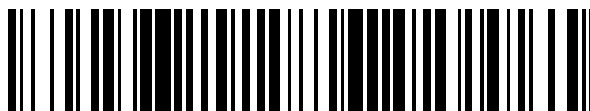


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 355**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2009** **E 10075755 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013** **EP 2311970**

54 Título: **Procedimiento para la producción de bioproductos**

30 Prioridad:

28.04.2008 GB 0807619

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.08.2013

73 Titular/es:

**NATURALLY SCIENTIFIC TECHNOLOGIES
LIMITED (100.0%)**

**22 Wycombe End
Beaconsfield Buckinghamshire HP9 1NB, GB**

72 Inventor/es:

**WHITTON, PETER ANDREW;
DIXON, GEOFFREY ROBERT y
MERRELL, WILLIAM TIMOTHY**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 421 355 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de bioproductos

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a la producción de aceites vegetales, ácidos grasos y otras fuentes de biocombustibles a partir de células vegetales cultivadas en cultivo de tejido.

Introducción

La mención o la descripción de un documento aparentemente publicado anteriormente en esta memoria descriptiva no debe tomarse necesariamente como un reconocimiento de que el documento forma parte del estado de la técnica, o es el conocimiento general común.

- 10 Es bien conocido y descrito que el uso de combustibles fósiles es perjudicial para el medio ambiente y la atmósfera del planeta. También es bien sabido que los combustibles fósiles son un recurso finito que no puede durar indefinidamente.

Como resultado de esto ha habido mucha investigación y la investigación de fuentes de energía alternativas como la nuclear, eólica, solar, pilas de combustible de hidrógeno y los biocombustibles.

- 15 La demanda de combustible de origen biológico, es decir, ésteres metílicos de ácidos grasos ha crecido exponencialmente recientemente debido a diversas iniciativas internacionales gubernamentales para reducir la dependencia de los combustibles derivados del petróleo como el gasóleo y la gasolina.

- 20 Para satisfacer esta demanda se ha incrementado la presión sobre la agricultura para dedicar más tierras y recursos al cultivo de plantas oleaginosas como la soja, la colza y el maíz y, por lo tanto, hay menos tierra disponible para la producción de alimentos. Esta demanda ha llevado también a la deforestación de ciertas áreas con el fin de sembrar cultivos de semillas oleaginosas.

Es obvio para los expertos en la técnica que este procedimiento es más probable que conduzca a un aumento del calentamiento global y la pobreza del tercer mundo más que aliviarlo.

- 25 El cultivo de tejidos de células vegetales se conoce como un procedimiento para propagación de plantas o para el cultivo de tejidos específicos de las plantas con el fin de cosechar productos vegetales específicos.

- 30 También es evidente que la producción de aceite vegetal para la producción de combustible es extremadamente intensiva para la tierra, ya que se produce menos de una tonelada de aceite por hectárea de tierra dedicada a la producción. Esto es debido al hecho de que sólo las semillas de la planta producen aceite y sólo ciertos tejidos dentro de la semilla. Por tanto, el resto del tejido de la planta se desperdicia en este procedimiento de producción. Además, cada planta debe ser plantada a una cierta distancia de su vecina (esta distancia dependerá de la especie vegetal utilizada).

Por lo tanto, se ha hecho evidente que con el fin de satisfacer la creciente demanda mundial de biocombustibles, se requiere una fuente o procedimiento de producción alternativo de estos combustibles.

- 35 El procedimiento actual para la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos a partir de los aceites vegetales también tiene una desventaja importante, ya que en la producción de los ésteres metílicos los triglicéridos del aceite se descomponen en ácidos grasos libres y glicerina. El volumen de glicerina producida por este procedimiento es actualmente más que la demanda de fuentes industriales para el producto. Esto conducirá a más problemas en el futuro, ya que habrá que desarrollar procedimientos para la eliminación segura de glicerina a gran escala.

- 40 Es bien sabido en la técnica que las células vegetales se pueden mantener en cultivo de tejidos. El cultivo de tejidos es un término usado para describir el procedimiento por el que las células vegetales se cultivan fuera de una planta intacta en un medio nutriente adecuado. El cultivo de tejidos se define como un procedimiento en el que partes de una planta se transfieren a un ambiente artificial en el que pueden seguir sobreviviendo. El término cultivo de tejidos tal como se entiende en la técnica se refiere a tejido cultivado que puede consistir en células individuales o grupos de células vegetales, protoplastos o enteros o partes de un órgano de la planta.

- 45 En el cultivo de tejidos, las células vegetales se pueden cultivar sobre una superficie sólida como grumos de color pálido conocidos como cultivo de callo o como agrupaciones individuales o pequeñas de células conocidas como cultivo en suspensión. Las células crecidas en cultivo se están dividiendo activamente y se pueden mantener en un estado indefinidamente no diferenciado mediante la transferencia de las células a medio fresco (subcultivo). Las células cultivadas también pueden ser inducidas a rediferenciarse en plantas enteras.

- 50 El cultivo de tejidos es bien conocido en el campo de la biología vegetal y tiene varias aplicaciones, por ejemplo, puede ser utilizado para producir grandes cantidades de plantas o material vegetal en un corto período de tiempo (micropropagación).

Los cultivos de tejidos vegetales se pueden iniciar desde casi cualquier parte de la planta de origen (denominado explante), aunque las partes más jóvenes de la planta son en general más útiles, ya que contienen más células que se dividen activamente.

5 Aunque el cultivo de tejidos es bien conocido en la técnica, las diferentes plantas pueden variar en las condiciones exactas requeridas para mantener las células en cultivo.

Las células en cultivo de tejidos son generalmente diferentes de las de una planta intacta. También es bien conocido en la técnica que las células vegetales cultivadas producen diferentes cantidades y cantidades alteradas de metabolitos (Dicosmo y G Delle Monache, 1995, Phytochemistry, 39, 575-580).

10 El documento WO 2009/093367 describe un sistema cerrado que contiene una mezcla de sólido/líquido que contiene azúcar, levadura y cloroplastos, a) una reacción en la que la mezcla sólido/líquido que contiene azúcar es fermentada por la levadura y se produce etanol, b) una reacción en la que el dióxido de carbono producido durante la fermentación de a) se somete a la fotosíntesis por medio de los cloroplastos de la planta y la irradiación con la luz de los diodos emisores de luz y c) una reacción en la que el azúcar obtenido en b) es fermentada por la levadura y el etanol es producido en paralelo y la invención se basa en este descubrimiento. Se describe que los cloroplastos que se utilizan son preferentemente de tal manera que las membranas celulares de la planta se han dividido de tal forma que el azúcar que se produce por la fotosíntesis se fermenta de manera eficiente por la levadura en la solución, y, además, que los cloroplastos de las cianobacterias son los cloroplastos preferidos para su uso.

20 El documento DE 100 59 372 A1 divulga un sistema en el que un primer cultivo de células de algas fotosintéticas se utilizan para producir hidratos de carbono y, según los autores, estos hidratos de carbono son utilizados para apoyar el crecimiento de un cultivo bacteriano que produce hidrógeno y dióxido de carbono. No hay ejemplos prácticos del sistema y la divulgación parece ser totalmente hipotética. No enseña ni sugiere ninguna alternativa al uso de células de algas para producir hidratos de carbono.

25 El documento CA 2 005 462 A1 describe sistemas de fijación de carbono fotosintético (PCF) incluyendo microorganismos fotosensibles seleccionados de cianobacterias, algas y bacterias fotosintéticas (página 6, líneas 11-14) y su uso para producir etanol. Esta no es la divulgación de un sistema de cultivo celular de dos células, sino más bien, de acuerdo con el mismo, enseña que es uno y el mismo sistema celular que es a la vez fotosintético y que produce etanol, es decir, las células fotosintéticas son modificadas genéticamente para producir etanol a partir de sus propios productos fotosintéticos. Por lo tanto, el documento CA 2 005 462 A1 no enseña ni sugiere en ningún caso el uso de un cultivo celular en suspensión de células vegetales fotosintéticas y mucho menos para producir azúcares para usar como nutrientes para apoyar el crecimiento del segundo cultivo de células

30 Roitsch y Sinka de 2002, Photosynthetica, 40, 481-492 describen las aplicaciones de cultivos en suspensión fotoautótrofos en botánica y describe que se han establecido un número limitado de cultivos fotoautótrofos que son capaces de crecer con CO₂ como única fuente de carbono. Sin embargo, se describe que, por alguna razón desconocida, parece ser difícil de establecer cultivos de células fotoautótrofas. No enseña ni sugiere que los cultivos en suspensión fotoautótrofos se puedan usar para producir azúcar para su uso por un segundo cultivo celular.

35 El presente inventor ha demostrado sorprendentemente que las células cultivadas a partir de la semilla de *Triticum vulgare* y también a partir de la soja tienen sorprendentemente un perfil de ácidos grasos y triglicéridos similar al de los compuestos que se encuentran en toda la planta o partes de la misma distintas de las células aisladas. El inventor ha producido un cultivo de células vegetales aisladas de *Triticum vulgare* y se ha producido una línea estable de células vegetales en cultivo.

40 Como las células vegetales se propagan en cuestión de unos pocos días es barato producir grandes cantidades de la célula cultivada mediante subcultivo. Por lo tanto, los cultivos de células vegetales de los cultivos de plantas que contienen aceites vegetales convencionales ofrecen una alternativa cómoda y económica a los cultivos de aceite vegetal de carácter agrícola convencionales. Además, la adición de inhibidores enzimáticos (es decir, enzimas que actúan como inhibidores, tales como lipasa o esterasa, como se discute más adelante) pueden prevenir, reducir o invertir la adición de glicerina a los ácidos grasos y así eliminar la necesidad de producción de los residuos durante la extracción de ácidos grasos.

Descripción de la invención

45 La presente invención se describirá ahora con más detalle. En los siguientes pasajes se definen adicionalmente con mayor detalle diferentes aspectos de la invención. Cada aspecto así definido se puede combinar con cualquier otro aspecto o diversos aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa se puede combinar con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

55 En el contexto de cualquiera de los siguientes aspectos de la invención, el término "planta" se pretende que excluya a las algas. Por lo tanto, cualquier referencia a una planta o célula de la planta debe ser interpretada para incluir el significado de que es un organismo o célula que no es un alga.

El presente inventor se ha dado cuenta de que sería conveniente y beneficioso aprovechar la capacidad de los cultivos en suspensión de células vegetales fotosintéticas de producir sus propios azúcares a partir de la luz, agua y dióxido de carbono (CO₂) mediante el procedimiento de la fotosíntesis, de tal manera que se produzcan azúcares para usar como una fuente de energía para el crecimiento de las células vegetales productoras de aceite y como un sustrato para la producción de ácidos grasos y/o aceites. De hecho, el inventor se ha dado cuenta de que sería posible aprovechar el procedimiento fotosintético, usar un cultivo en suspensión de células vegetales fotosintéticas para generar una fuente de azúcar para su uso por cualquier procedimiento que utiliza los azúcares, tales como cualquier cultivo de material biológico. Por otra parte, el inventor se ha dado cuenta de que esto permite la captura de CO₂ por el cultivo en suspensión de células vegetales fotosintéticas, tales como CO₂ que se libera como un subproducto de otros procedimientos, por lo que se puede usar para producir azúcares útiles y al mismo tiempo reducir el nivel de CO₂ que es liberado por procedimientos emisores de CO₂, tales como procedimientos para la generación de electricidad que usan combustibles a base de carbono o procedimientos microbiológicos (como por ejemplo, para la producción de bioetanol) que liberan CO₂.

En consecuencia, un primer aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de un producto biológico, comprendiendo el procedimiento

- (i) mantener un primer cultivo celular en suspensión de células vegetales no algales fotosintéticas en condiciones que incluyen el suministro de luz y dióxido de carbono que permite que las células cultivadas realicen la fotosíntesis y de ese modo generar y liberar los azúcares, normalmente monosacáridos y/o disacáridos (por ejemplo, glucosa, sacarosa, y /o fructosa), en el medio de cultivo circundante; y
- (ii) mantener segundo cultivo de células en presencia del azúcar generado por el primer cultivo celular en suspensión para permitir el crecimiento del segundo cultivo y la producción de un producto biológico.

El producto biológico pueden ser las células del segundo cultivo de células, por ejemplo, puede ser la biomasa. Alternativamente, el producto biológico puede ser sintetizado por las células del segundo cultivo de células. Los productos biológicos sintetizados por el segundo cultivo de células incluyen al menos un ácido graso y/o aceite, un producto proteico (incluidos los productos proteicos codificados por recombinación) y/o un metabolito, tal como etanol.

Las condiciones que permiten a las células del primer cultivo celular en suspensión realizar la fotosíntesis incluyen el suministro de luz, agua y dióxido de carbono. Preferentemente se proporciona luz del espectro completo. Preferentemente, el exceso de dióxido de carbono se proporciona, de tal modo, que, el nivel de dióxido de carbono no sea limitante de ninguna manera del procedimiento de fotosíntesis. El agua es proporcionada por el entorno acuoso de los medios de cultivo de células vegetales estándar.

