de biomasa y proteínas de microalgas, tal y como se reivindica en la cláusula 6, caracterizado porque el hecho de que las cascarillas de caña se mantienen bajo un pH de alrededor de 7.0-11.0 y se diluyen con una cantidad de agua de alrededor de 5 a 95% (v/v) durante cada ciclo.

25

15. El proceso para la producción de biomasa y proteínas de microalgas, tal y como se reivindica en la cláusula

6, caracterizado porque el hecho de que la intensidad de la luz en los tanques de producción de biomasa de algas es de alrededor de 1,500 Lux 12/12 h día.

5 16. El proceso para la producción de biomasa y proteínas de microalgas, tal y como se reivindica en una de las cláusulas 6 a 15, caracterizado porque comprende los siguientes pasos básicos:

10 (i) la adecuación de las cascarillas de caña mediante el agregar agua y álcali hasta que es alcanzado un valor de pH de alrededor de 6.0-11.0;

 (ii) la entrega de cascarillas de caña
15 preajustadas a un tanque de inoculación;

 (iii) la adición de microalgas al tanque de inoculación hasta que se ha alcanzado una concentración de alrededor de 0.2 gramos por litro de biomasa inicial en el medio
20 de cultivo basado sobre las cascarillas de caña;

 (iv) la entrega de cascarillas de caña inoculadas a un tanque de cultivo de biomasa de algas;

25 (v) la inyección de aire conteniendo 0.1-100 por ciento de dióxido de carbono altamente puro al tanque de cultivo de biomasa de algas;

(vi) mantener la biomasa de algas a una temperatura promedio de entre 25 grados centígrados y 35 grados centígrados bajo una intensidad de luz natural;

5

(vii) la entrega de biomasa de algas a una unidad de separación, en donde una fracción de la biomasa de algas y de la fracción de supernadante de agua será generada;

10

(viii) reciclar la fracción de supernadante de agua al tanque de inoculación; y

(ix) la repetición de los pasos (iii) a (viii) hasta que es alcanzado un valor DQO de alrededor de 17 miligramos/l O₂ y un DBO más bajo de alrededor de 5 miligramos por litro O₂ en la fracción de supernadante de agua como se produjo en el paso (vii).

17. El proceso para la producción de biomasa y proteínas de microalgas, tal y como se reivindica en la cláusula 16, caracterizado porque este comprende tres o más ciclos de procesamiento de una carga de cascarillas de caña única.

20

R E S U M E N

La presente invención se refiere a un proceso para producir biomasa y proteínas de microalgas, ventajosamente usando como una fuente de desarrollo de dicha microalga los desperdicios de la industria del alcohol, notablemente de las cascarillas de caña de azúcar y del dióxido de carbono que se origina de las cubas de fermentación. El proceso de acuerdo a la presente invención comprende los pasos básicos de la preparación de cascarillas de caña, la adaptación y preparación del inóculo con la microalga *espirulina platensis* OF 25, el cultivo de la microalga bajo condiciones controladas y el uso de CO₂, la separación de la biomasa de algas y la recirculación opcional de la fase de agua y el proceso hasta que son alcanzados los niveles DQO y DBO aceptables por los reglamentos ambientales.

