



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 362 917**

② Número de solicitud: 201050011

⑤ Int. Cl.:
C12N 1/12 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **03.12.2008**

⑩ Prioridad: **14.12.2007 IT MI07A2343**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **15.07.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
15.07.2011

⑦ Solicitante/s: **ENI S.p.A.**
Piazzale E. Mattei, 1
00144 Roma, IT

⑦ Inventor/es: **Capuano, Federico;**
D'Addario, Nicola Ezio;
Bignazzi, Renzo;
De Ferra, Francesca;
Rispoli, Giacomo y
Fioravanti, Emiliano

⑦ Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

⑤ Título: **Procedimiento para la producción de biomasa de algas con un elevado contenido en lípidos.**

⑦ Resumen:

Procedimiento para la producción de biomasa de algas con un elevado contenido en lípidos.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de biomasa de algas con un elevado contenido de lípidos, que comprende: (a) la producción de inóculos con fin de efectuar la fase (b) en fotorreactores; (b) el cultivo masivo de la biomasa de algas en estanques abiertos inoculados con la fase (a); (c) una fase de espesamiento de la biomasa de algas efectuada en condiciones templadas; (d) una fase de inducción de la producción de lípidos, en la que se utilizan módulos que comprenden fotorreactores o estanques abiertos; (e) una fase de separación de la biomasa con un alto contenido de lípidos.

ES 2 362 917 A1

ES 2 362 917 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de biomasa de algas con un elevado contenido de lípidos.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de biomasa de algas con un elevado contenido de lípidos.

Más en particular, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de biomasa de algas con un elevado contenido de lípidos, basado en una combinación de sistemas de cultivo tales como estanques abiertos y fotorreactores adecuadamente integrados con sistemas de espesamiento de la biomasa.

Actualmente, se cultivan microalgas para la producción de moléculas de alto valor, tales como ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas y agentes gelificantes, que se introducen en el mercado nutricional, farmacéutico y cosmético.

15 Los mejores productos de biomasa de algas utilizan diversos tipos de sistemas de cultivo que dependen principalmente de la cepa de alga y de las condiciones climáticas. En condiciones extremadamente favorables de temperatura y luz, tal como en Israel y California, por ejemplo, pueden utilizarse con éxito estanques abiertos. Por el contrario, en Alemania, se utilizan reactores tubulares instalados en invernaderos. En Portugal se utilizan tanto estanques abiertos como fotorreactores.

20 Es preferido además el uso de sistemas abiertos, tales como estanques abiertos, cuando se cultivan especies de algas que tienen característica extremofílicas, tales como *Dulaniella salina*, capaces de crecer en entornos con concentraciones de sal del 10-15% y, por tanto, de resistir numerosas formas externas de contaminación. Esto no ocurre para especies capaces de crecer en agua dulce que, para evitar problemas de contaminación, pueden cultivarse en sistemas cerrados, tales como fotorreactores.

30 El cultivo de algas para los campos nutricional, farmacéutico y cosmético se caracteriza por capacidades productivas bastante limitadas con un alto valor de los productos. Por esta razón, pueden tolerarse sistemas de producción relativamente caros, tales como los fotorreactores, mientras que el método más ampliamente utilizado para la producción de microalgas que se deben usar en campos comerciales menos valiosos, tales como el de la acuicultura, se basa en sistemas de cultivo económicos, tales como estanques abiertos.

35 El paso de los campos mencionados anteriormente, en los que se utilizan tradicionalmente microalgas, a campos medioambientales/campos de energía, requiere el desarrollo de tecnologías que sean tales que lleven a un fuerte incremento en la capacidad de producción (del orden de cientos/miles de toneladas por año a millones de toneladas por año) y a una fuerte reducción en los costes de producción (de cientos de dólares/kilogramo a cientos de dólares/tonelada).

40 Los objetivos de productividad de los sistemas de cultivo pueden alcanzarse por medio de fuertes mejoras dirigidas a optimizar la adsorción de radiación biológicamente activa y una reducción en fenómenos de fotoinhibición con el fin de incrementar fuertemente la eficiencia del procedimiento de fotosíntesis de clorofila.

45 Hay numerosas actividades de investigación en marcha con el objetivo de optimizar la productividad de biomasa de los diferentes sistemas de cultivo y de incrementar su contenido de lípidos.

La producción de microalgas con el objetivo de reciclar el CO₂ liberado por plantas industriales y producir biomasa que puede explotarse para fines de energía, tal como, por ejemplo, aceites vegetales a utilizar para su conversión a biodiesel, está en una etapa experimental en este momento.

50 Los esfuerzos que se están realizando para el desarrollo de fotorreactores no parecen ser resolutivos, puesto que hay muchas dudas en cuanto a los incrementos de productividad reivindicados, que, por otro lado, no parecen ser suficientes para obtener la necesaria reducción de costes. (Ref: Solicitud de patente WO 03/094598 "Photobioreactor and Process for Biomass Production and Mitigation of Pollutants in Flue Gases. Company Green Fuel Technology").

55 Además, no existe evidencia en la literatura relativa al procedimiento completo para la producción de aceites a partir de biomasa de algas y su transesterificación, excepto las descritas en el Congreso Anual AICHE 2006, 12-17 de noviembre, "Microalgal Oil Extraction and *in situ* Transesterificación", Justin M. Ferrentino e Ihab H. Farag. Chemical Engineering, Universidad de New Hampshire, Kingsbury Hall, 33 College Road, Durham, NH 03824, en marcha en la Universidad de New Hampshire, que están tratando de evitar recurrir a disolventes orgánicos normalmente utilizados para la extracción de aceites, explotando métodos de rotura de las paredes celulares y centrifugación posterior o transesterificación *in situ*.

65 Se ha encontrado ahora un sistema de cultivo de microalgas basado en una combinación de sistemas de cultivo, tales como estanques abiertos y fotorreactores, adecuadamente integrados con sistemas de espesamiento de la biomasa, capaz de garantizar una alta productividad, proporcionando una biomasa con un alto contenido de lípidos, impidiendo la contaminación microbiológica, manteniendo una producción continua y estable en el tiempo.

ES 2 362 917 A1

En particular, un objetivo de la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de biomasa de algas con un elevado contenido de lípidos, que comprende, de acuerdo con el esquema mostrado en la figura 1:

- (a) la producción de inóculos con fin de efectuar la fase (b) en fotorreactores;
- (b) el cultivo masivo de la biomasa de algas en estanques abiertos inoculados con la fase (a);
- (c) una fase de espesamiento de la biomasa de algas efectuada en condiciones templadas;
- (d) una fase de inducción de la producción de lípidos, en la que se utilizan módulos que comprenden fotorreactores o estanques abiertos;
- (e) una fase de separación de la biomasa con un alto contenido de lípidos.

Al funcionar según el procedimiento de la presente invención, es posible:

- i) cultivar especies que tengan un alto grado de pureza, gestionando adecuadamente la posible contaminación externa (vaciado de los estanques de cultivo y reinoculación de los mismos);
- ii) cultivar microalgas limitando el uso de fotorreactores a la producción de inóculos de especies puras solamente, con una consiguiente reducción de costes;
- iii) minimizar los volúmenes del proceso necesarios para alcanzar las condiciones de inducción de la producción de lípidos introduciendo la fase (c);
- iv) hacer que el procedimiento sea continuo por el uso combinado de diversos módulos de fotorreactores y estanques abiertos.

La fase (a) para la producción de inóculos puede efectuarse en fotorreactores que tengan diversas formas y dimensiones: reactores tubulares lineales que tengan una forma cilíndrica o elíptica, reactores planares paralelepípedicos o cilíndricos, tales como los descritos en "Tredici M.R. (2004) Mass production of microalgae: photobioreactors. En el Handbook of Microalgal Culture de Richmond A (ed.). Blackwell Publishing, Oxford (UK), páginas 178-214". Se prefieren estos últimos, ya que son producidos por medio de películas hechas de material plástico soportado por una simple estructura de metal exterior y, por tanto, son baratos. Funcionan normalmente con un tiempo de retención hidráulica del orden de 1-2 días y llevan a concentraciones de biomasa de alrededor de 2 g de sustancia seca/litro. La relación entre el volumen del proceso de los sistemas de cultivo de la fase (a) y los de la fase (b) depende de las condiciones climáticas locales y de la cepa de alga cultivada. Está normalmente dentro del intervalo comprendido entre 0,05 y 0,15 y es preferentemente igual a 0,1.

El caldo de cultivo obtenido se utiliza para inocular sistemas de cultivo sobre una base discontinua (diaria o multidiaria).

Alternativamente, puede utilizarse sobre una base continua para incrementar la concentración de la biomasa de algas en los estanques abiertos de la base (b) y, por tanto, impedir el comienzo de fenómenos de contaminación externa. Los medios de reciclado acuosos que proceden de la fase (c), reintegrados con los nutrientes necesarios (esencialmente nitrógeno y sales de fósforo), se utilizan como agentes de crecimiento. La corriente de relleno acuosa puede consistir en agua residual industrial que se debe someter a un tratamiento terciario. En este caso, el cultivo de algas metaboliza las sustancias que contienen nitrógeno y fósforo incluidos en ellas, contribuyendo así a su purificación. Como CO₂ necesario para el crecimiento de las algas, puede utilizarse el contenido en gases de escape industriales (plantas termoeléctricas, plantas de generación de hidrógeno, etc.).