En una realización del primer aspecto de la presente invención, las células del primer cultivo celular en suspensión y las células del segundo cultivo de células están en comunicación fluida entre sí. Así, por ejemplo, se pueden mezclar entre sí y cultivarse en el mismo medio y en el mismo recipiente. Alternativamente, las células del primer cultivo celular en suspensión y las células del segundo cultivo de células se pueden mantener en recipientes de cultivo separados, pero los recipientes de cultivo separados pueden estar conectados en comunicación fluida entre sí, de modo que los azúcares producidos por el primer cultivo celular en suspensión (fotosintéticas) pueden ser utilizados por las células del segundo cultivo de células. Esto puede conseguirse, por ejemplo, con un sistema de 2 tanques con un filtro entre los tanques para evitar la contaminación cruzada de las líneas celulares. En otras palabras, la comunicación fluida entre las células del primer cultivo celular en suspensión y las células del segundo cultivo de células puede permitir que el azúcar liberado por las células del primer cultivo celular en suspensión sea utilizado como una fuente de carbono por las células del segundo cultivo de células.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, las células del primer cultivo celular en suspensión y las células del segundo cultivo de células se cultivan cada una en recipientes de cultivo separados que no están en comunicación fluida entre sí. En ese caso, se recoge el azúcar liberado por las células del primer cultivo celular en suspensión y después se añade a las células del segundo cultivo de células para su uso como una fuente de carbono. Por lo tanto, el procedimiento del primer aspecto de la presente invención puede comprender la etapa de extraer el azúcar del medio de cultivo del primer cultivo celular en suspensión y la etapa adicional de añadir el azúcar extraído al segundo cultivo celular. El azúcar puede ser extraído del medio de cultivo del primer cultivo celular en suspensión por cualquier medio adecuado, tal como por diálisis, filtración molecular, cristalización y similares. El extracto puede ser el propio medio de cultivo que ha sido utilizado para el cultivo del primer cultivo celular en suspensión (y por lo tanto está enriquecido en azúcares de la actividad fotosintética de las células del primer cultivo celular en suspensión) del que se han separado las células del primer cultivo celular en suspensión (por ejemplo, por filtración), en el que los medios enriquecidos con azúcar extraídos se utilizan directamente como los medios para el segundo cultivo de células. Después de producido el agotamiento de los azúcares de los medios enriquecidos en azúcar extraídos, como consecuencia del crecimiento de las células del segundo cultivo de células en los mismos, las células del segundo cultivo de células se pueden separar de los medios empobrecidos en azúcar (por ejemplo, por filtración) y los medios empobrecidos de azúcar sin células producidos de este modo se pueden devolver para su uso como el medio de cultivo del primer cultivo celular en suspensión por lo que puede ser regenerado (es decir, enriquecido con los azúcares de la actividad fotosintética de las células del primer cultivo celular en suspensión) de nuevo.

El azúcar puede ser extraído del medio de cultivo del primer cultivo celular en suspensión mediante la eliminación continua de azúcar del medio de cultivo celular del primer cultivo celular. En otras palabras, el azúcar puede ser separado del medio de cultivo celular del primer cultivo celular sin ninguna, o ninguna alteración considerable del crecimiento del primer cultivo de células, lo cual puede determinarse, por ejemplo, mediante el control del nivel de la actividad fotosintética como se indicado por el consumo de CO₂ y/o la producción de azúcar, en el que el nivel de la actividad fotosintética durante la recogida del azúcar no debe caer por debajo de menos del 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o sustancialmente 100 % del nivel observado antes de la recogida de azúcar. Las técnicas adecuadas que permiten la retirada continua de azúcar son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la diálisis del medio de cultivo.

En una realización del primer aspecto de la presente invención, el segundo cultivo de células se mantiene en la presencia del azúcar generado por el primer cultivo celular en suspensión a una concentración de azúcar en el intervalo de 0,01 M a 1,5 M, preferentemente a la concentración de aproximadamente 50 g /l.

Las células se pueden cultivar en el segundo cultivo de células del primer aspecto de la presente invención. Generalmente, las células pueden ser procariotas o eucariotas, tales como bacterianas, fúngicas, vegetales, animales o humanas. Se puede preferir que el segundo cultivo celular sea un cultivo celular en suspensión de células vegetales productoras de aceite, tales como un cultivo que se describe a continuación en relación con una realización particularmente preferida del primer aspecto de la invención. Alternativamente, el primer aspecto de la presente invención se puede usar independientemente de la realización particularmente preferida. Así, por ejemplo, el segundo cultivo celular puede ser un cultivo de microorganismos, tales como bacterias u hongos, incluyendo levaduras. Ejemplos de levaduras incluyen especies de *Saccharomyces*. En una realización, el segundo cultivo celular puede ser un cultivo celular para la producción de etanol u otro biocombustible equivalente (por ejemplo, otro alcohol) y, por lo tanto, las células en el cultivo celular pueden ser un microorganismo, tal como levadura, que puede convertir el azúcar en el etanol o en otro biocombustible equivalente. Por lo tanto, las células del segundo cultivo de células pueden ser microorganismos, tales como levaduras (por ejemplo, una especie de *Saccharomyces*) y el producto biológico puede ser un alcohol, tal como etanol.

Por lo general, estos cultivos pueden, ellos mismos, producir CO₂ como un producto de desecho, en cuyo caso el CO₂ producido por el segundo cultivo celular puede estar disponible como fuente de CO₂ única o complementaria para el primer cultivo celular en suspensión de células vegetales fotosintéticas. Este circuito de liberación y captura de CO₂ puede ayudar a hacer que este tipo de procedimientos sea más neutral en cuanto al carbono (es decir, la reducción de emisión global de CO₂).

En una realización preferida, el segundo cultivo de células es un cultivo celular en suspensión de células vegetales productoras de aceite (tal como una célula vegetal diferenciada, por ejemplo una célula vegetal diferenciada que está especializada en la producción y el almacenamiento de aceites, tales como una célula del mesodermo) y así, el procedimiento del primer aspecto de la invención puede ser un procedimiento para la producción de al menos un ácido graso y/o aceite a partir de un cultivo de células vegetales, comprendiendo el procedimiento el mantenimiento de un segundo cultivo celular en suspensión de células vegetales productoras de aceite en la presencia del azúcar generado por el primer cultivo celular en suspensión y en condiciones tales que las células vegetales productoras de aceite cultivadas producen al menos un ácido graso y/o aceite. En una realización particularmente preferida, el segundo cultivo de células es como se describe a continuación.

El segundo cultivo celular puede comprender células de las plantas cultivadas, por ejemplo, del género *Triticum* (u otra planta oleaginosa), caracterizado por su capacidad para producir ácidos grasos libres y lípidos o aceites vegetales.

Las células del segundo cultivo de células se pueden caracterizar por que producen al menos un ácido graso o compuesto oleaginoso que puede ser utilizado como un combustible (o biocombustible) o modificado químicamente con el fin de ser utilizado como un combustible (o biocombustible). El término produce se utiliza para describir las células vegetales que hacen que un compuesto pueda ser retenido dentro de la célula, por ejemplo, en la vacuola o en un órgano de almacenamiento, o que pueda ser secretado.

Las células vegetales del segundo cultivo de células pueden haber sido aisladas de su medio ambiente natural. En la técnica se conocen diversas técnicas para el aislamiento de las células. Por ejemplo, las células del segundo cultivo de células se pueden aislar cortando un pequeño trozo de tejido de la planta. Una persona experta apreciará que de acuerdo con la invención, se puede usar cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica y el experto en la materia entenderá que la invención puede llevarse a cabo utilizando células aisladas de diferentes partes de una o más plantas. Por ejemplo, las células se pueden aislar a partir del mesodermo como se ilustra en el Ejemplo 1.

El experto en la materia también entenderá que el número total de células aisladas puede variar. En principio, debe haber por lo menos una célula, la cual se puede dividir y multiplicar. Sin embargo, partir de una sola célula requiere un aislamiento preciso de una sola célula y, por lo tanto, se requiere mucho tiempo. En consecuencia, el número total de células puede variar.

Se utilizan las expresiones "células en cultivo" o "células cultivadas" en la presente memoria para referirse al cultivo

de tejidos de células vegetales. El cultivo de tejidos se refiere a procedimientos en los que las células vegetales que proceden de cualquier parte de la planta se cultivan en forma aislada de las plantas intactas en medios nutritivos en condiciones controladas y estériles. Los medios nutritivos comúnmente usados en la técnica comprenden hidratos de carbono como fuente de energía, sales, vitaminas, aminoácidos, minerales, hormonas de crecimiento vegetales y otros compuestos. Los medios pueden comprender también compuestos antibacterianos y fungicidas para evitar la contaminación por bacterias y/u hongos.

El experto en la materia conoce los diferentes procedimientos que existen en la técnica y dicho experto apreciará que las células de acuerdo con la invención pueden cultivarse de acuerdo con cualquiera de estos procedimientos. Tales procedimientos incluyen, por ejemplo, cultivo de tejidos utilizando placas de Petri y medio de agar sólido. Otro procedimiento de cultivo bien conocido es el cultivo en suspensión en el que las células se suspenden en un líquido y se almacenan en frascos. Además, las células vegetales también pueden ser cultivadas usando cultivos de células vegetales adherentes en el que las células se inmovilizan en geles, espumas o membranas.

Las células también se caracterizan por que se mantienen y se propagan en cultivo. Los cultivos en suspensión de células vegetales pueden ser preferidos.

Las células vegetales cultivadas particularmente preferidas para el segundo cultivo de células de acuerdo con el primer aspecto de la invención pueden obtenerse mediante el aislamiento de las células de una planta entera o partes de una planta y manteniendo las células en un medio de cultivo. Como se ha descrito anteriormente, los procedimientos para el aislamiento y cultivo de células vegetales son bien conocidos en la técnica.

El experto apreciará que las células de plantas cultivadas pueden secretar compuestos en el medio circundante. Las células cultivadas del segundo cultivo celular particularmente preferido secretan al menos un compuesto que es un ácido graso y/o aceite en el medio de cultivo. Si las células secretan el compuesto en el medio circundante, entonces es posible extraer el ácido graso y/o la fracción de aceite a partir del medio a usar en la fabricación de biocombustible.

Como se explicó anteriormente, una forma de cultivo de tejidos de células vegetales es por cultivo en suspensión. En un cultivo en suspensión, se cultivan pequeños grupos de células en un matraz en suspensión en un medio de cultivo. El cultivo o los medios nutritivos comprenden generalmente hidratos de carbono como fuente de energía, sales, vitaminas, aminoácidos, minerales, hormonas de crecimiento vegetales y otros compuestos. Los frascos o recipientes que contienen las células y los medios de cultivo se colocan generalmente en un agitador, o contienen un mecanismo de agitación, para evitar que las células sedimenten en el fondo del matraz o recipiente. Los cultivos en suspensión se subcultivan generalmente a intervalos especificados, por ejemplo aproximadamente cada uno, dos, tres, cuatro o cinco semanas (en este contexto "aproximadamente" se refiere a ± 4 , 3, 2 o 1 día), para proporcionar medios de cultivo frescos y para mantener las células en un estado diferenciado o indiferenciado.

De acuerdo con una realización, los medios en los que se suspenden las células y en los que se secreta al menos un compuesto que comprende ácido graso y/o aceite se pueden recoger. El líquido resultante puede fraccionarse para separar el compuesto. Alternativamente, los medios pueden proporcionar condiciones que tienen como resultado la separación pasiva de ácido graso y/o el aceite secretado de los medios, para formar una capa discreta que puede ser recogida.

Por consiguiente, en una realización particularmente preferida del primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de al menos un ácido graso y/o aceite a partir de un cultivo celular en suspensión de células vegetales, comprendiendo el procedimiento:

- (i) mantener el segundo cultivo de células en presencia del azúcar generado por el primer cultivo celular en suspensión, en el que el segundo cultivo celular en suspensión es un cultivo celular en suspensión de células vegetales productoras de aceite mantenidas en unas condiciones tales que las células cultivadas sintetizan y secretan al menos un ácido graso y/o aceite en el medio del cultivo celular en suspensión y
- (ii) extraer el al menos un ácido graso y/o aceite así secretado del medio del cultivo celular en suspensión.

Los medios de suspensión de células vegetales de la técnica emplean generalmente un pH cercano al neutro (es decir, aproximadamente pH 7) cuando se diluyen a una concentración operativa de sus componentes. El presente inventor se ha dado cuenta de que tales condiciones de pH de cultivo "estándar" pueden no ser óptimas para la liberación de ácidos grasos y/o aceites para el cultivo en suspensión de células vegetales que forma el segundo cultivo de células.

El cultivo en suspensión de células vegetales que forma el segundo cultivo de células puede mantenerse a un pH adecuado para provocar que los ácidos grasos y/o aceites almacenados en la vacuola de las células vegetales cultivadas sean liberados a través del citosol de las células vegetales en el medio del cultivo celular en suspensión. Por lo tanto, el cultivo en suspensión de células vegetales se puede mantener a un pH que es generalmente menor que aproximadamente pH 7,0, 6,5, 6,0, o más preferentemente 5,5, tal como alrededor de, o mayor que, pH 3,0 a aproximadamente 6,5, preferentemente de aproximadamente, o mayor que, pH 3,5 a aproximadamente 5,5, más preferentemente un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,0 o 5,5. En este contexto, el término "aproximadamente" se puede referir a $\pm 0,5$, 0,4, 0,3, 0,2, o 0,1 unidades de pH. Los cultivos de células vegetales generalmente se convierten en no viables por debajo de un pH de aproximadamente 3,0, aunque el límite exacto de

esto puede variar entre los diferentes cultivos en suspensión de células vegetales dependiendo, por ejemplo, de la especie de planta o tipo de célula de la que se deriva el cultivo de células y se puede determinar mediante ensayos de rutina cultivo por cultivo. En la práctica, el cultivo en suspensión de células vegetales debe mantenerse a un pH por encima del límite de pH más bajo en el que el cultivo de células en cuestión se convierte en no viable. En cualquier caso, la mayoría, si no todos, los cultivos en suspensión de células vegetales debe ser viable y productivo en el intervalo de pH más preferido de aproximadamente pH 4,5 a aproximadamente 5,5.

Por lo tanto, el medio del cultivo celular en suspensión del cultivo en suspensión de células vegetales que puede formar el segundo cultivo de células puede comprender un tampón que mantiene el medio del cultivo celular en suspensión alrededor del pH seleccionado. Cualquier tampón adecuado se puede usar. Por ejemplo, el tampón puede seleccionarse del grupo que consiste en ácido cítrico y ortofosfato hidrógeno disódico, o cualquier otro tampón no tóxico que no contiene metales pesados y/o que es adecuado para su uso en la agricultura o la producción de alimentos.