Fig.1

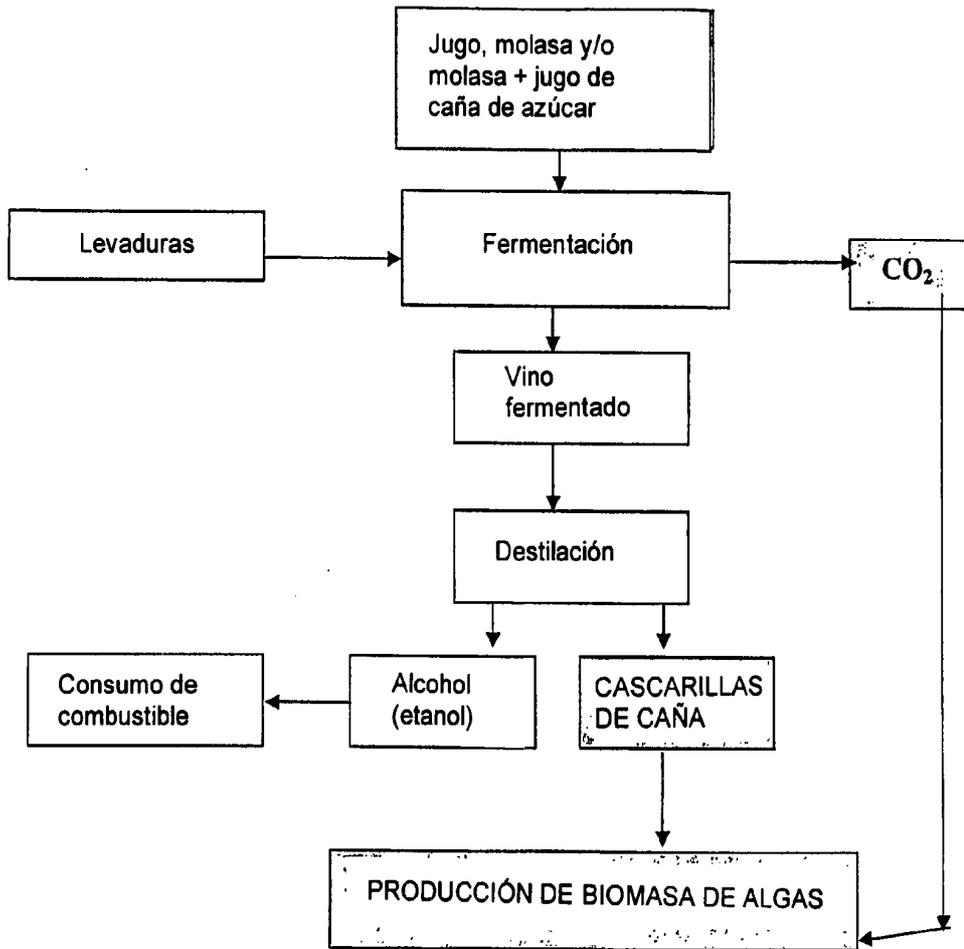


Fig. 2