La fase (b) para el crecimiento de las algas puede tener lugar en estanques abiertos, tanto circulares como longitudinales. Se prefieren estanques de circulación típicos que tienen una forma longitudinal. Asimismo, en este caso, los tiempos de retención hidráulica son de 1 a 2 días. Su funcionamiento puede ser semicontinuo tomando una muestra del caldo de cultivo y alimentando los agentes de crecimiento (agua y nutrientes) por la mañana, o bien continuo con interrupción durante la noche. Se prefiere esta última opción, integrada adecuadamente con sistemas de control de la altura del nivel de líquido del sistema de cultivo controlado por los indicadores del crecimiento de las algas (medición de la densidad óptica, clorofila y relación posible entre ellas).

En el caso del comienzo de fenómenos de contaminación, los sistemas utilizados para efectuar la fase (a) y la fase (b) pueden descontaminarse periódicamente (lavados con agua o lavado con soluciones acuosas de desinfectantes).

La fase (c) para el espesamiento de la biomasa reduce ampliamente el volumen del proceso (al menos diez veces) haciendo ventajoso el uso de fotorreactores o reduciendo drásticamente el volumen de los estanques.

Esta fase se efectúa por medio de separación gravitacional en equipos de sedimentación utilizados típicamente en plantas de tratamiento de agua. Se ha encontrado que la sedimentación de cepas de algas de agua dulce, tal como, por ejemplo, *Scenedesmus* sp., se facilita ampliamente por el uso de polielectrolitos catiónicos (es decir, poliacrilamidas) utilizados en una cantidad de 2-5 ppm (paso de la concentración de algas de 0,4 a 0,5 g/litro hasta 40-50 g/litro en aproximadamente 1,5 horas).

ES 2 362 917 A1

La fase (d) para la maduración celular se efectúa con el objetivo de obtener condiciones de cultivo que conduzcan a un incremento en el contenido de la fracción de lípidos de la biomasa. A este respecto, el medio de crecimiento será mantenido con nitrógeno limitado, con lo que la corriente que procede de la fase (c) se integrará principalmente, si fuera necesario, con fuentes de fósforo y, posiblemente, con micronutrientes. Los sistemas de cultivo que pueden utilizarse en esta fase pueden comprender estanques abiertos y fotorreactores. La concentración de biomasa en la corriente que procede de la fase (c) se establece dependiendo del sistema de maduración seleccionado (del orden de un g/litro para estanques abiertos y decenas de g/litro para fotorreactores).

La fase (e) puede llevarse a cabo con sistemas análogos a los adoptados en la fase (c). La fase acuosa que se separa puede enviarse directamente al tratamiento final antes de que sea descargada o reciclada, después de la purga, para evitar la acumulación de metabolitos en todo el sistema.

La primera opción se adopta cuando el cultivo de algas se utiliza no sólo para la producción de biomasa, sino también para la purificación de agua residual (tratamiento terciario). Por el contrario, la segunda opción se utiliza cuando no está disponible agua residual y es necesario limitar las demandas de agua. La corriente de purga está comprendida generalmente entre el 1 y el 20% y preferentemente es igual al 10% de la corriente acuosa total generada por la separación.

20 Ejemplo 1

Cultivo semicontinuo con dilución diaria

Especie monoalgácea *Chlorella sorokiniana*.

Se utilizó la cepa de colección *Chlorella sorokiniana*, que crece normalmente en agua dulce.

El inóculo que se debe introducir en los sistemas de cultivo descritos a continuación se preparó como sigue:

- Se descongeló una muestra de cultivo monoalgácea previamente preservada a -85°C en una solución al 10% de glicerina dejándola a temperatura ambiente y se centrifugó a continuación para eliminar el sobrenadante.
- Se inoculó la pasta celular así obtenida en tres frascos de 250 ml que contenían 50 ml de solución con nutrientes.
- Se dejó crecer el cultivo en una cámara climática iluminada a una temperatura constante de 30°C en presencia de CO₂ en 0,5% de aire.
- Aproximadamente una semana después, el frasco alcanzó una concentración de 0,2 g/l, y se utilizó este cultivo como inóculo para tres frascos de 1 litro que contenían 500 ml de solución con nutrientes y se le colocó en una cámara climática.
- Después de dos días, el cultivo tenía una concentración de 0,4 g/l y formó el inóculo de las botellas Roux de 5 litros utilizadas en la experimentación de laboratorio para la preparación del inóculo necesario para la experimentación subsiguiente.

Se preparó un total de 60 litros de inóculo utilizando 12 botellas Roux (para los ensayos subsiguientes, el inóculo se redujo proporcionalmente al volumen de los reactores) que se iluminaron por medio de lámparas de tungsteno de 17.500 Lux. El CO₂ necesario para el crecimiento se suministró desde bombonas y se alimentó a un flujo medio de 25 litros/hora por botella Roux. Se midió de vez en cuando el pH de las botellas Roux individuales y, cuando se observaron desplazamientos de $\pm 0,2$ unidades con respecto a la neutralidad, se modificó manualmente el flujo de CO₂.

Medio de cultivo: todos los sistemas de cultivo (frascos, botellas Roux, fotorreactores, estanques abiertos) se probaron utilizando el siguiente medio de crecimiento:

KNO ₃	1,75 g/l
KH ₂ PO ₄	1,25 g/l
K ₂ HPO ₄	0,1 g/l
CaCl ₂	0,01 g/l
FeSO ₄ •7H ₂ O	0,003 g/l
MgSO ₄ •7H ₂ O	1,5 g/l

ES 2 362 917 A1

Microelementos: 1 ml/l de la siguiente solución: H_3BO_3 2,86 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,81 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 80 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 220 mg, Na_2MoO_4 210 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 25 g, EDTA 33,5 g y 1 gota de H_2SO_4 concentrado por litro. Ph de operación: 7,0.

5 La composición anterior se obtuvo modificando el medio de cultivo típico M4N indicado en la literatura para el cultivo de microalgas. En particular, se redujo el contenido de KNO_3 (desde 5,0 hasta 1,75 g/l; en la composición clásica, se contempla un fuerte exceso del componente nitrogenado, evitando así una adición diaria), se añadió K_2HPO_4 en una cantidad de 0,1 g/l y se redujo el contenido de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (desde 2,5 hasta 1,5 g/l).

10 *Sistema experimental*

La microalga *Chlorella sorokiniana* se probó utilizando un sistema tipo banco que comprenda estanques abiertos y un fotorreactor instalado a la intemperie.

15 La planta incluía cuatro unidades de cultivo: tres estanques abiertos de 375 litros con una superficie de 2,5 m² y un fotorreactor de 39 litros con una superficie iluminada de 0,98 m². Los estanques abiertos, siguiendo el diseño de los que forman los sistemas a gran escala (estanques de circulación mixtos con rueda de paletas), se equiparon con una rueda de paletas para mantener el cultivo de microalgas en agitación constante (variedad de 30 cm/s) y tenían una división longitudinal para crear un flujo continuo y circular por medio del movimiento de las paletas.

20 El fotorreactor comprendía un conjunto de 10 tubos, cada uno con un diámetro de 45 mm y 2 m de largo. El removido del cultivo se garantizó en este caso por gas (CO_2 y aire, alternativamente), que se envió al interior de los tubos, los cuales, además, estaban equipados con un sistema de refrigeración para impedir que la temperatura fuera superior a 32°C. Los estanques abiertos no estaban equipados con un sistema de control de temperatura. Cada unidad estaba equipada con sensores para vigilar la temperatura, el pH y la concentración del oxígeno disuelto.

La fuente de carbono consistía en CO_2 gaseoso, enviado directamente al interior del reactor y regulado por medio de medición del pH.

30 La figura 2 muestra un esquema de la planta banco descrita anteriormente, indicándose en el esquema que la fuente de CO_2 utilizada comprendía gases de escape procedentes de una caldera alimentada con metano del sistema de suministro.

La experimentación llevada a cabo con la configuración experimental descrita anteriormente se ilustra a continuación.

40 El fotorreactor F-1 y los tres estanques abiertos P-1, P-2, P-3 se inocularon en una cantidad de 5% de su volumen con los cultivos de algas efectuados en botellas Roux de laboratorio como se ha especificado previamente. El fotorreactor se inoculó tres días después de los estanques. Después de aproximadamente una semana de cultivo, se alcanzaron las condiciones de meseta con concentraciones de biomasa de 0,3-0,5 g/l en los estanques y 1-2 g/l en el fotorreactor. Los sistemas se hicieron funcionar de manera discontinua a las siguientes tasas de dilución: estanque P-1 30%, estanque P-2 45%, estanque P-3 60% y fotorreactor F-1 30%. La toma de muestras del caldo de cultivo y la alimentación en el medio de crecimiento en las cantidades necesarias para efectuar las diluciones requeridas se efectuaron en las primeras horas de la mañana (de 7 a 8).

45 Durante el ensayo, se vigiló diariamente el peso en seco del cultivo junto con la radiación solar, la temperatura, la concentración del oxígeno disuelto y el pH.