La fuerza iónica del medio del cultivo celular en suspensión de la suspensión de células vegetales que puede formar el segundo cultivo de células puede estar, por ejemplo, entre 0,001 M y 0,1 M, preferentemente entre 0,005 y 0,05 M. En una realización, es preferible controlar la fuerza iónica del medio del cultivo celular en suspensión mediante la concentración de azúcares, en lugar de la concentración de sales, debido a que esto permite mayores concentraciones de azúcar, que también pueden ser utilizadas como una fuente de carbono por las células en el cultivo. Generalmente, el azúcar o azúcares utilizados para controlar la fuerza iónica son monosacáridos o disacáridos, tales como uno o más de glucosa, sacarosa y/o fructosa. La concentración combinada de azúcares en el medio de cultivo puede ser de aproximadamente 30-70 g/l, 40-60 g/l o 50-60 g/l. Aproximadamente 50 g/l puede ser óptima. En este contexto, el término "aproximadamente" se refiere a ± 5 , 4, 3, 2, 1 o 0,5 g/l.

La conductividad del medio del cultivo celular en suspensión del cultivo en suspensión de células vegetales que puede formar el segundo cultivo de células se puede mantener a una temperatura constante (por ejemplo, mediante la limitación de las fluctuaciones en la conductividad a no más de ± 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o sustancialmente 0 %). La conductividad óptima que variará en función de la especie de planta que se usa en el cultivo, puede ser determinada por experimentación de rutina por el experto en la materia. La conductividad se monitoriza y/o controla mediante medios bien conocidos en la técnica.

En una realización preferida, la viabilidad del cultivo celular en suspensión de células vegetales que puede formar el segundo cultivo de células se mantiene durante la etapa de extraer el al menos un ácido graso y/o aceite así secretado del medio del cultivo celular en suspensión. En otras palabras, la etapa de extraer el al menos un ácido graso y/o aceite producido de este modo no requiere ninguna, o ninguna alteración considerable, del crecimiento del cultivo en suspensión de células vegetales, lo cual puede determinarse, por ejemplo, monitorizando el nivel de actividad respiratoria como se indica por el consumo de O_2 y/o la producción de ácido graso y/o aceite, en el que el nivel de actividad respiratoria, y/o producción de ácido graso y/o aceite durante la etapa de extraer el al menos un ácido graso y/o aceite así secretado del medio del cultivo celular en suspensión no debería bajar por debajo de menos de 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o sustancialmente el 100 % del nivel observado cuando no se está realizando la etapa de extracción. Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento que permite la cosecha continua de al menos un ácido graso y/o aceite del medio del cultivo celular en suspensión. Esto se puede lograr mediante al menos dos enfoques.

En una primera aproximación a la cosecha continua, el pH al que se mantiene el medio del cultivo celular en suspensión del cultivo en suspensión de células vegetales que puede formar el segundo cultivo de células se selecciona para promover la secreción de ácidos grasos y/o aceites de las células cultivadas en el medio del cultivo celular y además para promover la liberación de los ácidos grasos y/o aceites secretados y/o aceites de una emulsión en el medio del cultivo celular en suspensión, tales como un pH ácido de aproximadamente, o superior a, 4,5, tal como hasta aproximadamente pH 5,0, 5,5, 6,0 o 6,5. Sin adherirse a una teoría, el presente inventor cree que, a este pH del cultivo, el citoplasma de las células de las plantas vegetales cultivadas se acidifica ligeramente, lo que conduce a la liberación de ácidos grasos y/o aceites de los sitios de almacenamiento intracelular (tales como la vacuola) al citoplasma como una micro-emulsión, seguido de la secreción/liberación de los ácidos grasos y/o aceites en el medio del cultivo celular, después de lo cual el pH del cultivo elegido (junto con otros parámetros, incluyendo la fuerza iónica, la temperatura y la presión) causan la ruptura de la emulsión (si el pH del cultivo es menor de aproximadamente 4,5, entonces la emulsión se puede mantener dentro del medio del cultivo celular, para ello, ver el segundo enfoque, más abajo). Como consecuencia de la ruptura de la emulsión dentro del medio del cultivo celular, el al menos un ácido graso y/o aceite no emulsionado ya no es miscible con el medio del cultivo celular acuoso y, por lo tanto, se acumula en una capa discreta en la superficie del medio del cultivo celular. Por lo tanto, la secreción de el al menos un ácido graso y/o aceite de las células cultivadas en el medio del cultivo celular en suspensión circundante puede tener como resultado la formación de un sistema bifásico en el que el al menos un ácido graso y/o aceite se acumula en una capa separada del medio del cultivo celular en suspensión. En un sistema bifásico de este tipo, la etapa de extraer el al menos un ácido graso y/o aceite así secretado del medio del cultivo celular en suspensión puede comprender la extracción directa de al menos un ácido graso y/o aceite de la capa que se forma dentro de el sistema bifásico. Puede ser preferible no eliminar por completo de la capa, de modo que también puede seguir actuando como una barrera al movimiento de patógenos entre la atmósfera y el medio del cultivo celular en suspensión.

En un segundo enfoque de cosecha continua, el pH al que se mantiene el medio del cultivo celular en suspensión del cultivo en suspensión de células vegetales que puede formar el segundo cultivo de células está dentro del intervalo de aproximadamente, o superior a, 3,0 a aproximadamente 4,5, preferentemente un pH dentro del intervalo de aproximadamente, o superior a, 3,5 a aproximadamente 4,5 y este se selecciona para mantener los ácidos grasos y/o aceites así secretados en una emulsión en el medio del cultivo celular en suspensión. En este enfoque, es necesario recoger y procesar una parte, o la totalidad de, la suspensión del medio del cultivo celular en suspensión para extraer el al menos un ácido graso y/o aceite. Generalmente, esto se hace por separación física de una parte o la totalidad del medio del cultivo celular en suspensión de las células cultivadas (opcionalmente, hecho secuencialmente o simultáneamente con la adición de medio de cultivo fresco de reemplazo) antes del procesamiento, tales como por filtración, diálisis, filtración molecular, centrifugación o Vortex. Después de procesar el medio del cultivo celular en suspensión para extraer el al menos un ácido graso y/o aceite, el medio del cultivo celular en suspensión así procesado puede ser devuelto al recipiente de cultivo para apoyar el crecimiento continuado de las células cultivadas. Generalmente, la etapa de procesar el medio del cultivo celular en suspensión para extraer el al menos un ácido graso y/o aceite consiste en someter el medio del cultivo celular en suspensión a un paso que rompe la emulsión y, por lo tanto, permite la generación de un sistema bifásico, del tipo se ha descrito anteriormente, en el que el al menos un ácido graso y/o aceite se acumula en una capa discreta separada del medio del celular en suspensión de células que, por lo tanto, se puede recoger. Por lo tanto, cuando el al menos un ácido graso y/o aceite así secretado esté presente en el medio del cultivo celular en suspensión como una emulsión, este puede extraerse del medio del cultivo celular en suspensión mediante el procesamiento de la totalidad, o parte, del medio del cultivo celular en suspensión para romper la emulsión, opcionalmente después de la separación del medio del cultivo celular en suspensión de las células cultivadas. La emulsión puede ser rota por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, puede implicar el paso de procesar la totalidad, o parte, del medio del cultivo celular en suspensión:

- (a) mediante la modificación de al menos una condición del medio del cultivo celular en suspensión seleccionada entre el pH, fuerza iónica, temperatura o presión de manera que el al menos un ácido graso y/o aceite presente en el mismo se libera de una emulsión; los aumentos en la temperatura y/o reducción de la presión pueden ser preferibles, ya que los medios tratados se pueden transformar en la manera más conveniente (por ejemplo, por enfriamiento posterior y/o permitiendo el retorno a la presión original) para un retorno al cultivo celular en crecimiento. Cuando se modifica el pH y/o la fuerza iónica para romper la emulsión, generalmente se modificará posteriormente la misma condición(es) antes de devolver el medio para el cultivo celular en crecimiento para hacer que sea adecuado para el mantenimiento de las condiciones de cultivo y/o
- (b) tratando físicamente (mecánicamente) el medio del cultivo celular en suspensión, tal como por centrifugación, de modo que se libera en el mismo al menos un ácido graso y/o aceite presente.

Alternativamente, la emulsión de al menos un ácido graso y/o aceite se puede extraer del medio del cultivo celular en suspensión mediante extracción con disolvente.

En una variante de las realizaciones descritas más arriba, las células vegetales cultivadas del segundo cultivo de células pueden ser tratadas tras el cultivo para eliminar el ácido graso y/o aceite. En una realización, las células se lisan y, a continuación, se realiza la extracción con disolvente para eliminar el ácido graso y/o aceite. En otra realización, las células se prensan para eliminar el ácido graso y/o aceite. En otra realización adicional, las células se homogeneizan. La homogeneización se puede usar antes de lavar el ácido graso y/o aceite de las células usando agua u otro disolvente preferido.

En esta realización variante, en la cual las células del segundo cultivo se tratan para eliminar el ácido graso y/o aceite, tal como mediante procedimientos que implican la lisis celular, prensado u homogeneización, entonces el procedimiento es un procedimiento que provoca la alteración del crecimiento del cultivo en suspensión de células vegetales y, por lo tanto, es un procedimiento para la cosecha no continua de al menos un ácido graso y/o aceite del medio del cultivo celular en suspensión.

En una realización preferida el disolvente orgánico comprende un alcohol. Preferentemente, el alcohol es un alcohol C₁ a C₄. Preferentemente, el alcohol es un alcohol lineal o de alquilo. El alcohol puede ser preferentemente metanol, etanol o propanol.

En otra realización, el disolvente orgánico polar comprende un haloalcano. Preferentemente, el haloalcano es un haloalcano C₁ a C₄. También preferentemente, el haloalcano comprende cloro. El cloro puede estar presente como C₁ a C₄. Por ejemplo, el haloalcano puede ser triclorometano (cloroformo), clorometano o diclorometano.

Otro disolvente orgánico polar que puede ser utilizado es un alcano carbonilo. Preferentemente, el alcano carbonilo comprende C₁ a C₄. En una realización preferida, el alcano carbonilo es acetona.

También es posible usar combinaciones de los disolventes orgánicos polares descritos anteriormente. Por ejemplo, el disolvente puede comprender un alcohol y un haloalcano, un alcohol y un alcano carbonilo o un alcano carbonilo y un haloalcano. En una realización preferida, el disolvente comprende una mezcla de metanol y cloroformo. En otra realización preferida, la mezcla de metanol y cloroformo contiene ambos compuestos a partes iguales.

En una realización preferida el procedimiento anteriormente mencionado de cosecha no continua puede incluir una

etapa en la que las células vegetales del segundo cultivo celular se pueden secar en un horno o por otros procedimientos de eliminación de agua conocidos por los expertos en la técnica.

La célula vegetal productora de aceite en el cultivo en suspensión de células vegetales que puede formar el segundo cultivo de células de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención puede ser una célula vegetal diferenciada, tal como una célula que está especializada en la producción y el almacenamiento de aceites, por ejemplo, una célula de mesodermo. La célula vegetal productora de aceite, puede, aunque por regla general no, ser capaz de realizar la fotosíntesis a un nivel que elimina la necesidad de que el medio de cultivo en el que se cultiva sea complementado por azúcares, tales como glucosa, sacarosa y/o fructosa.

La célula vegetal productora de aceite en el cultivo en suspensión de células vegetales que puede formar el segundo cultivo de células de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención puede ser de una planta productora de aceite, tal como una planta seleccionada del grupo que consiste de *Triticum*, *Brassica*, *Zea*, *Rhus*, *Olea* y *Glycine*.

El inventor ha demostrado sorprendentemente que las células aisladas de una planta del género *Triticum* y propagadas en cultivo de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica producen un perfil muy similar de compuestos ácidos grasos y aceite en comparación con el perfil de compuestos ácidos grasos y aceite que se encuentran en la planta *Triticum* entera. En consecuencia, el inventor es el primero en demostrar que los aceites vegetales pueden ser producidos a partir de cultivo de tejidos vegetales.

Este es un resultado inesperado y sorprendente, ya que es bien conocido en la técnica que las células vegetales que se mantienen en cultivo producen cantidades de metabolitos diferentes a las de las células *in vivo*. En algunos casos, los metabolitos presentes en la planta intacta están ausentes en células cultivadas (Delle Monache, 1995, *Photochemistry*, 39, 575-580). Para verificar que las células producen ácidos grasos y/o aceites, estas fracciones se pueden identificar usando técnicas químicas convencionales. Una persona experta en la técnica apreciará que tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, procedimientos cromatográficos y de resonancia magnética nuclear. Por lo tanto, la persona experta en la técnica será capaz de identificar la presencia de compuestos ácidos grasos y/o aceite en las células cultivadas de la invención usando procedimientos de rutina y los conocimientos disponibles en la técnica.

De acuerdo con una realización preferida del primer aspecto de la invención, las células vegetales utilizadas en el segundo cultivo de células son del género *Triticum*. En otra realización preferida, las células son del género *Zea*. En otra realización preferida, las células son del género *Rhus*. En otra realización preferida, las células son del género *Olea*. En otra realización preferida, las células son del género *Brassica*. En otra realización preferida, las células son del género *Glycine*. En otra realización preferida, las células son del género de cualquier otra planta adecuada productora de aceite.