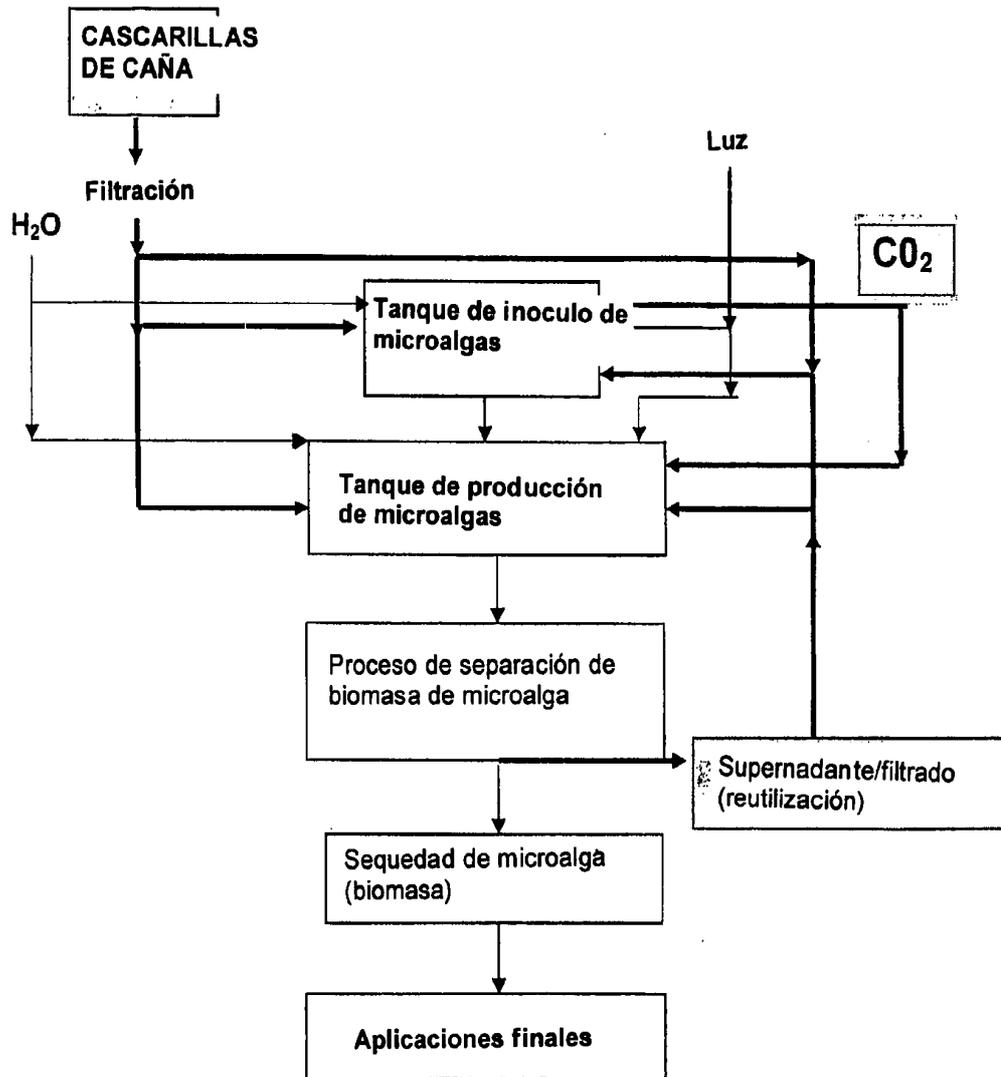
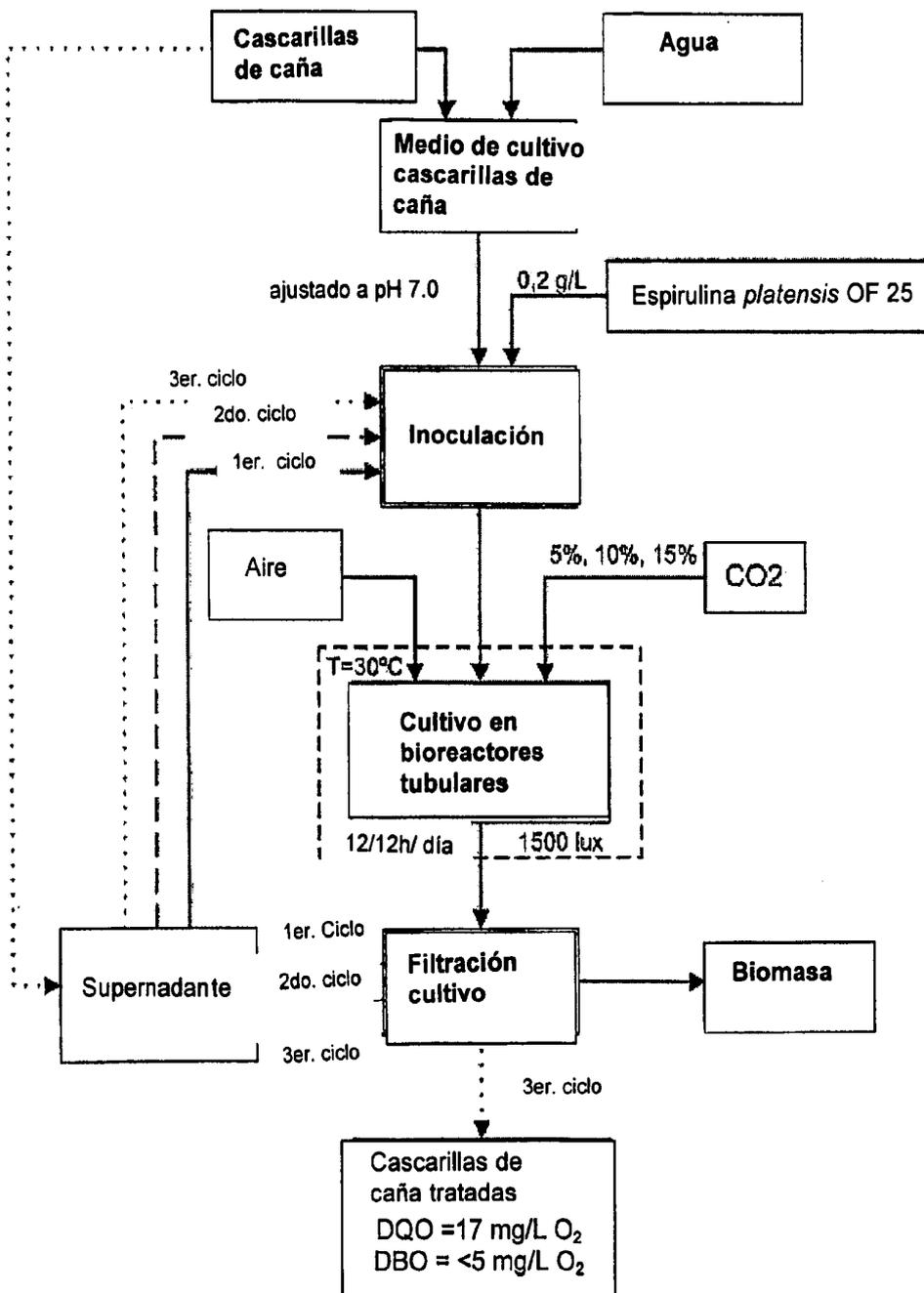