50 La figura 3 muestra las tendencias de la concentración de la biomasa de algas en los estanques abiertos y los fotorreactores. Puede observarse, como es bien conocido en la literatura, que los valores de concentración de los cultivos en sistemas cerrados (fotorreactor) son más altos con respecto a los de sistemas abiertos.

La figura 4 muestra los respectivos valores de productividad areal de los diferentes sistemas de crecimiento calculados por medio de la relación:

55

$$(C \times V)/S/T$$

60 en la que:

C = concentración de biomasa g/l

V = volumen del cultivo tomado diariamente (litros)

65

S = superficie de los sistemas de cultivo (huella, m²)

T = tiempo (1 día).

ES 2 362 917 A1

Se analizaron muestras de biomasa de algas en los días primero, tercero y sexto de la experimentación en tomas semicontinuas de los estanques abiertos y del fotorreactor para determinar el contenido de lípidos, proteínas, carbohidratos, carotenoides y clorofila. Los métodos utilizados y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.

5 Puede observarse que el contenido de las sustancias analizadas demostró ser relativamente estable, en particular en lo que concierne al contenido de lípidos.

10 Tal como puede observarse en las figuras previas, los estanques abiertos demostraron tener una pobre estabilidad a lo largo de un periodo de tiempo con esta configuración experimental. De hecho, después de aproximadamente diez días de experimentación, las células de las algas sufrieron una contaminación repentina por parte de bacterias y protozoos con la consiguiente desaparición casi total de la proliferación de algas en alrededor de dos días. Por el contrario, el fotorreactor mostró una actividad constante con el tiempo.

15 Las figuras 5 y 6 muestran fotografías de microscopio de los cultivos, antes y después de la contaminación. En la figura 6, puede observarse la presencia de varios protozoos que proliferan en el medio de cultivo. Esto puede atribuirse principalmente al tipo de sistema de cultivo que, debido a su amplia exposición al ambiente exterior, hace que pueda exponerse fácilmente a la colonización por parte de las otras especies vivas que crecen en competición con la que se está cultivando. Deberá observarse que estos fenómenos pueden verse favorecidos por la concentración relativamente baja de la especie de alga que tiende a producirse con el tiempo.

20

Ejemplo 2

Cultivo continuo con interrupción nocturna

25

Con el fin de intentar resolver problemas de contaminación de los estanques observados durante el ensayo previo, se adoptó un método de cultivo basado en la inoculación continua de los estanques con la biomasa en monocultivo procedente del fotorreactor y dilución constante de los propios estanques. Esto fue para favorecer la proliferación de la biomasa de algas y reducir la de las especies contaminantes.

30

El esquema del proceso se muestra en la figura 7.

Se utilizó una dilución igual al 30%, que, sobre la base de los ensayos previos, proporcionaba las concentraciones más altas de la biomasa, y se mantuvo la productividad en un nivel sustancialmente análogo al observado con las diluciones más altas.

35

Se probaron el fotorreactor F-1 solo y el estanque P-1, conectados en serie.

40 El procedimiento para la producción del inóculo para las dos unidades de crecimiento fue el descrito en el ejemplo 1.

40

El fotorreactor se alimentó con el medio de cultivo, de forma continua, durante 12 horas al día, a un caudal de 1,0 litros/hora. La corriente que salía del fotorreactor se alimentó al estanque P-1. Este último se alimentó también con el cultivo a un caudal de 8,4 litros/hora. Por tanto, el caudal en la salida de este sistema demostró ser igual a 9,4 litros/hora. De esta manera, una tasa de dilución se mantiene igual a la utilizada en el ensayo 1 con una dilución de alrededor del 30% ($9,4 \text{ l/h} * 12 \text{ horas/día} : 375 \text{ l} = 0,30$).

45

Análogamente, la tasa de dilución del fotorreactor demostró ser igual al 30% ($1,0 \text{ l/hr} * 12 \text{ horas/día} : 40 \text{ l} = 0,30$).

50

Teniendo en cuenta que el estanque se alimentó durante 12 horas al día, el tiempo total de retención hidráulica demostró ser igual a 3,3 días ($375 \text{ l} : 112,8 \text{ l/día} = 3,3 \text{ días}$), análogamente al del fotorreactor ($40 \text{ l} : 12 \text{ l/día} = 3,3 \text{ días}$).

55 El sistema demostró ser estable en estas condiciones y no se observaron los fenómenos de contaminación encontrados durante el ensayo previo. Se consideró concluido el experimento después de aproximadamente 30 días.

Las figuras 8 y 9 muestran las tendencias de la concentración de biomasa y la productividad areal encontradas en los dos sistemas de cultivo.

60

Una comparación de la figura 3 con la figura 8 muestra que la concentración de biomasa en el fotorreactor demostró estar en línea con las observadas en el ejemplo 1 (aproximadamente 2 g/l), mientras que la del estanque demostró ser más alta (alrededor de 0,7 frente a 0,5 g/l). El incremento de concentración en el estanque es debido probablemente a la contribución de la biomasa de algas alimentada de forma continua al fotorreactor (alrededor de 2 g/hora). Por tanto, el caudal másico, en condiciones de régimen, que salía del estanque abierto era igual a 6,6 g de biomasa/hora aproximadamente.

65

ES 2 362 917 A1

Asimismo, en este caso, se tomaron muestras de biomasa de algas cada tres días durante la experimentación continua, tanto de los estanques abiertos como del fotorreactor. En la tabla 2, se indican los valores de análisis de los lípidos, proteínas carbohidratos, carotenoides y clorofila.

- 5 Puede observarse que la composición celular es muy similar a la especificada en el ensayo del Ejemplo 1.

Ejemplo 3

10 *Cultivo continuo con estanque abierto de maduración final*

Con el fin de incrementar el contenido de lípidos, la biomasa se sometió a tensión por deficiencia de nitrógeno. Para esta finalidad, se produjo una nueva configuración experimental añadiendo, aguas abajo del sistema descrito en el ensayo previo, un estanque adicional (P-1M) indicado como estanque de maduración. Este tenía un volumen útil de 112,8 litros (dimensiones: base de 0,75 metros cuadrados por 15,0 cm de altura de cultivo) gestionado también de manera continua. Las corrientes que entraban y salían del estanque de maduración eran iguales a 9,4 l/hora. Se seleccionó su volumen útil para obtener un tiempo de retención hidráulico igual a 1 día (con respecto a 3,3 días de los otros dos reactores).

20 La condición de tensión por limitación de nitrógeno se efectuó eliminando la alimentación del medio de cultivo y CO₂.

El esquema de la planta para este ensayo se muestra en la figura 10.

25 Con el fin de impedir que el estanque de maduración se alimentara con nitrógeno procedente de un exceso de KNO₃ alimentado al estanque P-1 (una condición que se adopta normalmente en sistemas de crecimiento tradicionales), a pesar de la falta de administración del medio de cultivo, se redujo la concentración de KNO₃ en el medio de cultivo (desde 1,75 g/l hasta 0,45 g/l) que entraba en el estanque anterior para suministrar una cantidad que era estrictamente necesaria para el crecimiento de microalgas.

30 En consecuencia, la concentración de nitrógeno en la corriente que salía de este estanque y que se alimentó al estanque de maduración era extremadamente baja con valores de aproximadamente 0,006 g/litro.

35 Deberá observarse que, para alcanzar este resultado, no fue necesario variar la concentración de KNO₃ en el medio de cultivo que se alimentaba al fotorreactor F-1 (de nuevo 1,75 g/l), dejando en consecuencia inalteradas sus condiciones de crecimiento.

40 En estas condiciones experimentales, la productividad del estanque de maduración fue casi nula, pero los valores de peso en seco permanecieron muy similares a los del estanque P-1. La figura 11 muestra los valores de peso en seco de los estanques P-1 y P-1M, mientras que la figura 12 indica la productividad areal diaria de la biomasa de algas de todo el sistema que comprende el fotorreactor, el estanque de crecimiento P-1 y el estanque de maduración P-1M.

45 Observando los valores de la composición celular, es evidente que, durante la fase de maduración, las células reaccionan a la condición de tensión produciendo más lípidos en detrimento principalmente de las proteínas (tabla 3).

50 Para la finalidad de la productividad de lípidos por unidad de superficie, el incremento en porcentaje de lípidos en las células compensa ampliamente la productividad areal inferior de la biomasa de todo el sistema como se muestra en el siguiente cálculo, que confirma la eficacia de la solución adoptada.

Ejemplo 2

55 *Lípidos producidos*

$22,56 \text{ g de biomasa/m}^2/\text{día (productividad areal total)} \times 0,16 \text{ (\% de lípidos en la biomasa)} = 3,6 \text{ g de lípidos/m}^2/\text{día}$
(productividad areal diaria de lípidos).

60

Ejemplo 3

Lípidos producidos

65 $17 \text{ g de biomasa/m}^2/\text{día (productividad areal total)} \times 0,37 \text{ (\% de lípidos en la biomasa)} = 6,29 \text{ g de lípidos/m}^2/\text{día}$
(productividad areal diaria de lípidos).

ES 2 362 917 A1

Tal como puede observarse, se registró un incremento en la producción de lípido de más del 40%.