La célula de la planta productora de aceite que puede ser utilizada en el segundo cultivo de células de la invención puede, o no, ser modificada genéticamente, tal como para incorporar una o más modificaciones genéticas (por ejemplo, transgenes) que aumenten el nivel de, o modifiquen el tipo de ácido graso y/o aceite que se produce. Como se verá más adelante, esto puede incluir una modificación genética para aumentar los niveles endógenos de, o codificar, enzimas lipasa o esterasa no nativas (que pueden o no pueden presentar una secuencia líder de secreción) para prevenir, reducir o revertir la gliceración de ácidos grasos y de ese modo aumentar el nivel de producción de ácido graso libre con una reducción concomitante en la producción de aceites.

Como se discutió anteriormente, el medio del cultivo en suspensión de células vegetales que se puede usar en el segundo cultivo de células de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención (y/o cualesquiera otros cultivos de células vegetales descritos en esta solicitud) puede comprender uno o más compuestos antibacterianos y/o fungicidas para prevenir la contaminación por bacterias y/u hongos. Puede usarse cualquier compuesto antibacteriano y/o fungicida conocidos en la técnica, siempre que no impiden sustancialmente el crecimiento del cultivo en suspensión de células vegetales. En una realización, uno o más de los compuestos antibacterianos y/o fungicidas es una resina vegetal, tal como una resina (por ejemplo, un extracto de la raíz o látex) obtenidos a partir de plantas, tales como los grupos de género *Piper* (por ejemplo, *Piper methysticum*) y *Populus* (por ejemplo, *Populus candicans*). Compuestos antibacterianos y/o fungicidas ilustrativos se describen en Whitton et al, 2003, *Phytochemistry*, 64, 673-679 y en el documento WO 2005/072529, cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria por referencia.

El al menos un ácido graso y/o aceite que es producido y/o extraído pueden procesarse adicionalmente para convertirlo en un biocombustible, o se purifica además opcionalmente y/o se utilizan en un procedimiento posterior, tales como mediante la incorporación en un producto alimenticio, cosméticos, lubricantes o cualquier otro producto que comprenda ácidos grasos, aceites vegetales o compuestos derivados de los mismos. Los procedimientos adecuados para la purificación y el procesamiento de los ácidos grasos y aceites son conocidos por el experto. Por ejemplo, numerosos procedimientos para la conversión de aceite vegetal en biocombustibles, tales como los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) son bien conocidos en la técnica y se pueden emplear para convertir los ácidos grasos o aceites resultantes obtenidos por el procedimiento del primer aspecto de la presente invención. En particular, como se discute más adelante, la presente solicitud también describe la producción de biocombustibles a partir de ácidos grasos y monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos y estos se pueden usar para convertir los ácidos

grasos o aceites obtenidos por el procedimiento del primer aspecto de la presente invención en biocombustible.

Un ácido graso o aceite extraído y/o purificado obtenible de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención puede estar sustancialmente compuesto al menos por el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 %, 99,9 % o sustancialmente el 100 % (en peso) de ácidos grasos y/o aceites. Los procedimientos para la evaluación del porcentaje de composición en peso de los ácidos grasos y/o aceites son conocidos en la técnica, por ejemplo, cromatografía de gases o electroforesis.

La presente solicitud también describe el uso del cultivo celular en suspensión de células vegetales productoras de aceite, como se ha definido anteriormente, para producir al menos un ácido graso y/o aceite, en el que el al menos un ácido graso y/o aceite se secreta en el medio del cultivo celular en suspensión y preferentemente en el que la secreción tiene como resultado la producción de un sistema bifásico en el que el al menos un ácido graso y/o aceite secretado se acumula en una capa separada del medio del cultivo celular en suspensión, como se describió anteriormente.

La presente solicitud también describe un medio del cultivo en suspensión de células vegetales tamponado que tiene un pH ácido de menos de aproximadamente un pH de 7,0, 6,5, 6,0 o 5,5, tal como aproximadamente, o mayor que, pH 3,0 a aproximadamente 6,5, preferentemente aproximadamente, o mayor que, pH 3,5 a aproximadamente 5,5, más preferentemente un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,5, que es adecuado para cultivar un cultivo en suspensión de células vegetales por un procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención. El medio también puede comprender compuestos antibacterianos y fungicidas para evitar la contaminación por bacterias y/u hongos. El medio también puede comprender inhibidores químicos o enzimáticos (tales como lipasa o esterasa, como se discute más abajo) que pueden prevenir, reducir o invertir la adición de glicerina a los ácidos grasos y así eliminar la necesidad de producir residuos durante la extracción de ácidos grasos. El medio puede comprender otros componentes que son estándar en medios de cultivo de células vegetales y, puede contener, por ejemplo, el medio de Murashige y Skoog ampliamente disponibles. Los medios del cultivo en suspensión de células vegetales comúnmente utilizados en la técnica comprenden hidratos de carbono como fuente de energía, sales, vitaminas, aminoácidos, minerales, hormonas de crecimiento vegetales y otros compuestos, y cualquiera o todos de estos componentes también pueden estar presentes en el medio del cultivo en suspensión de células vegetales tamponado de la presente invención. La fuerza iónica del medio del cultivo celular en suspensión puede estar, por ejemplo, entre 0,001 M y 0,1 M, preferentemente entre 0,005 y 0,05 M. En una realización, es preferible controlar la fuerza iónica del medio mediante la concentración de azúcares, en lugar de la concentración de sales, debido a que esto permite mayores concentraciones de azúcar, el cual también puede ser utilizado como una fuente de carbono por las células del cultivo. Generalmente, el azúcar o azúcares utilizados para controlar la fuerza iónica son monosacáridos o disacáridos, tales como uno o más de glucosa, sacarosa y/o fructosa. La concentración combinada de azúcares en el medio de cultivo puede ser de aproximadamente 30-70 g/l, 40-60 g/l o 50-60 g/l. Aproximadamente, 50 g/l puede ser óptimo. En este contexto, el término "aproximadamente" se refiere a ± 5 , 4, 3, 2, 1 o 0,5 g/l. Por consiguiente, el nivel de sales (tales como sales seleccionados de una o más, tales como todas, de nitrato de amonio, ácido bórico, cloruro de calcio anhidro, cloruro de cobalto $6H_2O$, sulfato cúprico $\cdot 5H_2O$, Na_2 -EDTA, sulfato ferroso $\cdot 7H_2O$, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso $\cdot H_2O$, ácido molibídico (sal de sodio) $\cdot 2H_2O$, yoduro de potasio, nitrato de potasio, fosfato monobásico de potasio, sulfato de zinc $\cdot 7H_2O$) puede mantenerse a niveles bajos o típicos, tales como en o por debajo de aproximadamente 4,4 g/l en total, a pesar de conseguir una fuerza iónica relativamente alta en el medio (en este contexto, el término "aproximadamente" se utiliza para referirse a los valores que son ± 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 2 % o 1 % del valor base). El medio del cultivo celular en suspensión de células vegetales tamponado puede comprender además uno o más compuestos antibacterianos y/o fungicidas, como se discutió anteriormente.

El medio del cultivo celular en suspensión de células vegetales tamponado como se describe en la presente memoria se puede usar para mantener un cultivo celular en suspensión de células vegetales productoras de aceite como se definen anteriormente, de tal manera que las células sintetizan y secretan al menos un ácido graso y/o aceite en el medio del cultivo celular en suspensión.

La presente solicitud también describe un extracto de al menos un ácido graso y/o aceite obtenible por el procedimiento del primer aspecto de la invención, o un producto que comprende el extracto, tal como un producto alimenticio, cosmético, o lubricante.

La presente solicitud también describe un producto que resulta de la transformación de un extracto de al menos un ácido graso y/o aceite obtenible por el procedimiento del primer aspecto de la invención. Un producto particularmente preferido es un biocombustible, tal como FAME, producido por el procesamiento de al menos un ácido graso y/o aceite obtenible por el procedimiento descrito anteriormente. Un biocombustible producido a partir de al menos un ácido graso y/o aceite obtenible por el procedimiento de la realización particularmente preferida del primer aspecto de la invención generalmente tiene una distribución muy uniforme de longitudes de cadena de ácidos grasos que no se observa en los biocombustibles producidos a partir del aceite vegetal obtenido de plantas enteras. Sin adherirse a una teoría, el presente inventor cree que esto es debido a las condiciones altamente uniformes experimentadas por las células productoras de aceite dentro del cultivo celular en suspensión del primer aspecto de la presente invención, en comparación con las condiciones ambientales más variables experimentadas por plantas enteras, tales como plantas enteras cultivadas en campos. Por lo tanto, mientras que los biocombustibles convencionales, tales como FAME,

derivados de aceite vegetal producido convencionalmente pueden contener una distribución variable de longitudes de cadena de ácidos grasos, tal como aproximadamente el 5 % o más fuera de dos desviaciones estándar de la longitud de cadena de ácido graso predominante, el biocombustible producido por el procedimiento del primer aspecto de la presente invención pueden tener una distribución de longitudes de cadena de ácidos grasos en la que no más de aproximadamente el 5 %, tal como no más de aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 0,5 % o sustancialmente el 0 % están fuera de dos desviaciones estándar de la longitud de cadena de ácido graso predominante. En este contexto, el término "aproximadamente" indica $\pm 0,5, 0,4, 0,3, 0,2$ o $0,1$ %.

La distribución de longitudes de cadena de ácidos grasos en un biocombustible se puede evaluar por técnicas bien conocidas en la técnica, incluyendo técnicas que se describen a continuación en los ejemplos. Un experto en la técnica apreciará que tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, procedimientos cromatográficos y resonancia magnética nuclear. Por lo tanto, la persona experta en la técnica será capaz de identificar la presencia y la distribución de los compuestos ácidos grasos y/o aceite en biocombustibles de la invención usando procedimientos de rutina y los conocimientos disponibles en la técnica.

En el procedimiento anterior de la realización particularmente preferida del primer aspecto de la presente invención, la célula de la planta productora de aceite que está presente en el cultivo en suspensión de células vegetales, tal como una célula que está especializada en la producción y el almacenamiento de aceites, por ejemplo, una célula de mesodermo, puede poseer una capacidad fotosintética baja, o incluso inexistente. Por lo tanto, requiere el suministro de hidratos de carbono (por ejemplo, como se discutió anteriormente, azúcares, incluyendo glucosa, sacarosa y/o fructosa) para actuar como una fuente de energía y sustrato para la síntesis de ácidos grasos y/o aceites, de acuerdo con el procedimiento del primer aspecto de la invención.

El procedimiento del primer aspecto de la invención puede comprender la etapa de extraer el producto biológico del segundo cultivo de células. La naturaleza de la etapa de extracción dependerá de la naturaleza del producto biológico y puede ser determinada fácilmente por el experto en la materia. Cuando el producto biológico producido por el segundo cultivo de células es al menos un ácido graso y/o aceite producido por un cultivo de células vegetales, entonces puede ser extraído del segundo cultivo de células mediante cualquier técnica adecuada, tal como cualquiera de los procedimientos continuos o no continuos descritos anteriormente.

El procedimiento del primer aspecto de la invención también puede comprender la etapa adicional de purificación y/o procesamiento (incluida la modificación química) del producto biológico así extraído. La naturaleza de las etapas de purificación y/o procesamiento dependerá de la naturaleza del producto biológico y puede ser determinada fácilmente por el experto en la materia.

Cuando el producto biológico producido por el segundo cultivo de células es al menos un ácido graso y/o aceite producido por un cultivo de células vegetales, entonces el al menos un ácido graso y/o aceite que se extrae puede ser procesado adicionalmente para convertirlo en un biocombustible (tal como FAME) o es opcionalmente y adicionalmente purificado y/o utilizado en un procedimiento posterior, tal como mediante la incorporación en un producto alimenticio, cosmético, o lubricante.

En una realización, las células vegetales fotosintéticas presentes en el primer cultivo celular en suspensión del procedimiento del primer aspecto de la invención pueden, o no pueden, ser células vegetales fotosintéticas diferenciadas. La célula vegetal diferenciada puede ser una célula que está especializada para la fotosíntesis, tal como una célula de la hoja o tejido verde de una planta, incluyendo células en empalizada, del mesodermo foliar o del peciolo. Las células en empalizada pueden ser particularmente preferidas.

Las células vegetales fotosintéticas presentes en el primer cultivo celular en suspensión del procedimiento del primer aspecto de la invención pueden poseer una o más características seleccionadas de:

- (i) como un promedio de más de 100 células extraídas al azar del primer cultivo celular en suspensión, las células vegetales fotosintéticas contienen al menos 10, 15, 30, 40, 50 o más cloroplastos por célula;
- (ii) un mayor contenido de clorofila (preferentemente 2, 3, 4, 5, 10, 20 veces o más) que las células de un cultivo en suspensión de células del mesodermo derivado de la misma especie de planta, por ejemplo, como se determina por un ensayo espectrofotométrico que compara la absorbancia de una muestra de ensayo a una longitud de onda de 594 nm (que indica el contenido de clorofila) con la absorbancia de la misma muestra a una longitud de onda de aproximadamente 1500 nm (lo que indica la densidad celular) de tal manera que el contenido de clorofila puede estar representado por la relación $Ab_{594}:Ab_{1500}$;
- (iii) la capacidad para producir por lo menos 30, 40, 50 o más g/l de azúcar (tales como glucosa, sacarosa y/o fructosa) cuando se mantienen en cultivo celular en suspensión durante una semana a 20-24 °C, a presión atmosférica, en presencia de un exceso de dióxido de carbono y con exposición a la luz del espectro completo, con intensidad a 594 nm de $15,12 \times 100^{-3}$ vatios, y/o
- (iv) la capacidad de capturar al menos 50, 75, 100 mg o más de carbono, por 100 g de peso seco de células, por hora, cuando se mantienen en cultivo celular en suspensión a 20-24 °C, a presión atmosférica, en presencia de exceso de dióxido de carbono y con exposición a la luz de espectro completo, con intensidad a 594 nm de $15,12 \times 100^{-3}$ vatios.