Fig. 3



4/5

Fig. 4

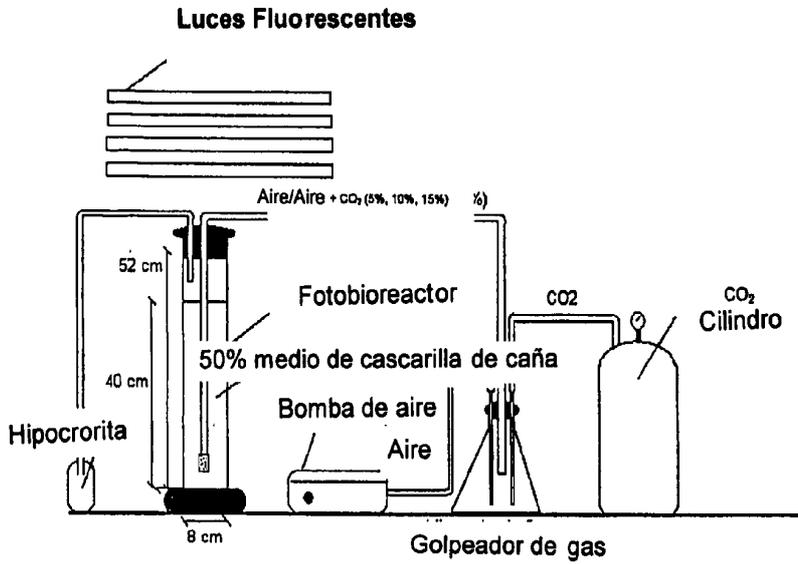


Fig. 5

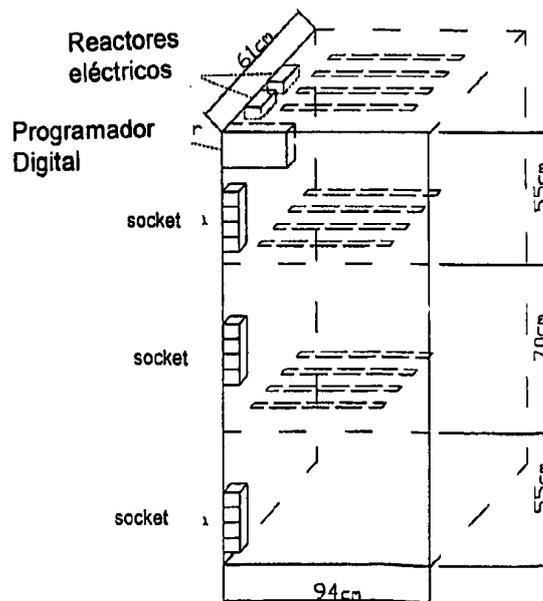


Fig. 6

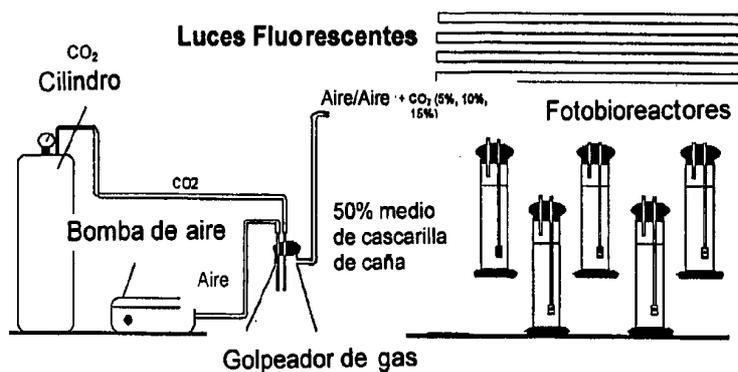


Fig.7