TABLA 1

Análisis de la biomasa de algas producida durante el ensayo del ejemplo 1

Sustancia	Método analítico	Cantidad (% peso/peso en seco)
Proteínas	Bradford, Bio-rad Protein Assay. Analyt. Biochem 72, 248 (1976)	61,7 ± 2,5
Clorofila a+b	Método SCOR-UNESCO (1996)	3,64 ± 0,2
Carotenoides	Kubin & Kubinova (1985)	0,93 ± 0,1
Lípidos	Bligh y Dyer, Journal of Biochem Physiology 37, 911-917 (1959)	14,33 ± 1,3
Carbohidratos	Trevelyan y Harrison, Arch. Biochem. Biophys. 39(2): 419-39 (1952)	17,94 ± 0,5

TABLA 2

Análisis de la biomasa de algas producida durante el ensayo del ejemplo 2

Sustancia	Método analítico	Cantidad (% peso/peso en seco)
Proteínas	Bradford, Bio-rad Protein Assay. Analyt. Biochem 72, 248 (1976)	60,3 ± 2,0
Clorofila a + b	Método SCOR-UNESCO (1996)	3,23 ± 0,3
Carotenoides	Kubin & Kubinova (1985)	0,87 ± 0,2
Lípidos	Bligh y Dyer, Journal of Biochem Physiology 37, 911-917 (1959)	16,10 ± 1,1
Carbohidratos	Trevelyan y Harrison, Arch. Biochem. Biophys. 39(2): 419-39 (1952)	16,74 ± 0,5

ES 2 362 917 A1

TABLA 3

Análisis de la biomasa de algas producida durante el ensayo del ejemplo 3

Sustancia	Método analítico	Cantidad (%peso/peso en seco)
Proteínas	Bradford, Bio-rad Protein Assay. Analyt. Biochem 72, 248 (1976)	43,2 ± 2,3
Clorofila a + b	Método SCOR-UNESCO (1996)	0,9 ± 0,2
Carotenoides	Kubin & Kubinova (1985)	1,1 ± 0,3
Lípidos	Bligh y Dyer, Journal of Biochem Physiology 37, 911-917 (1959)	37,2 ± 1,5
Carbohidratos	Trevelyan and Harrison, Arch. Biochem. Biophys. 39(2): 419-39 (1952)	15,2 ± 0,5

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la producción de biomasa de algas con un elevado contenido de lípidos, **caracterizado** porque comprende:

- (a) la producción de inóculos con el fin de llevar a cabo la fase (b), en fotorreactores;
- (b) el cultivo masivo de la biomasa de algas en estanques abiertos inoculados con la fase (a);
- 10 (c) una fase de espesamiento de la biomasa de algas, llevada a cabo en condiciones templadas;
- (d) una fase de inducción de la producción de lípidos, en la que se utilizan módulo que comprenden fotorreactores o estanques abiertos;
- 15 (e) una fase de separación de la biomasa con un elevado contenido de lípidos.

20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la fase (a) para la preparación de los inóculos se lleva a cabo en fotorreactores planares que tienen una forma cilíndrica producida por medio de una película de material plástico soportada por una simple estructura metálica externa.

25 3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los inóculos preparados durante la fase (a) se utilizan para inocular estanques abiertos sobre una base discontinua o una base continua.

30 4. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el medio acuoso reciclado que procede de la fase (c) se reintegra con los nutrientes necesarios y se utiliza como agente de crecimiento de la fase (a) y la fase (b).

35 5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque el medio acuoso reciclado procedente de la fase (c) se reintegra con una corriente acuosa que comprende agua residual industrial que se debe someter a tratamiento terciario.

40 6. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el CO₂ necesario para el cultivo de algas es proporcionado por gases de escape industriales.

45 7. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la fase (b) para el cultivo de la biomasa de algas tiene lugar en estanques abiertos que presentan una forma longitudinal, del tipo "estanques de circulación mixtos con rueda de paletas", equipados con una rueda de paletas para mantener el cultivo de microalgas en agitación constante.

50 8. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los estanques abiertos se hacen funcionar de manera semicontinua, con la toma de muestras del caldo de cultivo y la alimentación de los agentes de crecimiento por la mañana, o de forma continua con interrupción durante la noche.

55 9. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la fase de espesamiento (c) de la biomasa de algas se lleva a cabo por medio de separación gravitacional en balsas de sedimentación típicamente utilizadas en plantas de tratamiento de agua.

60 10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque el espesamiento de la biomasa se obtiene utilizando polielectrolitos catiónicos.

65 11. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fase de inducción de la producción de lípidos tiene lugar en el medio de crecimiento mantenido con limitación de nitrógeno.