Las células vegetales fotosintéticas presentes en el primer cultivo celular en suspensión del procedimiento del primer aspecto de la invención se pueden aislar a partir de una planta tolerante al cobre, tal como a partir de *Agrostis tenuis*.

El primer cultivo celular en suspensión de células vegetales fotosintéticas del primer aspecto de la presente invención puede tener un nivel de cobre medio en el cultivo de 0,001 a 0,1 M.

- 5 En el procedimiento del primer aspecto de la presente invención, el primer cultivo celular en suspensión de células vegetales fotosintéticas puede alimentarse con dióxido de carbono de una fuente de dióxido de carbono seleccionada de dióxido de carbono líquido o dióxido de carbono gaseoso. La fuente de dióxido de carbono líquido o gaseoso puede, o no, ser obtenida total o parcialmente como un subproducto de un procedimiento de producción de dióxido de carbono, tal como un procedimiento de generación de energía que utiliza combustibles de carbono, o un
10 procedimiento de producción de biocombustible (tal como bioetanol u otros alcoholes) por microorganismos (tales como levadura) que libera dióxido de carbono.

- 15 Por lo tanto, en una realización preferida del primer aspecto de la presente invención, al menos el primer cultivo celular en suspensión y, opcionalmente, también el segundo cultivo de células, es o se mantienen en el sitio del procedimiento de producción de dióxido de carbono, como por ejemplo en el sitio de una instalación de generación de energía (por ejemplo, electricidad) o en el sitio de una instalación de generación de un biocombustible (tal como bioetanol u otro alcohol), que generan dióxido de carbono como un subproducto.

- 20 En consecuencia, el primer aspecto de la presente invención también proporciona un sistema de dos cultivos para la producción de un producto biológico (por ejemplo, como se ha definido anteriormente), que comprende un primer cultivo en suspensión de células vegetales y un segundo cultivo de células, cada uno como se ha definido anteriormente en relación al primer aspecto de la presente invención. El sistema de dos cultivos puede comprender, además, una fuente que genera dióxido de carbono y en el que el dióxido de carbono así generado se introduce en el primer cultivo celular en suspensión. La fuente que genera dióxido de carbono y el segundo cultivo de células pueden ser iguales o diferentes.

- 25 En una realización preferida, el sistema de dos cultivos del primer aspecto de la presente invención es un sistema para la producción de al menos un ácido graso y/o aceite, que comprende un primer cultivo en suspensión de células vegetales como se ha definido anteriormente en relación con el primer aspecto de la presente invención y un segundo cultivo en suspensión de células vegetales productoras de aceite como se ha definido anteriormente con respecto a la realización particularmente preferida del primer aspecto de la presente invención.

- 30 El primer aspecto de la presente invención también proporciona un sistema de captura de dióxido de carbono que comprende el primer cultivo en suspensión de células vegetales como se ha definido anteriormente en relación con el primer aspecto de la presente invención y también el segundo cultivo de células como se ha definido anteriormente en relación con el primer aspecto de la presente invención. El sistema de captura de dióxido de carbono puede comprender una fuente que genera dióxido de carbono, en cuyo caso el dióxido de carbono así generado se introduce en el primer cultivo en suspensión de células vegetales. El sistema de captura de dióxido de carbono puede
35 comprender un segundo cultivo en suspensión de células vegetales productoras de aceite como se ha definido anteriormente con respecto a la realización particularmente preferida del primer aspecto de la presente invención.

- 40 El primer aspecto de la presente invención también proporciona el uso del sistema de dos cultivos, o del sistema de captura de dióxido de carbono, para capturar dióxido de carbono. Generalmente, el dióxido de carbono que se captura es el subproducto de un procedimiento de producción de dióxido de carbono, tal como un procedimiento de generación de energía (por ejemplo, electricidad) que utiliza combustibles de carbono o un procedimiento de producción de biocombustible (como el bioetanol u otro alcohol) por microorganismos (tales como levadura) que libera dióxido de carbono. Este uso puede tener lugar en el sitio del procedimiento de producción de dióxido de carbono, tal como por ejemplo en el sitio de una instalación de generación de energía (por ejemplo, electricidad) o en el sitio de una instalación de generación un biocombustible (tal como bioetanol u otro alcohol) u otro procedimiento
45 comercial, industrial o natural, que genera dióxido de carbono como un subproducto.

- 50 En consecuencia, el primer aspecto de la presente invención también proporciona una instalación de generación de energía (por ejemplo, electricidad) productora de dióxido de carbono que comprende el sistema de dos cultivos como se ha definido anteriormente por el primer aspecto de la invención, o el sistema de captura de dióxido de carbono como se ha definido anteriormente por el primer aspecto de la invención. En una realización, el sistema de dos cultivos o el sistema de captura de dióxido de carbono puede producir al menos un ácido graso y/o aceite del dióxido de carbono capturado y, opcionalmente, el al menos un ácido graso y/o aceite producido de este modo se puede usar directamente, o indirectamente (por ejemplo, convirtiendo en biocombustible) para complementar el combustible utilizado por la instalación de generación de energía.

- 55 El primer aspecto de la presente invención también proporciona una instalación de generación de biocombustible (tal como bioetanol u otro alcohol) productor de dióxido de carbono que comprende el sistema de dos cultivos como se ha definido anteriormente por el segundo aspecto de la invención, o el sistema de captura de dióxido de carbono tal como se ha definido anteriormente por el primer aspecto de la invención. Los azúcares producidos por el primer cultivo celular en suspensión de células vegetales fotosintéticas presentes dentro del sistema de dos cultivos o el

sistema de captura de dióxido de carbono se pueden usar para complementar el crecimiento de microorganismos (tales como levadura) que se utiliza en la producción de biocombustible por la instalación de generación de biocombustible.

5 La presente solicitud también describe un extracto de un producto biológico obtenible por el procedimiento del primer aspecto de la presente invención. Así, el extracto puede ser un extracto de al menos un ácido graso y/o aceite. La presente solicitud también describe un biocombustible obtenible mediante el procesamiento del extracto de al menos un ácido graso y/o aceite.

10 La presente solicitud también describe el uso de un extracto de un producto biológico obtenible por el procedimiento del primer aspecto de la presente invención, o un biocombustible obtenible mediante el procesamiento del extracto, como una fuente suplementaria de combustible para un procedimiento de producción de dióxido de carbono.

15 En los procedimientos anteriores del primer aspecto de la presente invención que implican la producción de ácidos grasos y/o aceites, la producción de biocombustibles tales como FAME, a partir de aceites (es decir, ácidos grasos conjugados con glicerina) requiere una reacción que lisa el aceite para producir el biocombustible y un producto secundario de glicerol. Cuando se produce en grandes cantidades, como sería necesario para generar una cantidad comercialmente relevante de biocombustible a partir de aceites vegetales, el glicerol puede ser un producto secundario perjudicial y problemático. El presente inventor se ha dado cuenta de que sería conveniente y beneficioso modificar la producción de aceites por cultivos de células vegetales mediante el uso de un inhibidor enzimático que pueda prevenir, reducir o invertir la adición de la glicerina a los ácidos grasos y así reducir o eliminar la necesidad de producción de residuos durante la extracción de ácidos grasos. De hecho, el inventor se ha dado cuenta de que sería posible aprovechar esta estrategia en cualquier procedimiento de producción de ácidos grasos y aceites en cultivos de células vegetales.

25 En consecuencia, la presente solicitud también describe un procedimiento para la producción de al menos un ácido graso a partir de un cultivo de células vegetales, comprendiendo el procedimiento el mantenimiento de un cultivo celular en suspensión de células vegetales productoras de aceite en presencia de un inhibidor de la gliceración de los ácidos grasos, de modo que las células cultivadas produzcan al menos un ácido graso. En consecuencia, el procedimiento puede incluir la etapa de adición de al menos un inhibidor de la gliceración de los ácidos grasos a un cultivo celular en suspensión de células vegetales productoras de aceite. Alternativamente, el procedimiento puede implicar el uso de células vegetales productoras de aceite que han sido modificadas genéticamente, tales como para incorporar una o más modificaciones genéticas para aumentar los niveles endógenos de una enzima, o codificar una enzima no nativa, (que puede, o no puede, contener una secuencia líder de secreción para efectuar la secreción de la enzima de la célula vegetal), enzima que es capaz de prevenir, reducir o invertir la gliceración de los ácidos grasos y de ese modo aumentar el nivel de producción de ácidos grasos libres con una reducción concomitante de la producción de aceites.

35 Los inhibidores adecuados que son capaces de prevenir, reducir o invertir la gliceración de ácidos grasos pueden ser inhibidores enzimáticos o químicos de la gliceración. Los inhibidores enzimáticos incluyen enzimas lipasa y esterasa. Puede preferirse lipasa de germen de trigo o de colza. Por ejemplo, la lipasa de germen de trigo puede adquirirse de Sigma Aldrich.

Las lipasas adecuadas (o secuencias de ADN que codifican la lipasa) también se pueden obtener a partir de microorganismos tales como *Candida antarctica*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor miehei* y/o *Pseudomonas cepacia*.

40 Hay muchas lipasas disponibles comercialmente que se pueden usar. Por ejemplo, una lipasa adecuada se puede seleccionar de entre la siguiente lista de lipasas disponibles comercialmente: lipasa de *Aspergillus niger* (Sigma Código de producto: 62301) *Aspergillus oryzae* (Sigma Código de producto: 62285) *Aspergillus sp.* (Sigma Código de producto: 84205) *Burkholderia sp.* (Sigma Código de producto: 75577) *Candida antarctica* (Sigma Código de producto: 65986), *Candida cylindracea* (Sigma Código del producto: 62302 o 62316), *Candida lipolytica* (Sigma Código de producto: 62303), *Candida rugosa* (Sigma Código del producto: L1754, 90860 o L8525), *Chromobacterium viscosum* (Sigma Código del producto: L0763), páncreas humano (Sigma Código del producto: L9780), *Mucor javanicus* (Sigma Código del producto: L8906), *Mucor miehei* (Sigma Código del producto: L9031 o 62298) *Penicillium camemberti* (Sigma Código de producto: 96888), *Penicillium roqueforti* (Sigma Código de producto: 62308), páncreas porcino (Sigma Código del producto: L0382, L3126, 62313 o 62300) *Pseudomonas cepacia* (Sigma Código de producto: 62309), *Pseudomonas fluorescens* (Sigma Código del producto: 28602 o 95608), *Pseudomonas sp.* (Sigma Código de producto: L9518), *Rhizomucor miehei* (Sigma Código del producto: L4277), *Rhizopus arrhizus* (Sigma Código de producto: 62305), *Rhizopus niveus* (Sigma Código de producto: 62310), *Rhizopus oryzae* (Sigma Código de producto: 80612), *Thermomyces lanuginosus* (Sigma Código de producto: L0777), *Thermus flavus* (Sigma Código de producto: L3294), *Thermus thermophilus* (Sigma Código de producto: L3419) o germen de trigo (Sigma Código de producto: L3001).

Paynich, 2007, Microbiol y Mol. Gen., 445, 57-61, describe el uso de lipasas en los procedimientos químicos para la producción de biocombustible a partir de aceites vegetales, en los que se emplean en lugar de un catalizador básico, tal como hidróxido de sodio para separar los aceites en ácidos grasos y glicerol. Sin embargo, Paynich advierte del efecto inhibidor del glicerol liberado sobre la actividad de la lipasa, debido a la inhibición competitiva. En el tercer

aspecto de la presente invención, este efecto inhibidor es mitigado por el uso de la lipasa (u otro inhibidor de la gliceración de ácido graso) en un sistema 'en cultivo', en lugar de en un procedimiento químico.

Cuando se usa un inhibidor enzimático, entonces, se puede elegir el pH del cultivo celular para optimizar la actividad del inhibidor. Por ejemplo, la lipasa es normalmente más activa a un pH de alrededor 7. En consecuencia, puede ser beneficioso seleccionar un pH del cultivo que esté lo más cercano posible al pH óptimo de la enzima. Por supuesto, esto puede resultar en un compromiso entre el mejor pH para la actividad del inhibidor enzimático y el mejor pH para la secreción y la recogida de los ácidos grasos y aceites del cultivo celular en suspensión de células vegetales como se discutió anteriormente. El experto en la técnica será capaz de determinar el compromiso óptimo entre estos aspectos en competencia en función del objetivo clave del procedimiento.

Se puede usar un nivel de inhibidor que sea capaz de reducir el nivel de ácidos grasos glicerados hasta en, o, al menos, el 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más, en comparación con el mismo sistema de cultivo en ausencia del inhibidor. Por ejemplo, el presente inventor ha descubierto que, cuando se añadía 1 g de la lipasa de germen de trigo a 100 ml del cultivo en suspensión, el aceite resultante mostraba descomposición, siendo un 8 % del aceite ácidos grasos no glicerados en comparación con el producto de la suspensión celular normal. Se espera que niveles más altos de actividad de la lipasa den lugar a más de un 8 % de ácidos grasos no glicerados.

Esto se puede combinar con el primer aspecto de la presente invención para la producción de al menos un ácido graso y/o aceite, mediante el mantenimiento de un cultivo celular en suspensión de células vegetales productoras de aceite como se define en el primer aspecto de la presente invención en la presencia de un inhibidor de la gliceración de ácidos grasos, de tal modo que las células cultivadas produzcan al menos un ácido graso y, más específicamente, un mayor nivel de ácidos grasos no glicerados cuando se compara con el mismo sistema de cultivo en ausencia del inhibidor.

El procedimiento puede comprender además la etapa de extraer el al menos un ácido graso. En consecuencia, la presente solicitud también divulga un extracto de ácido graso que se puede obtener por este procedimiento. El al menos un ácido graso extraído puede, por ejemplo, procesarse para producir un biocombustible y, como tal, también para proporcionar un biocombustible obtenible por dicho procedimiento.

La presente solicitud también describe un cultivo celular en suspensión de células vegetales productoras de aceite que comprende un inhibidor de la gliceración de ácidos grasos como se define anteriormente, y el uso del cultivo en suspensión de células para producir al menos un ácido graso. En una realización de este uso, al menos un ácido graso y/o aceite se secreta en el medio del cultivo celular en suspensión, por ejemplo, de acuerdo con los procedimientos del primer aspecto de la presente invención.

La presente solicitud también describe un medio del cultivo en suspensión de células vegetales que comprende un inhibidor de la gliceración de ácidos grasos. El medio del cultivo en suspensión de células vegetales puede ser uno como el que se ha definido anteriormente en relación con el primer aspecto de la realización particularmente preferido de la presente invención.

Como se ha discutido anteriormente, los ácidos grasos y/o aceites (tales como los producidos por las realizaciones del primer aspecto de la presente invención) se pueden convertir en biocombustibles, tales como FAME.

Los procedimientos adecuados para lograr esta conversión son bien conocidos en la técnica y cualquiera se puede aplicar al tratamiento y procesamiento de los ácidos grasos y/o aceites producidos por los primero, segundo y/o tercer aspectos de la presente invención. Por ejemplo, Paynich, 2007, Microbiol & Mol. Gen., 445, 57-61 revisa diferentes procedimientos para la transesterificación de aceites vegetales para producir biodiesel.

Como se discutió en Paynich (*supra*), los procedimientos conocidos en la técnica para la transesterificación de aceites vegetales para producir biodiesel generalmente implican la reacción de aceites vegetales con metanol en presencia de un catalizador alcalino tal como hidróxido de sodio. Como se discutió en Paynich, en la página 58, 1ª col., líneas 9-12, estos procedimientos utilizan un gran exceso de volumen de metanol en comparación con la cantidad de aceite vegetal utilizado, generalmente en una proporción de 6:1 de metanol a aceite, que es la que se dice que se necesita para llevar la reacción hasta su finalización. Con esta relación, Paynich señala, en la página 58, col. 1, que a partir del cártamo se obtuvo un rendimiento del 96,8 % de biodiesel. Del mismo modo, Bambase et al, 2007, J. Chem. Technol. Biotechnol., 82, 273-280 señala en el resumen, que se produjeron ésteres metílicos de aceite de girasol crudo por metanolisis utilizando un catalizador de hidróxido de sodio con proporciones metanol:aceite de 6:1 - 20:1. Navaraez et al, 2007, J. Am. Oil Chemists' Soc., 84, 971-977 describen un procedimiento de metanolisis de aceite de palma y utiliza una relación molar de metanol de 6:1. Mayo de 2004, J. Oil Palm Res., 16, 1-11 enseña una relación molar de metanol:aceite de 10:1. El documento US 6.712.876 enseña relaciones molares preferidas de metanol y triglicérido de ácido graso de 15:1 a 30:1. Todos los procedimientos anteriores pueden usarse para producir biocombustibles a partir de ácidos grasos y/o aceites producidos por las realizaciones del aspecto de la presente invención.

Sin embargo, el presente inventor ha reconocido que los procedimientos de la técnica anterior de producción de combustible se basan en un gran exceso de metanol, el cual es costoso y puede dar lugar también a un alto nivel de contaminación con metanol del biocombustible producido de este modo (por ejemplo, FAME), tales como

potencialmente un nivel de metanol del 50-60 % (v/v), o superior, en el producto biocombustible resultante.

El presente inventor ha descubierto sorprendentemente que es posible lograr la conversión eficiente de los ácidos grasos y/o aceites en biocombustible mediante el uso de cantidades mucho más bajas de metanol. Específicamente, el presente inventor ha demostrado que es posible obtener un rendimiento de 93,4 % utilizando una relación de metanol: aceite de aproximadamente 1:7,5. En comparación con los procedimientos de la técnica anterior discutidos anteriormente, esto es una disminución significativa en la cantidad de metanol utilizado, con sólo una pequeña reducción en el rendimiento. Por ejemplo, en comparación con el rendimiento descrito por Paynich (*supra*) de 96,8 % de biodiesel a partir de cártamo cuando se utiliza una relación de metanol-aceite de 6:1, el presente inventor ha logrado un procedimiento que utiliza aproximadamente 45 veces menos metanol, pero que sólo muestra una disminución del rendimiento de aproximadamente el 3,4 %. Esto puede reducir significativamente los costes del procedimiento de conversión de biocombustibles a base de metanol. Por otra parte, los niveles de contaminación de metanol del biocombustible producido de este modo (por ejemplo, FAME) se pueden reducir sustancialmente hasta menos del 20 %, 15 %, 10 %, 5 % (v/v) o menos.

En consecuencia, la presente solicitud también describe un procedimiento para la producción de biocombustibles a partir de al menos un ácido graso y/o monoglicéridos, diglicéridos y/o triglicéridos que comprende hacer reaccionar:

- un primer volumen de al menos un ácido graso y/o mono glicéridos, diglicéridos y/o triglicéridos con
- un segundo volumen de un reactante seleccionado de un alcohol, alcano o alqueno,
- en presencia de un catalizador básico, para formar con ello el biocombustible,

en donde la relación entre el primer volumen y el segundo volumen es mayor que 1:6, tal como al menos 1:5, 1:4, 1:3, 1:2 o 1:1. Por ejemplo, el primer volumen de al menos un ácido graso y/o monoglicéridos, diglicéridos y/o triglicéridos puede ser mayor que el segundo volumen del reactante, es decir, más de 1:1, tal como entre 1:1 a 10:1, por ejemplo, al menos 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 o 7:1, opcionalmente menos de 9:1 o 8:1, más preferentemente aproximadamente 7,5:1.

El biocombustible producido por este procedimiento puede ser un éster metílico de ácidos grasos (FAME).

El al menos un ácido graso y/o monoglicéridos, diglicéridos y/o triglicéridos puede comprender unidades de ácido grasos con una longitud de cadena de C8-C30. En una realización, la distribución de longitudes de cadena de ácidos grasos no está fuera en más de aproximadamente el 5 %, tal como no más de aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 0,5 % o sustancialmente el 0 % de dos desviaciones estándar de la longitud de cadena de ácido graso predominante. El ácido graso y/o monoglicéridos, diglicéridos y/o triglicéridos puede ser al menos un ácido graso o aceite como el producido por un cultivo celular en suspensión de células vegetales productoras de aceite, tales como los definidos por realizaciones de los aspectos de la primera la presente invención.

El reactante utilizado por el procedimiento puede seleccionarse de un alcohol C1-C8, alcano C1-C8 o alqueno C1-C8. En una realización, es metanol.

El catalizador básico utilizado por el procedimiento puede seleccionarse de un hidróxido de un metal del Grupo 1, tal como LiOH, NaOH, KOH. El NaOH puede ser preferido. Los niveles adecuados de catalizador básico se pueden determinar mediante técnicas de rutina, pero pueden estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 % p/v a 10 % p/v, preferentemente a un porcentaje de masa en volumen de 0,5 % a 2 % p/v

El procedimiento puede comprender las siguientes etapas:

(i) mezclar el primer volumen de el al menos un ácido graso y/o monoglicéridos, diglicéridos y/o triglicéridos y el segundo volumen de un reactante seleccionado de un alcohol, alcano o alqueno, en presencia del catalizador básico durante un período de tiempo seleccionado desde 1 hasta 72 horas (preferentemente 6-48 horas, tal como aproximadamente 6, 12, 24 o 48 horas) a una temperatura seleccionada de 50-150 °C (preferentemente a 60-100 °C, tales como aproximadamente 65 °C);

(ii) reducir la temperatura de la mezcla de reacción (por ejemplo a aproximadamente la temperatura ambiente, es decir, 15-30 °C, tal como aproximadamente 20 °C) y seguir mezclando a la temperatura reducida durante un periodo de tiempo seleccionado de entre 12-48 horas (preferentemente 16-24 horas, tal como aproximadamente 6, 12, 24 o 48 horas);

(iii) dejar que la mezcla de reacción se asiente de manera que una capa de glicerina se separe de una capa de biocombustible (por ejemplo, dejar que la mezcla de reacción repose a aproximadamente la temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora, o por centrifugación); y

(iv) separar las capas de glicerina y biocombustible para obtener un extracto de biocombustible y

(v) opcionalmente, tratar el extracto de biocombustible obtenido en la etapa (iv) para reducir la longitud de la cadena de las unidades de ácidos grasos, preferentemente para aumentar el nivel de octano, por ejemplo

mediante tratamiento con peróxido de hidrógeno + cloruro de hierro (III) o reactivos equivalentes , o mediante craqueo térmico o craqueo térmico ácido usando técnicas conocidas en la técnica.

El procedimiento puede proporcionar un rendimiento de biocombustible que es mayor del 50 %, tal como más del 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 % o 93 %, preferentemente en el intervalo del 93-94 %.

- 5 El biocombustible producido por el procedimiento puede tener un contenido de metanol de menos del 50 % (v/v), tal como menos del 40 %, 30 %, 20 % o 10 % (v/v).

- 10 El biocombustible producido por el procedimiento puede tener una distribución de longitudes de cadena de ácidos grasos en la que no más de aproximadamente 5 %, tal como no más de aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 0,5 % o sustancialmente el 0 % está fuera de dos desviaciones estándar de la longitud de cadena de ácidos grasos predominante.

La presente solicitud también describe un biocombustible obtenible por este procedimiento. En consecuencia, el biocombustible obtenido de este modo puede, por ejemplo, poseer:

- 15 (a) un contenido de metanol de menos del 50 % (v/v), tal como menos del 40 %, 30 %, 20 %, o 10 % (v/v), y/o
(b) una distribución de longitudes de cadena de ácidos grasos en la que no más de aproximadamente 5 %, tal como no más de aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 0,5 % o sustancialmente el 0 % está fuera de dos desviaciones estándar de la longitud de cadena de ácidos grasos predominante.

Breve descripción de los dibujos

- 20 La Figura 1 es un diagrama esquemático de la Etapa 1 de un procedimiento de extracción como se describe en el Ejemplo 1, y muestra el tratamiento térmico de las células.

La Figura 2 es un diagrama esquemático de la Etapa 2 de un procedimiento de extracción como se describe en el Ejemplo 1, y muestra el disolvente de extracción de las células.

La Figura 3 es un diagrama esquemático de la Etapa 3 de un procedimiento de extracción como se describe en el Ejemplo 1, y muestra el disolvente de extracción de las células.

- 25 La Figura 4 es un diagrama esquemático de la Etapa 4 de un procedimiento de extracción como se describe en el Ejemplo 1, y muestra el disolvente de extracción de las células.

La Figura 5, muestra la Tabla 1, como se describe en el Ejemplo 2 a continuación.

La Figura 6 muestra la relación entre el pH del cultivo y el nivel de ácidos grasos y aceites secretados y recogidos de un sistema bifásico, tal como se describe en el Ejemplo 3.

- 30 La Figura 7 muestra un ejemplo de aparato para su uso en un sistema de cultivo de dos células como se describe en el Ejemplo 6, en el que se utiliza el término "cloroplasto" para referirse a un tanque de un cultivo en suspensión de células vegetales fotosintéticas y el término "vacuola" se utiliza para referirse a un depósito de cultivo en suspensión de células vegetales productoras de aceite.

- 35 La Figura 8 muestra el análisis de cromatografía de gases de la distribución de aceites y ácidos grasos no glicerados en un extracto tomado del cultivo en suspensión tal como se describe en el apartado 6.2 del ejemplo 1.

La invención se entenderá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos experimentales no limitativos.

Ejemplo 1 (Ejemplo comparativo)

La Figura 1-4 muestra un diagrama esquemático de un procedimiento de extracción.

- 40 1.1 La Figura 1 muestra el tratamiento térmico de células liofilizadas, lo que representa la etapa 1, en la cual las células del cultivo celular en suspensión de *T. vulgare* PAW-NS-1 se calentaron durante 8 horas en un horno a 100 °C.
1.2 La figura 2 muestra la etapa 2 de un procedimiento de extracción para la extracción con disolvente de las células tratadas con calor. En la Etapa 2:
- 45 a) Las células tratadas con calor se someten a reflujo durante una hora en una mezcla 1:1 de cloroformo y metanol.
b) Célula: la mezcla de disolventes se filtra.
c) Se elimina el disolvente por evaporación rotatoria. El residuo que contiene extracto activo bruto se vuelve a disolver en cloroformo y se procede a la etapa 3.
- 50 d) El disolvente utilizado se separa por destilación y se recicla de nuevo a la cámara de reflujo para su

reutilización.

e) Las células usadas se desechan.

1.3 La figura 3 muestra la etapa 3 de un procedimiento de extracción para la extracción con disolvente de las células tratadas con calor. En la Etapa 3:

- 5 a) El residuo activo bruto en cloroformo se mezcla con un volumen igual de agua destilada y se mezcla.
- b) Las fases se dejan separar y se utiliza un grifo de medida para eliminar el cloroformo a una cámara.
- c) Se elimina el disolvente por evaporación rotatoria. El residuo que contiene extracto activo bruto se vuelve a disolver en metanol y se procede a la etapa 4.
- 10 d) El disolvente utilizado se separa por destilación y se recicla de nuevo a la cámara de mezcla para su reutilización.
- e) El agua se elimina.

1.4 La figura 4 muestra la etapa 4 de un procedimiento de extracción para la extracción con disolvente de las células tratadas con calor. En la Etapa 4:

- 15 a) El residuo activo bruto en metanol se mezcla con un volumen igual de hexano y se mezcla.
- b) Las fases se pueden separar y se usa un grifo de medida para eliminar el metanol a una cámara.
- c) El disolvente se elimina por evaporación rotatoria. Se obtiene un residuo que contiene extracto activo puro.
- d) El disolvente utilizado se separa por destilación y se recicla de nuevo a la cámara de mezcla para su reutilización.
- e) El hexano usado se separa por destilación y se reutiliza.