Fig. 1

Sistema para la producción de microalgas con un alto contenido de lípidos

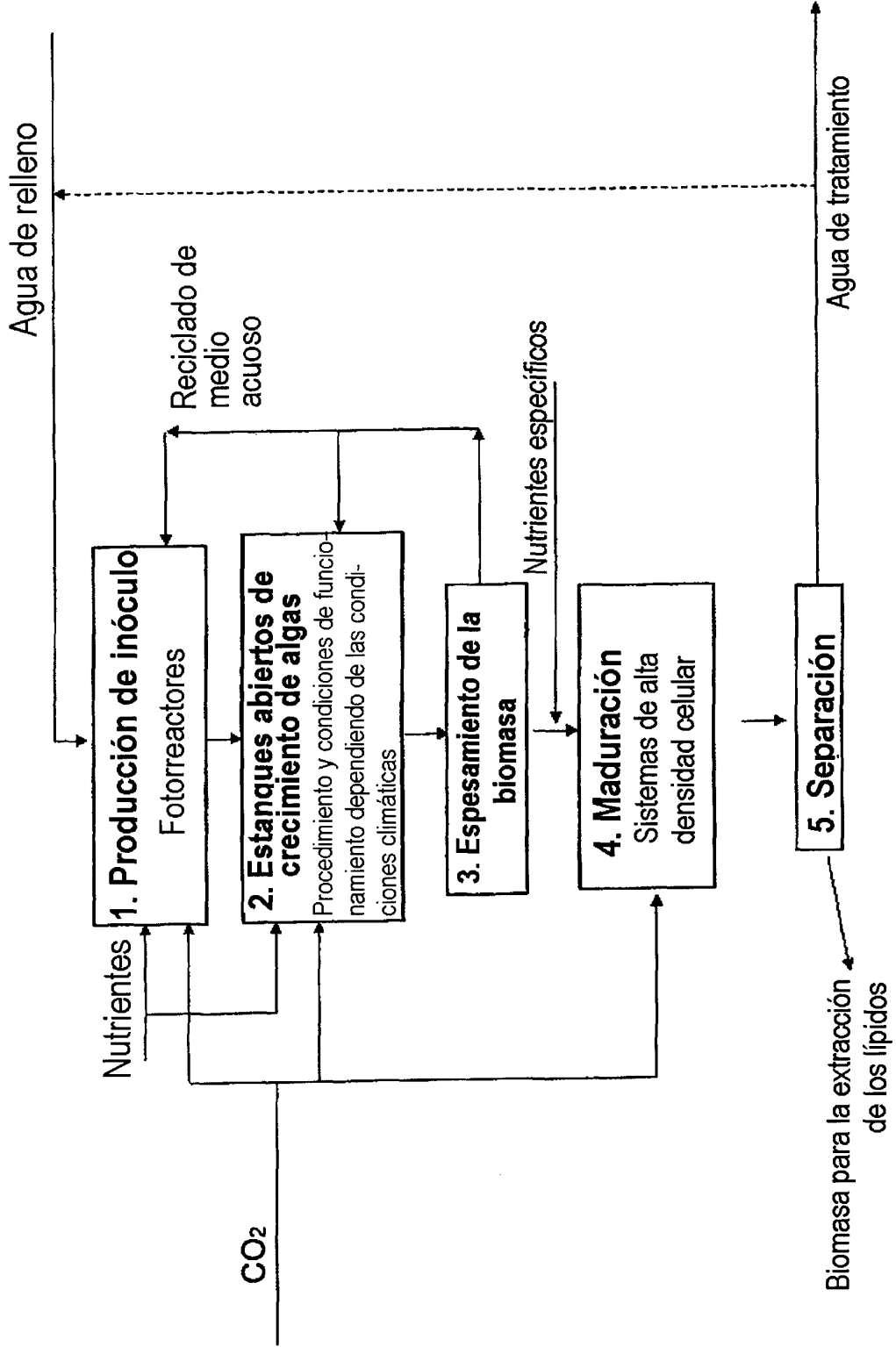


Fig. 2

Esquema de planta banco

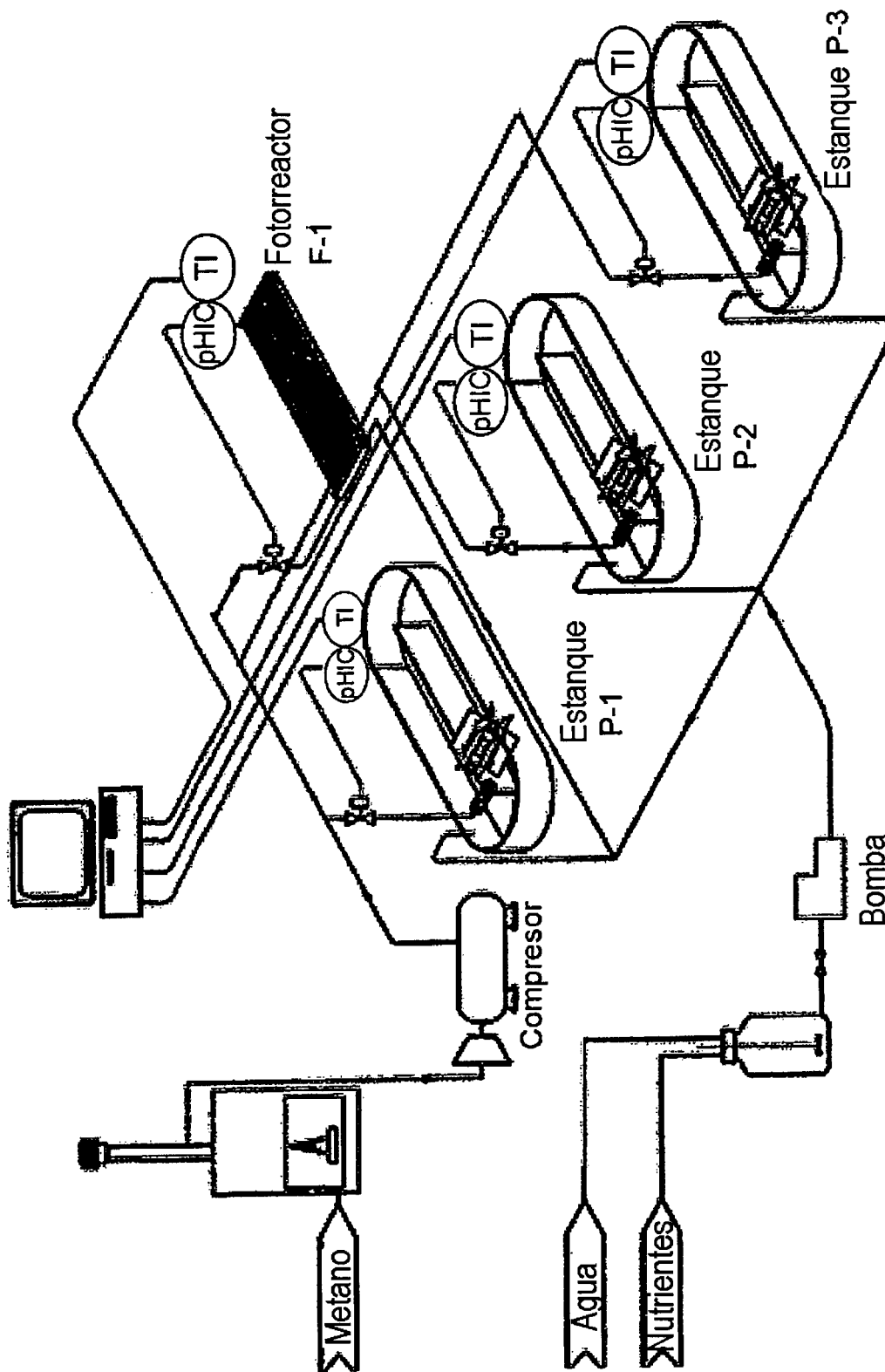


Fig. 3

Concentración de biomasa en estanques abiertos y fotorreactor