20 5.0 Inducción y mantenimiento del cultivo en suspensión de células de *Triticum*

5.1 *Iniciación de cultivos de callos de Triticum - preparación de los medios*

5.2 *Iniciación de cultivos de callos de Triticum - esterilización de tejidos vegetales*

5.3 *Preparación de los medios*

5.4 *Inoculación y subcultivo*

25 5.1 Iniciación de cultivos de callos de *Triticum*: preparación del medio de inducción de callo

Solución de los medios de inducción de callo; H₂O destilada hasta 100 %; sacarosa 3,0 %; solución madre al 0,1 % de NAA (ácido acético naftaleno) 0,004 %, medio basal de Murashige y Skoog en polvo 0,44 %.

30 *Equipamiento*: Frasco de vidrio con tapa, agitador magnético, placas de cultivo de plantas de plástico estériles, pipetas de vidrio, pH metro, autoclave, campana de flujo laminar, balanza; Nescofilm; Phytigel; solución de NaOH 1M, solución de NaOH 0,1M.

- a) Los medios de inducción del callo se prepararon usando medios de Murashige y Skoog (MS) obtenidos de Sigma con 3 % de sacarosa y 1 % de ácido acético naftaleno (de una solución madre concentrada de 0,004 % p/v
- 35 b) El pH de los medios preparados se ajustó a pH 5,75 y se solidificó con 0,2 % de Phytigel.
- c) Los medios se trataron en autoclave durante 20 minutos a 121 °C y después se vertieron en placas de cultivo de tejidos vegetales de plástico estériles.

5.2 Iniciación de cultivos de callos de *Triticum*: esterilización de tejidos vegetales

Reactivos: Medios preparados anteriormente (sección 5.1); tejido vegetal de *Triticum vulgare*

40 *Equipamiento*: Vasos de precipitados de vidrio estériles, agua destilada estéril, bisturí estéril, pinzas estériles, solución de lejía al 10 %, solución de etanol al 70 %, solución de NaOH 1M, solución de NaOH 0,1M.

- a) El tejido vegetal de *Triticum* se esterilizó por inmersión en etanol al 70 % durante 2 minutos, seguido de inmersión en una solución de lejía al 10 %, durante 10 minutos.
- b) El *Triticum* se lavó a continuación tres veces con agua destilada estéril (esterilizado en autoclave).
- c) El *Triticum* estéril se cortó asépticamente en forma de disco en una campana de flujo laminar estéril.
- 45 d) Se colocaron rebanadas de *Triticum* en placas preparadas que contenían medio de inducción de callo y las placas se sellaron con Nescofilm.
- e) Las placas se colocaron en la oscuridad a 27 °C y la formación de callo comenzó a aparecer después de alrededor de 1 mes.

5.3 Preparación de los medios para cultivos culturas establecidos

50 *Reactivos*: H₂O destilada hasta 100 %; sacarosa 3,0 %; medio basal de Murashige y Skoog en polvo 0,44 %; solución madre al 1 % de NAA (ácido acético naftaleno) 0,004 %; solución de vitamina 0,01 % (cloruro de piridoxal 0,05 %, dicloruro de tiamina 0,10 % y ácido nicotínico 0,05 %); solución de NaOH 1M, solución de NaOH 0,1M.

Equipamiento: botella de vidrio de 1 l; agitador magnético; 20 matraces cónicos de 250 ml, 20 hojas de papel de aluminio de aproximadamente 20 x 20 cm; pipetas de vidrio, pH metro, autoclave, campana de flujo laminar; balanza.

Procedimiento:

- 5 a) Mezclar sacarosa 3 %, MS en polvo 0,44 %, solución madre al 1 % de NAA y solución madre de vitamina 0,01 % y preparar hasta 100 % con H₂O destilada.
- b) Mezclar utilizando un agitador magnético hasta que se disuelvan todos los componentes secos, a continuación, ajustar el pH con NaOH 1 M y 0,1 M, a 5,75.
- 10 c) Disponer 20 matraces cónicos de 250 ml. Añadir a cada uno 50 ml de los medios y sellar el cuello del matraz con papel de aluminio. Esterilizar en autoclave, a 121 °C, 103 kPa, durante 25 minutos.
- d) Inmediatamente después de la esterilización, colocar los matraces en una campana de flujo laminar y dejar enfriar a temperatura ambiente.

5.4 Inoculación y subcultivo de cultivos establecidos

Reactivos: Callo friable, etanol al 70 %.

- 15 *Equipamiento:* Campana de flujo laminar, mechero Bunsen, medios preparados; 20 hojas estériles de papel de aluminio de aproximadamente 20 x 20 cm, varios pares de pinzas o fórceps pequeñas, espátulas anchas con orificios.

Procedimiento:

- a) Esterilizar el interior de la cabina de flujo laminar con etanol al 70 %.
- 20 b) Esterilizar todas las pinzas y espátulas por inmersión en etanol al 70 %, a continuación calentar a rojo vivo. Dejar enfriar en el interior de la campana de flujo laminar.

Inoculación inicial:

- a) Retirar el papel de aluminio del matraz con los medios preparados.
- 25 b) Tomar las pinzas esterilizadas y quitar trozos de tamaño minúsculo del callo friable de los tejidos de la planta. Dividir en células finamente dispersas y añadir al matraz. Tratar de añadir aproximadamente 5 g de tejido a 50 ml de medios (10 % p/v)
- c) Flamear el cuello del matraz y cubrir con una hoja de papel de aluminio estéril.
- d) Colocar el matraz en un agitador a 120 rpm, en un cuarto oscuro calentado hasta 27 °C. Dejar hasta que se pueda observar un cultivo celular en suspensión disperso grueso (aproximadamente 2 semanas).

Subcultivo:

- a) Retirar el papel aluminio del matraz con los medios preparados.
- b) Retire el papel aluminio del frasco que contiene dispersado cultivos de células en suspensión (producidas por inoculación inicial, punto 6)
- 35 c) Tomar la espátula ancha con orificios, esterilizar, dejar enfriar y recoger las células. Añadir estas células a los medios frescos. Tratar de añadir aproximadamente 5 g de tejido a 50 ml de medios.
- d) Flamear el cuello del matraz y cubrir con una hoja de papel de aluminio estéril.
- e) Colocar el matraz en un agitador a 120 rpm, en un cuarto oscuro calentado hasta 27 °C. Después de 14 días, usar el cultivo celular en suspensión para otros subcultivos.

6.0 Cultivo celular en suspensión

40 6.1 Preparación de los medios para cultivos celulares en suspensión

Reactivos: H₂O destilada hasta 100 %; sacarosa 3,0 %; medio basal de Murashige y Skoog en polvo 0,44 %; solución madre al 1 % de NAA (ácido acético naftaleno) 0,004 %; solución de vitamina 0,01 % (cloruro de piridoxal 0,05 %, dicloruro de tiamina 0,10 % y ácido nicotínico 0,05 %); solución de NaOH 1M, solución de NaOH 0,1M.

Procedimiento:

- a) Mezclar sacarosa 3 %, MS en polvo 0,44 %, solución madre al 1 % de NAA y solución madre de vitamina 0,01 % y preparar hasta 100 % con H₂O destilada.
- b) Mezclar hasta que todos los componentes secos se hayan disuelto, a continuación, ajustar el pH con NaOH 1 M y 0,1 M, a 5,75.
- 50 c) Esterilizar los medios y dejar enfriar a temperatura ambiente antes de su uso.

6.2 Subcultivo de los cultivos celulares en suspensión

Reactivos: Células friables; Medios preparados anteriormente (sección 5.1)

Procedimiento:

- a) Tomar cultivo celular en suspensión en la fase exponencial de crecimiento.
- b) Filtrar las células de los medios y usar estas células para inocular medio fresco. Tratar de añadir las células a los medios a aproximadamente 10 % p/v
- c) Agitar el recipiente de cultivo a 120 rpm, a 27 °C y en condiciones de oscuridad.
- d) Para otras subcultivos, las células deben usarse cuando el cultivo haya alcanzado la fase de crecimiento logarítmico.
- e) Para la recolección de compuesto activo, las células deben usarse cuando el cultivo haya alcanzado la fase estacionaria.

Ejemplo 2 (Ejemplo Comparativo)

Este ejemplo proporciona una explicación sobre la producción de biocombustible a partir de aceite vegetal. El procedimiento empleado fue el siguiente:

Producción de biocombustible

Etapas 1: El aceite vegetal se mezcló con una solución 1,04 M de hidróxido de sodio (NaOH) en metanol (MeOH), con una relación de la solución de NaOH/MeOH de 187 ml/25 ml. Esta se mezcló a 65 °C durante 6 horas y se dejó mezclando durante la noche (16 horas) a temperatura ambiente, 20 °C. Después de transcurrido este tiempo, la mezcla se dejó reposar durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual se formaron 2 capas. La capa inferior (glicerina) se eliminó utilizando un embudo de decantación y la capa superior se conservó para su posterior análisis y tratamiento.

Etapas 2: La reacción de Fenton se indujo en la capa superior. Esta etapa se lleva a cabo en la campana de extracción, usando un protector facial. Se añadió peróxido de hidrógeno (33 %) y cloruro de hierro (III) en una relación en peso de 50:1 (en moles, la relación fue de 10:1). En primer lugar se añadió el cloruro de hierro (III) y luego el peróxido de hidrógeno, que se añadió gota a gota debido al carácter exotérmico de la reacción y la producción de un gas.

La Etapa 2 se realizó por duplicado: un matraz se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas, el otro se agitó en el rotavapor (a presión atmosférica) a 65 °C durante 72 horas. A intervalos de 24 horas, los matraces se dejaron durante una hora para permitir la sedimentación, a continuación, se eliminó 1 ml de la capa superior y se colocó en un vial para análisis por CG.

Análisis de CG

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N Network acoplado con un detector selectivo de masas 5973 Network.

La columna era una columna 190915-433/HP-5MS. 0,25 mm x 30 m x 0,25 µm, capilar, con helio como fase móvil.

El procedimiento era una adaptación de un procedimiento de Agilent para la separación de triglicéridos:

- Temp. inicial: 50 °C
- Temp. final: 350 °C
- Rampa: 15 °C por min
- Tiempo en el inicio: 1 min
- Tiempo al final: 0 min
- El volumen de inyección fue de 1 µl.
- Guardado en CG como aceite 4

Análisis del punto de inflamación

Realizado usando un dispositivo de copa cerrada Seta-Point serie 3.

Análisis de la viscosidad

Se realiza con un viscosímetro Brookfield DV-E a temperatura ambiente (20 °C), a 100 rpm.

Resultados

Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 1 de la Figura 5A y 5B y en las Tablas 2 y 3 mostradas a continuación.

Tabla 2. Mediciones de viscosidad de las muestras.

Muestra	Viscosidad (cPs)
Patrón	12
Muestra 1	64
Muestra 2	10

Tabla 3. Puntos de inflamación de las muestras.

Muestra	Punto de inflamación (CC) C
Muestra 1	158
Metanol	65
Muestra 2	175
Muestra 7	150
Muestra 6	160,5

Leyenda de las Tablas 1, 2 y 3:

Muestra 1: Aceite vegetal sin tratar

Muestra 2: Capa superior, etapa 1

Muestra 3: Etapa 1, 65 °C, después de 24 horas

Muestra 4: Etapa 1, temperatura ambiente, después de 24 horas

Muestra 5: Etapa 1, 65 °C, después de 48 horas

Muestra 6: Etapa 1, temperatura ambiente, después de 48 horas

Muestra 7: Etapa 1, 100 °C después de 48 horas

Discusión y Conclusión

- 5 **Etapla 1:** Nuestro procedimiento produjo, a partir de 561 ml de aceite vegetal, 524 ml de ésteres de metilo después del tratamiento de la etapa 1. Este es un rendimiento del 93,4 %. La viscosidad se había reducido por un factor de aproximadamente 6, después de la fase 1 de tratamiento.

10 El punto de inflamación del producto de la Etapa 1 fue 12 °C superior al del aceite vegetal sin tratar. En la literatura hay algunas referencias que señalan que el biodiesel tiene un punto de inflamación más alto que el de otros hidrocarburos.

En la CG se puede observar que después de la etapa 1, la capa superior parece estar totalmente compuesta de ésteres metílicos (con la excepción de unos pocos compuestos traza). El 96,5 % de los ésteres son los isómeros del ácido oleico C18 y casi todos ellos están en la forma (z): éster metílico del ácido (z)-9-octadecenoico. Aproximadamente el 6 % es el 11-isómero. La capa superior de la muestra 2 se usó para la siguiente etapa.

- 15 **Etapla 2:** Es evidente que el punto de inflamación de la muestra se redujo en 25 °C después de la reacción de Fenton seguido de calentamiento a 100 °C. Cuando la muestra se mezcla a temperatura ambiente el punto de inflamación sólo se reduce en 15 °C.

20 En el análisis de CG-EM, se puede observar que después de 24 horas a 65 °C, el compuesto mayoritario sigue siendo de lejos (78,17 %) el éster metílico del ácido (z)-9-octadecenoico, aunque ahora además había 13 % del 8-isómero, que no estaba presente en la Etapa 1. Después de 24 horas a temperatura ambiente, el compuesto mayoritario (84,59 %) era todavía el éster metílico del ácido (z)-9-octadecenoico. Un nuevo compuesto, el 9,12,15-octadecatrien-1-ol, era el segundo compuesto más mayoritario (12,44 %).

Después de 48 horas el compuesto mayoritario seguía siendo el éster metílico del ácido (z)-9-octadecenoico (77,07 %). Después de 24 horas, el segundo pico más grande correspondía al 8-isómero.