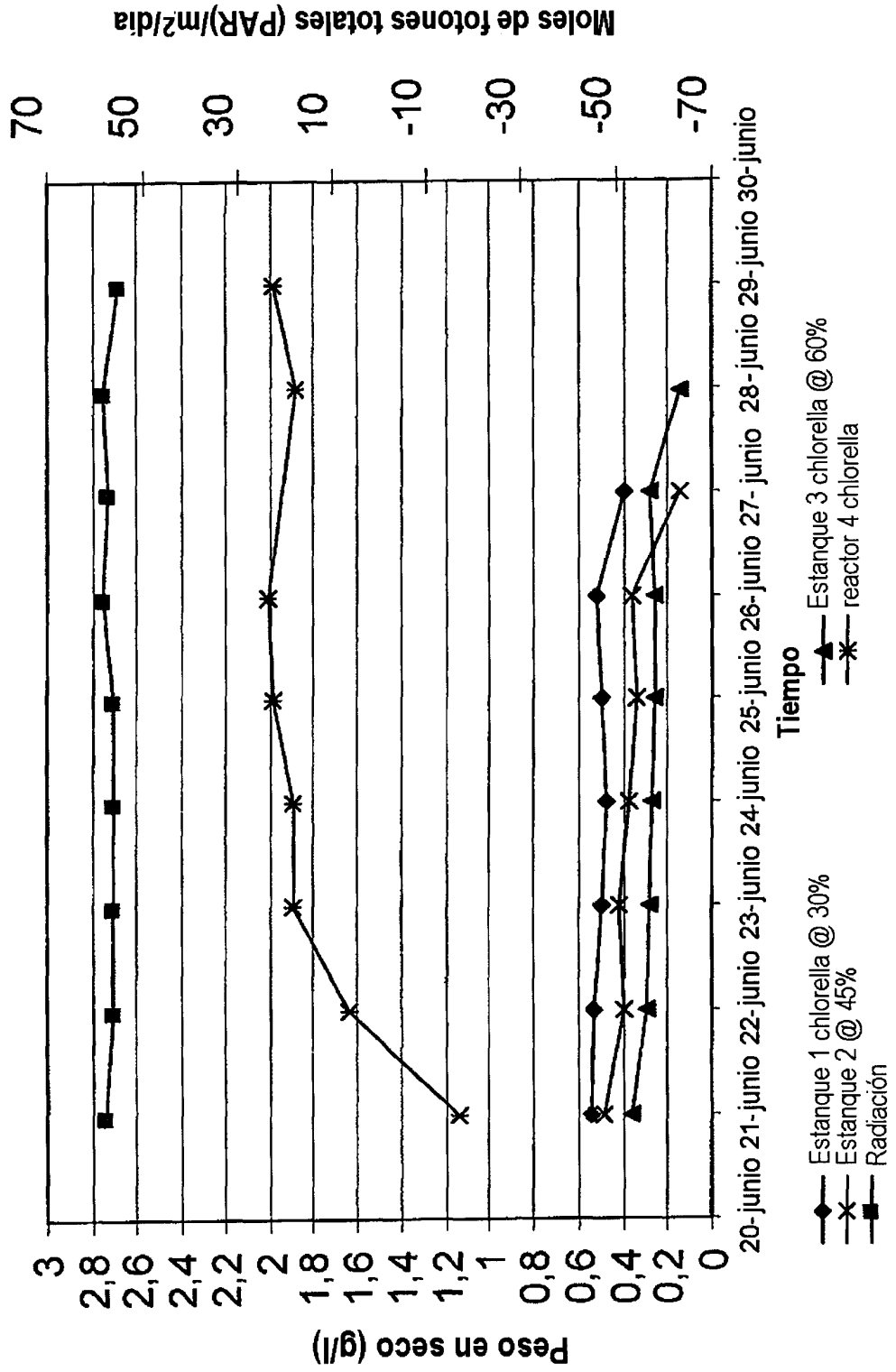


Fig. 4

Productividad areal de estanques abiertos y fotorreactor

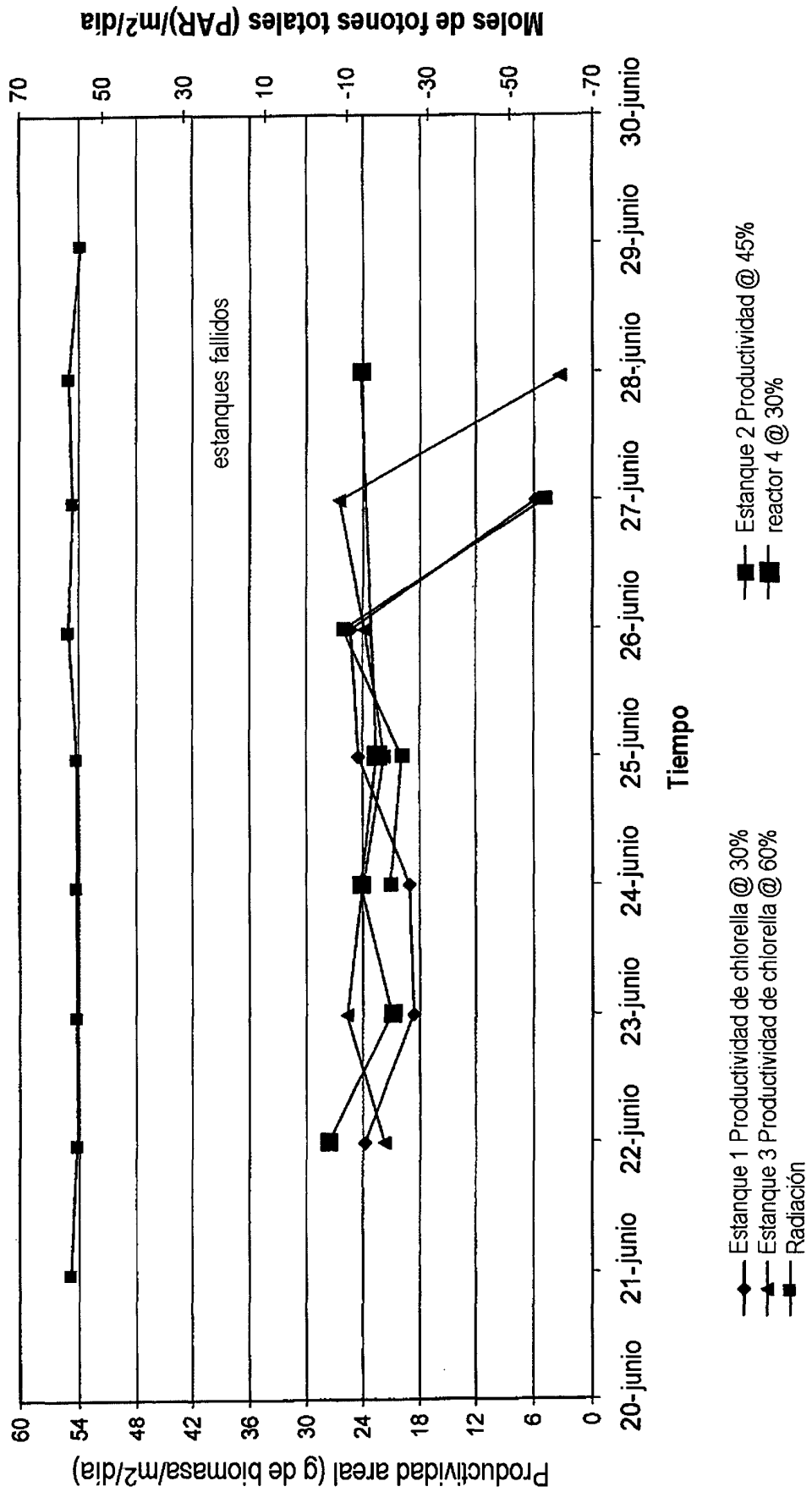


Fig. 5

Cultivo de algas no contaminado

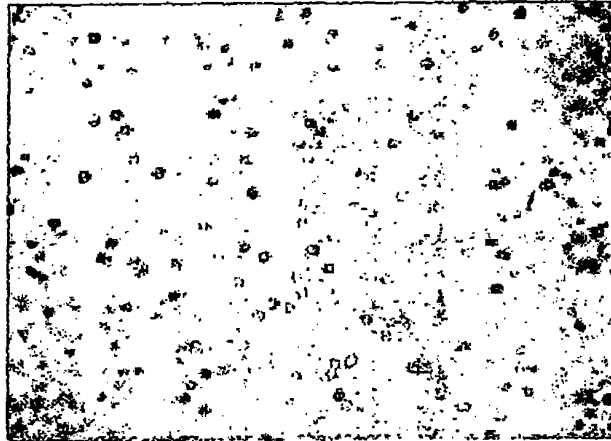
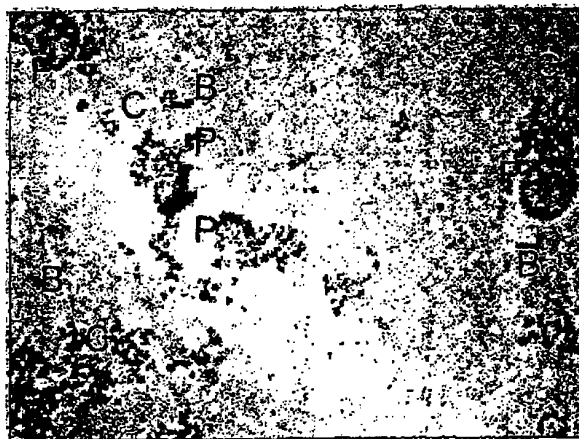


Fig. 6

**Cultivo de algas después de
contaminación**



P = Protozoos
B = Bacterias
C = Muerte de células de algas

Fig. 7

Esquema de la configuración experimental para el ensayo continuo

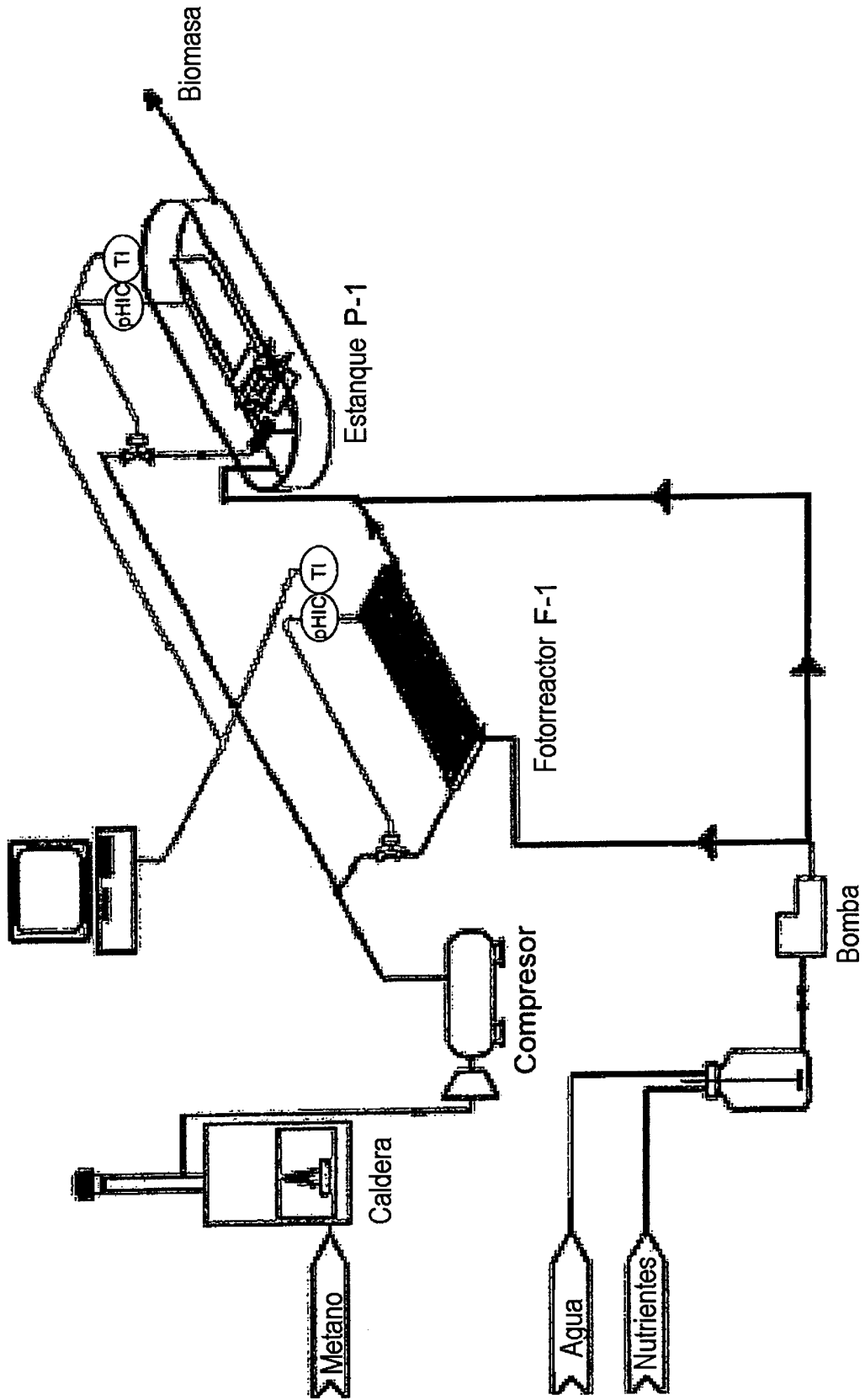


Fig. 8

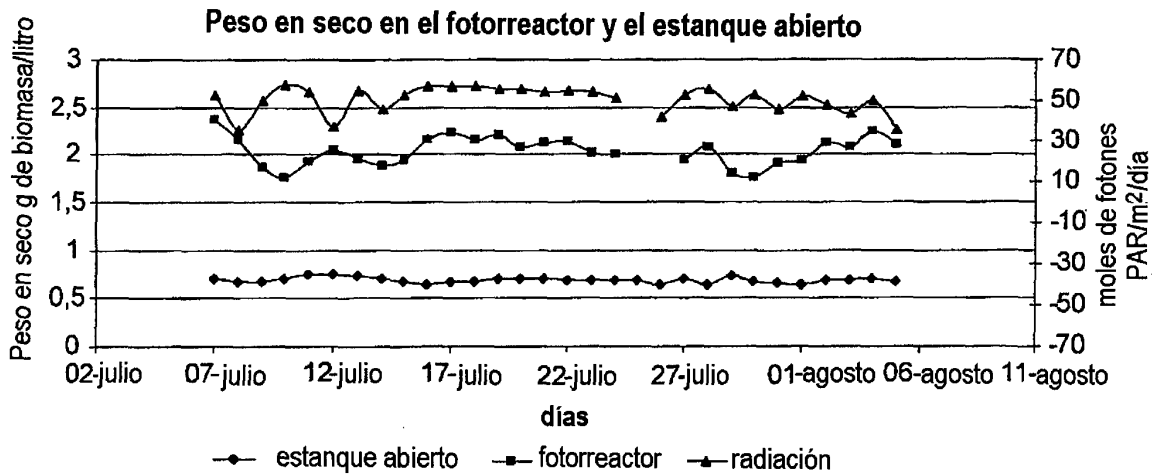


Fig. 9

Productividad areal de fotorreactor, estanque abierto y sistema global

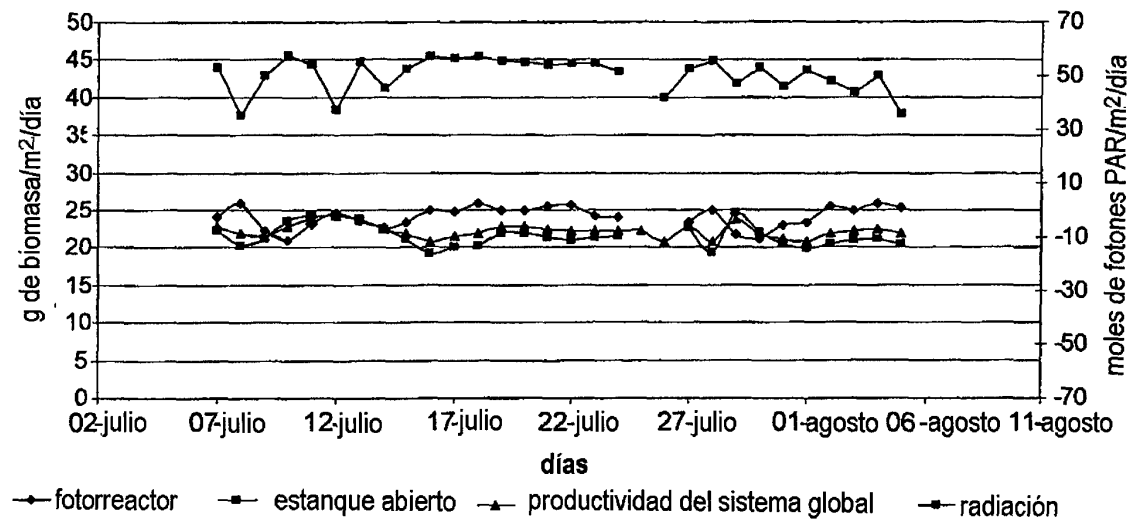


Fig. 10

Configuración experimental para el ensayo con estanque de maduración

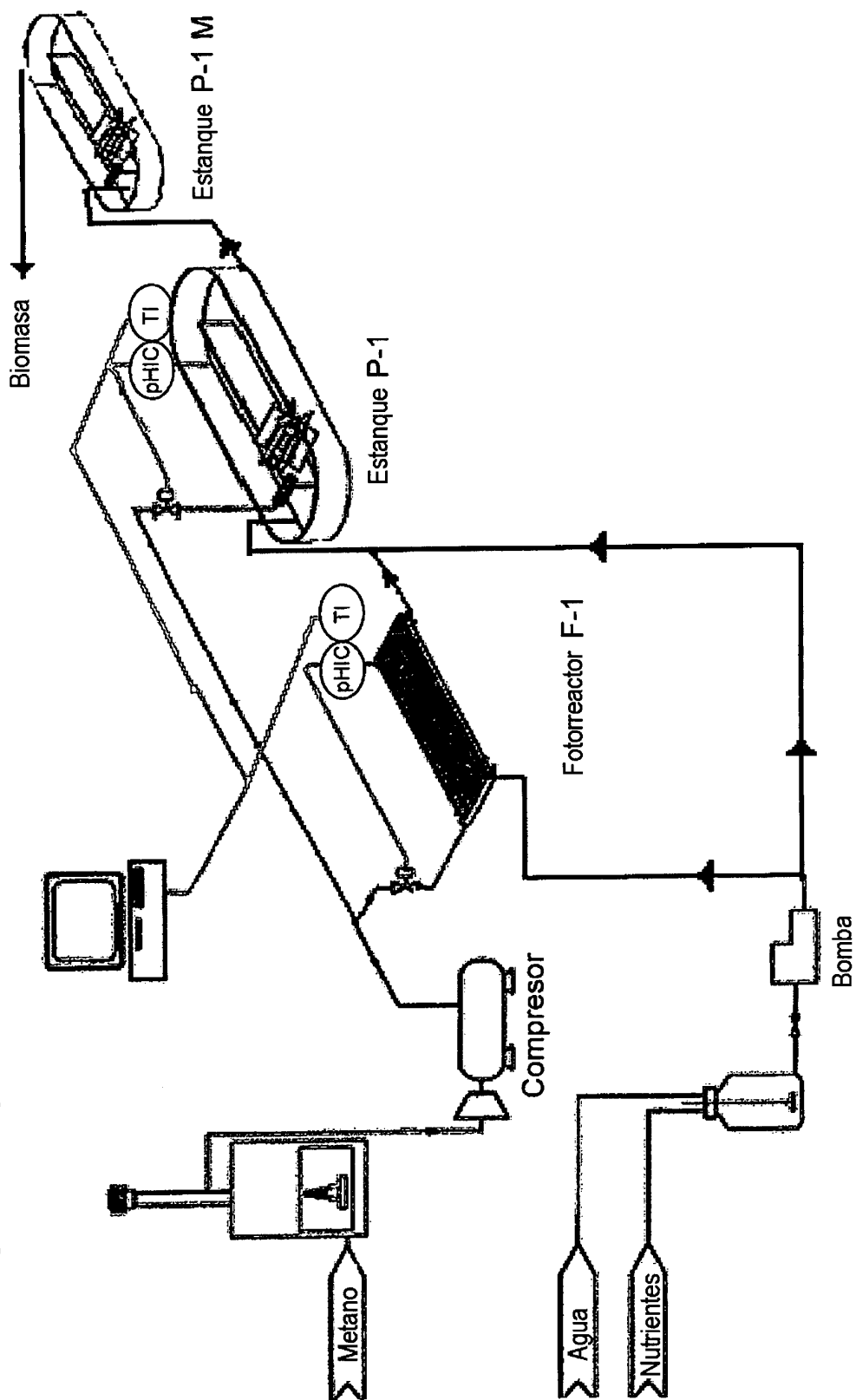


Fig. 11

Pesos en seco del estanque de crecimiento y el estanque de maduración

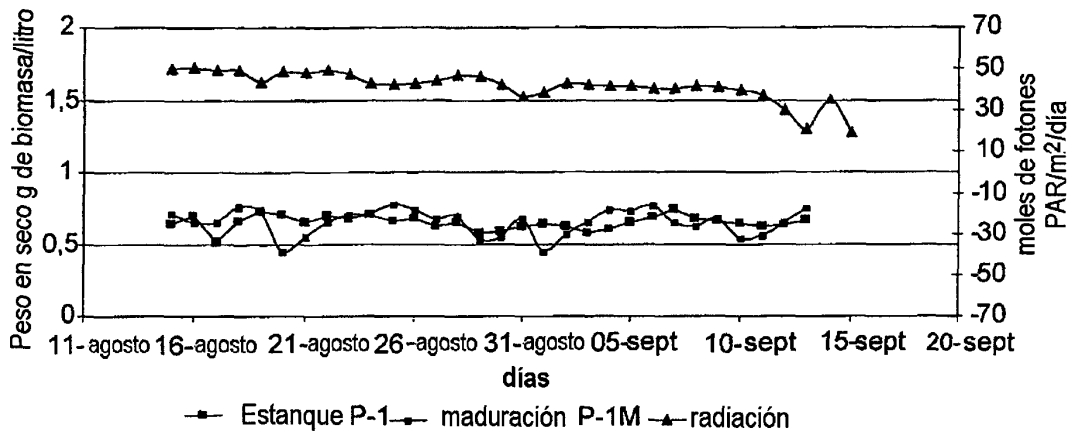
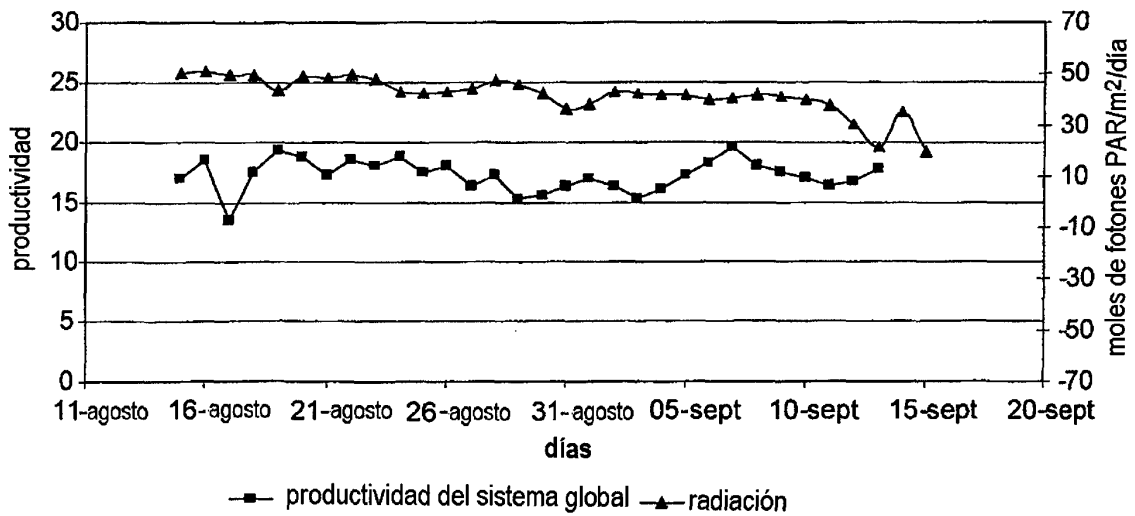


Fig. 12

Daily areal productivity of the overall system





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201050011

22 Fecha de presentación de la solicitud: 03.12.2008

32 Fecha de prioridad: **14-12-2007**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **C12N1/12** (2006.01)
C12M1/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO 0174990 A1 (STICHTING ENERGIE et al.) 11.10.2001, todo el documento.	1-11
Y	WO 9407993 A1 (CONSERVATOIRE NAT ARTS et al.) 14.04.1994, todo el documento..	1-11
Y	CHAUMONT D.: "Biotechnology of Algal Biomass Production: A Review of Systems for Outdoor Mass Culture" J. Applied Phycology (1993), vol. 5 (6), pp.: 593-604, ISSN 0921-8971, todo el documento.	1-5,7,8
Y	MUÑOZ R et al.: "Algal-Bacterial Processes for the Treatment of Hazardous Contaminants: A Review", Water Research (2006), vol. 40 (15), pp.: 2799-2815, ISSN 0043-1354, páginas 2799, 2804-2807 y 2810.	1,2,5,6
Y	WO 0154510 A1 (OMEGATECH INC et al.) 02.08.2001, página 3, línea 10 – página 4, línea 18.	1,9,11
Y	ILLMAN A M et al.: "Increase in Chlorella Strains Calorific Values when Grown in Low Nitrogen Medium", Enz. Microb. Technol. (2000), vol. 27 (8), pp.: 631-635, ISSN 0141-0229, página 631.	1,6,11
Y	WO 2007109066 A (PETROALGAE LLC) 27.09.2007, todo el documento, en particular, página 8, párrafo [0044].	1,3
Y	PUSHPARAJ B et al.: "Microbial Biomass Recovery Using a Synthetic Cationic Polymer", Bioresour. Technol. (1993), vol. 43 (1), pp.: 59-62, ISSN 0960-8524, resumen.	1,4,10
A	BLANCO ANTONIO M et al.: "Outdoor cultivation of lutein-rich cells of <i>Muriellopsis sp</i> in open ponds", Appl. Microbiol. Biotechnol. (2007), vol. 73 (6), pp.: 1259-1266, ISSN 0175-7598, todo el documento.	
A	US 4236349 A (RAMUS JOSEPH S) 02.12.1980, todo el documento.	
A	WO 2007025145 A2 (SUNSOURCE IND et al.) 01.03.2007, todo el documento.	

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
24.06.2011

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/5

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

C12N, C12M

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, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.06.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-11	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	WO 0174990 A1 (STICHTING ENERGIE et al.)	11.10.2001
D02	WO 9407993 A1 (CONSERVATOIRE NAT ARTS et al.)	14.04.1994
D03	CHAUMONT D.: "Biotechnology of Algal Biomass Production: A Review of Systems for Outdoor Mass Culture" J. Applied Phycology (1993), vol. 5 (6), pp.: 593-604, ISSN 0921-8971, todo el documento.	
D04	MUNOZ R et al.: "Algal-Bacterial Processes for the Treatment of Hazardous Contaminants: A Review", Water Research (2006), vol. 40 (15), pp.: 2799-2815, ISSN 0043-1354, páginas 2799, 2804-2807 y 2810.	
D05	WO 0154510 A1 (OMEGATECH INC et al.)	02.08.2001
D06	ILLMAN A M et al.: " Increase in Chlorella Strains Calorific Values when Grown in Low Nitrogen Medium", Enz. Microb. Technol. (2000), vol. 27 (8), pp.: 631-635, ISSN 0141-0229, página 631.	
D07	WO 2007109066 A (PETROALGAE LLC) 27.09.2007, todo el documento, en particular, página 8, párrafo [0044].	
D08	PUSHPARAJ B et al.: "Microbial Biomass Recovery Using a Synthetic Cationic Polymer", Bioresourc.Technol. (1993), vol. 43 (1), pp.: 59-62, ISSN 0960-8524, resumen.	
D09	BLANCO ANTONIO M et al.: "Outdoor cultivation of lutein-rich cells of Muriellopsis sp in open ponds", Appl. Microbiol. Biotechnol. (2007), vol. 73 (6), pp.: 1259-1266, ISSN 0175-7598, todo el documento.	
D10	US 4236349 A (RAMUS JOSEPH S) 02.12.1980, todo el documento.	
D11	WO 2007025145 A2 (SUNSOURCE IND et al.) 01.03.2007, todo el documento.	

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

La solicitud reivindica un procedimiento para producir biomasa de algas con un elevado contenido de lípidos que comprende la producción de inóculos de algas en fotorreactores, el cultivo masivo de biomasa en estanques inoculados con dichos inóculos, espesamiento de la biomasa, inducción de la producción de lípidos y separación de la biomasa con alto contenido en lípidos.

D01 describe un procedimiento para el cultivo de algas en estanques abiertos inoculados con algas precultivadas bajo condiciones controladas en un fotorreactor cerrado. El procedimiento incluye la recuperación de la biomasa producida (reiv. 1) y la de obtención de otras sustancias como ácidos grasos, en particular ácidos grasos poliinsaturados (PUFA).

El procedimiento reivindicado en la reivindicación 1 se diferencia del descrito en D01 en que comprende adicionalmente una fase de espesamiento de biomasa y la posterior producción de lípidos. Sin embargo, era de general conocimiento en la fecha de prioridad de la solicitud que el contenido en lípidos de las algas, puede aumentarse mediante condiciones limitantes de nitrógeno (véase, por ej.: en D05, pág. 3, líneas 10 a 14 y pág. 3, línea 29 a pág. 4, línea 18; o D6, pág. 631, columna 2, párrafo 2º). Así, sería obvio para un experto en la materia llegar al procedimiento de la reivindicación 1 para solucionar el problema técnico de diseñar un procedimiento para obtener una mayor recuperación de lípidos.

D02 describe un procedimiento para la producción de biomasa de microalgas con un alto contenido de metabolitos de interés comercial como los lípidos, p. ej.: ácido eicosapentaenoico (pág. 1, líneas 1-19). En dicho proceso las algas se cultivan para obtener cantidades sustanciales de biomasa. Posteriormente, la biomasa se concentra y se la expone a condiciones determinadas para que se produzca la acumulación del metabolito. A continuación, se recolecta la biomasa así obtenida (pág. 2, líneas 17-25). En la pág. 2, líneas 26 a 28 se expone que la biomasa se produce según los métodos conocidos en el estado de la técnica anterior para conseguir una producción óptima de biomasa.

A la vista de este estado de la técnica anterior, el problema técnico planteado sería el de diseñar un procedimiento adicional para la producción de biomasa de algas con un alto contenido lipídico. La manera de solucionar este problema técnico mediante el procedimiento de la reivindicación 1 se diferencia del descrito en el estado de la técnica anterior en que los inóculos se producen en fotorreactores y que el cultivo masivo de la biomasa de algas se lleva a cabo en estanques abiertos. Sin embargo, esta solución no puede considerarse como que implique una actividad inventiva a la vista de D01, que describe la inoculación de sistemas de cultivo de estanques abiertos con algas precultivadas en fotorreactores cerrados para prevenir infecciones no deseadas provocadas por microorganismos. El mismo principio se discute también en D07.

Hay que señalar, asimismo, que en la fecha de la prioridad, ya se conocían varios tipos de fotorreactores aptos para el cultivo de microalgas. Por ejemplo, D03 menciona el uso generalizado de sistemas de cultivo en estanques abiertos y que las limitaciones técnicas y biológicas de los mismos está provocando un aumento de la utilización de fotorreactores cerrados (resumen y pág. 596-7).

En D04 también se comenta sobre el uso de biorreactores abiertos frente a fotorreactores cerrados (pág. 2804-5), que los últimos "generalmente son más costosos de construir, pero más eficientes que los sistemas abiertos" (resumen). De este modo, un experto en la materia, ante el problema planteado, elegiría el tipo de biorreactor que debería utilizarse a partir de las posibilidades conocidas (fotobiorreactor abierto o cerrado) de acuerdo con las circunstancias, sin realizar un ejercicio de actividad inventiva para solucionar el problema técnico planteado.

Por otro lado, las reivindicaciones dependientes 2-11 no contienen características técnicas tales que, en combinación con las características técnicas de cualquier reivindicación a la que se refieran, cumplan los requerimientos de actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/1986. Esas características ya se han utilizado para los mismos propósitos en procedimientos para la producción de biomasa de algas (ver, en particular, D01 y D04 respecto a las reivindicaciones 5 y 6, D05 y D06 respecto a la reivindicación 11 y D08 respecto a las reivindicaciones 4 y 10

Así pues, se considera que las reivindicaciones 1-11 de la solicitud cumplen el requisito de novedad en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986. Sin embargo, se estima que las reivindicaciones 1-11 no cumplen los requerimientos de actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/1986.