25 Cantidades necesarias

Cantidades de cada componente usadas para producir un litro de la mezcla de C18 C8

Aceite vegetal 1050 ml

144 ml de una solución de NaOH/MeOH 1,048M

46 ml de peróxido de hidrógeno 33 %

30 2g de Fe^{III}

Ejemplo 3 (Ejemplo comparativo)

Este ejemplo describe la optimización del pH del cultivo celular en suspensión de células productoras de aceite.

Procedimiento:

El cultivo de origen, como se describe en el apartado 6.2 del Ejemplo 1 se agitó a fondo durante diez minutos para conseguir una suspensión uniforme de células, a continuación, se tomaron alícuotas.

5 Las alícuotas del cultivo de células productoras de aceite se tamponaron a diferentes valores de pH como se indica en la Tabla 4, a continuación y la cantidad de aceite producido por alícuota de 100 ml, basada en el aceite que se recoge en la superficie del medio de cultivo celular que podía extraerse con una pipeta, se midió en una probeta durante un periodo de 14 días.

10 El tamponamiento del pH se consiguió con ácido cítrico e hidrógeno-ortofosfato disódico de acuerdo con el procedimiento de la Farmacopea Europea.

Resultados:

Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 4 y la Figura 6.

Tabla 4:

pH	7,00	6,50	6,00	5,50	5,00	4,50	4,00	3,50
volumen de aceite producido (ml)	0,20	0,30	0,50	0,70	0,83	1,15	0,97	0*
* (la muerte celular se produjo a un pH de 3,5)								

15 Discusión y Conclusión

Los datos muestran que al pH óptimo de 4,5 se libera más aceite y que por debajo de este pH no se obtiene el óptimo debido a la toxicidad ácida para el medio y la muerte celular asociada. Por encima del nivel de pH 4,5 no se ha conseguido una separación óptima debido a que la formación de la emulsión no es tan eficiente.

Ejemplo 4 (Ejemplo Comparativo)

20 Este ejemplo describe el efecto de la adición de lipasa a la producción de ácidos grasos en cultivo de tejidos.

Analizada por cromatografía de gases la distribución de aceites y ácidos grasos no glicerados en un extracto tomado de una suspensión de células "normales", es decir, el cultivo en suspensión como se describe en la sección 6.2 del Ejemplo 1, mostrado en la Figura 8.

25 La lipasa de germen de trigo se adquirió de Sigma Aldrich. Se añadió 1 g de lipasa a 100 ml del cultivo en suspensión como se describe en el apartado 6.2 del Ejemplo 1. El aceite resultante, recogido de la capa superior del cultivo usando una pipeta y analizado por cromatografía de gases, mostró descomposición, donde el 8 % del aceite eran ácidos grasos no glicerados cuando se compara con el producto de la suspensión celular normal.

Ejemplo 5

30 Este ejemplo describe el uso de un sistema de cultivo de dos células de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

Se preparó medio basal de Murashige y Skoog y se añadió ácido alfa naftalénico a una concentración de 0,01 M. El medio se inoculó con células que contenían cloroplastos de *Agrostis tenuis* y se incubó como un cultivo celular en suspensión durante 28 días en presencia de la luz y a 22 °C.

35 Después del período de incubación veintiocho días, se extrajeron los medios y se midió el aumento de la concentración de azúcar utilizando refractometría. La concentración del ion de azúcar en los medios era superior a 50 g/l. A continuación, estos medios se incubaron con las células productoras de aceite de colza y se incubaron durante otros veintiocho días, período después del cual se había formado una capa de aceite por encima de la capa de los medios.

40 Para escalar este procedimiento hasta niveles industriales, por ejemplo, para el crecimiento del cultivo celular en suspensión de células que contienen cloroplasto (es decir, fotosintéticas) en el medio de cultivo utilizando una corriente de aire de aproximadamente 3.660 litros por minuto para un tanque de 20.000 litros a una densidad de CO₂ de aproximadamente el 10 % con una eficiencia de absorción de aproximadamente el 40 %. A una escala más pequeña, por ejemplo, utilizando 3 litros de cultivo, se podría pasar 0,55 litros por minuto de una mezcla de CO₂ 10 %/aire a través de esta para tener el mismo rendimiento relativo.

45 Cuanto mejor sea la tasa de absorción de CO₂ en el cultivo fotosintético, más eficiente es el procedimiento. La

eficiencia de la absorción de CO₂ se correlaciona directamente con dos factores:

1. El tamaño de la burbuja: cuanto menor sea la burbuja, más eficiente será, idealmente las burbujas tendrán un diámetro medio promedio en el punto de introducción en el medio de cultivo de aproximadamente menos de 1 mm, tal como menos de 0,5 mm, 0,4 mm, 0,3 mm, 0,2 mm, 0,1 mm, 90 µm, 80 µm, 70 µm, 60 µm, 50 µm, 40 µm, 30 µm, 20 µm o 10 µm.

2. El tiempo en el que la burbuja permanece en el cultivo: cuanto más alta es la columna del cultivo, más tiempo tarda la burbuja en transitar el medio y, por lo tanto, más tiempo pasa en los medios. Generalmente, la altura de la columna es de hasta aproximadamente 0,5 metros, 1 metros, 2 metros, 3 metros, 4 metros o 5 metros de altura (en este contexto el término aproximadamente se utiliza para referirse a $\pm 0,5$, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 metros).

La tasa de absorción de CO₂ se puede evaluar comparando el contenido (densidad) de CO₂ del gas introducido en el cultivo con el contenido de CO₂ (densidad) de la corriente de escape.

Dado que la introducción de gases en un cultivo celular en suspensión puede causar enfriamiento por expansión adiabática, puede ser adecuado ajustar la temperatura del gas introducido (por ejemplo, haciendo pasar el tubo de alimentación a través de un baño de agua caliente), o permitir la expansión gaseosa, antes de su introducción en el cultivo, para minimizar o reducir el impacto en la temperatura de cultivo.

Ejemplo 6

El siguiente ejemplo describe un aparato para su uso en un sistema de cultivo de dos células de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

El modelo se basa en dos tanques de cultivo en suspensión de células vegetales fotosintéticas por tanque de cultivo en suspensión de células vegetales productoras de aceite. Con un número suficientemente grande de múltiples tanques de cada tipo de cultivo (por ejemplo, en una instalación de producción a escala completa) esto se puede compensar con el equivalente de aproximadamente 1,6 tanques de cultivos en suspensión de células vegetales fotosintéticas por tanque de cultivo en suspensión de células vegetales productoras de aceite.

Los tamaños de tanques contienen cada uno aproximadamente 20.000 litros de medios.

El tanque de cultivo en suspensión de células vegetales productoras de aceite produce ácidos grasos y aceites a una tasa de 10 % (volumen) cada 10 días, es decir, 1 % por día o 200 litros por día.

Cada litro de aceite requiere aproximadamente 1,6 kg de sacarosa (1.600 gramos) o azúcar equivalente.

El cultivo en suspensión de células vegetales fotosintéticas se puede cultivar para producir, y mantener, una concentración en el medio de cultivo de 50 gramos de sacarosa por litro de cultivo. El azúcar es generalmente aproximadamente el 58 % en masa de agua por lo que se necesita reponer 29 ml de agua cada día por litro de medio de cultivo en suspensión de células vegetales fotosintéticas.

La configuración de un aparato de ejemplo para su uso en este procedimiento se muestra en la Figura 7, en el que se utiliza el término "cloroplasto" para referirse a un tanque de cultivo en suspensión de células vegetales fotosintéticas y el término "vacuola" se utiliza para referirse a un tanque de cultivo en suspensión de células vegetales productoras de aceite.

Diariamente, la configuración ilustrada en la Figura 7 se puede llevar a cabo de la siguiente manera:

1. Bombear 6400 litros de medio filtrado del tanque Vacuola a la instalación de mezcla
2. Añadir 600 litros de agua purificada además de los constituyentes para 600 litros de medio ($60.000 \times (1/100)$ en los recipientes de mezcla y mezclar (60.000 litros de medio que corresponde al volumen total del medio)
3. Bombear 3500 litros de esta mezcla en cada recipiente de cloroplasto. Esto sustituye la cantidad de agua utilizada por el cloroplasto en un marco de tiempo de 24 horas. Los medios de cloroplasto deben estar ahora a la concentración correcta para sustituir los medios extraídos del tanque vacuola.
4. Bombear 3200 litros de cada tanque cloroplasto en el tanque de vacuola.

Este procedimiento operará en ciclos de 24 horas. Sin embargo, si se utiliza un sistema de impulsos cada hora, lo que debería mejorar la estabilidad de los cultivos, entonces, cada impulso sería $1/24^a$ de lo anterior, es decir, el procedimiento diario anterior de las etapas 1-4 podría ser operado más regularmente, por ejemplo cada hora y reducir en consecuencia los volúmenes.

Divulgación adicional: La presente solicitud también describe un procedimiento para la producción de aceites vegetales a partir de líneas celulares de cultivo de tejidos derivados de plantas. Los aceites vegetales producidos se pueden usar para la fabricación de biocombustibles. En este procedimiento se pueden usar enzimas para inhibir la gliceración de los ácidos grasos. Las células producidas durante la etapa de cultivo de tejidos de este procedimiento pueden fermentar para producir etanol y, opcionalmente, el etanol se puede usar como fuente de combustible. Los aceites vegetales producidos por el procedimiento pueden ser de una forma que es idéntica a los producidos por la planta de origen mediante procedimientos convencionales.

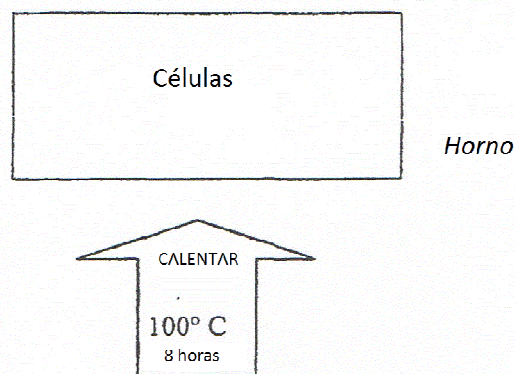
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de un producto biológico, comprendiendo el procedimiento
 - (i) mantener un primer cultivo celular en suspensión de células vegetales no algales fotosintéticas en condiciones que incluyen el suministro de luz y dióxido de carbono que permite que las células cultivadas realicen la fotosíntesis y de ese modo generar y liberar azúcares, normalmente monosacáridos y/o disacáridos (por ejemplo, glucosa, sacarosa, y/o fructosa), en el medio de cultivo circundante; y
 - (ii) mantener un segundo cultivo de células en presencia del azúcar generado por el primer cultivo celular en suspensión para permitir el crecimiento del segundo cultivo y la producción de un producto biológico.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células vegetales no algales fotosintéticas presentes en el primer cultivo celular en suspensión son células vegetales fotosintéticas diferenciadas, tal como una célula que está especializada en la fotosíntesis, por ejemplo una célula de la hoja o del tejido verde de una planta, incluyendo células en empalizada, células del mesodermo foliar o del peciolo, más preferentemente una célula en empalizada.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que las células vegetales no algales fotosintéticas presentes en el primer cultivo celular en suspensión se aíslan de una planta tolerante al cobre, tal como de *Agrostis tenuis*.
4. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que el primer cultivo celular en suspensión de células vegetales no algales fotosintéticas tiene un nivel medio de cobre en el cultivo de hasta 0,1 M, por ejemplo, mayor de 0,01 M, 0,1 M o 0,5 M.
5. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que las células del primer cultivo celular en suspensión y las células del segundo cultivo de células están en comunicación fluida entre sí, o cada una se cultiva en recipientes de cultivo separados que no están en comunicación fluida entre sí.
6. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que el segundo cultivo de células se mantiene en presencia del azúcar generado por el primer cultivo celular en suspensión a una concentración de azúcar en el intervalo de 20 g/l a 400 g/l, tal como hasta 300 g/l, 200 g/l, 100 g/l, preferentemente a la concentración de aproximadamente 50 g/l.
7. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que las células del segundo cultivo de células son procariotas o eucariotas, tales como células bacterianas, fúngicas, vegetales, animales o humanas, preferentemente microorganismos, tales como levaduras (por ejemplo, una especie de *Saccharomyces*).
8. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que el producto biológico se selecciona entre el grupo que consiste en (a) las células del segundo cultivo de células o (b) un producto biológico que es sintetizado por las células del segundo cultivo de células, tales como un producto biológico seleccionado del grupo que consiste en al menos un ácido graso y/o aceite, un producto proteico (incluidos los productos proteicos codificados de forma recombinante) y un metabolito, tal como etanol.
9. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, que comprende además la etapa de extraer el producto biológico del segundo cultivo celular, y opcionalmente además purificar y/o procesar el producto biológico así extraído.
10. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, que es un procedimiento para la producción de al menos un ácido graso y/o aceite a partir de un cultivo de células vegetales, comprendiendo el procedimiento el mantenimiento de un segundo cultivo celular en suspensión de células vegetales productoras de aceite en presencia del azúcar generado por el primer cultivo en suspensión de células y en condiciones tales que las células vegetales productoras de aceite cultivadas producen al menos un ácido graso y/o aceite.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, que comprende además la etapa de extraer el al menos un ácido graso y/o un aceite del segundo cultivo celular en suspensión de células vegetales productoras de aceite y opcionalmente además su procesamiento para convertirlo en un biocombustible, o además opcionalmente para purificarlo y/o utilizarlo en un procedimiento posterior, tales como por incorporación en un producto alimenticio, cosmético o lubricante.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que las etapas, tal como se definen en la reivindicación 10 de mantener el segundo cultivo celular en suspensión de células vegetales productoras de aceite en presencia del azúcar generado por el primer cultivo celular en suspensión y en condiciones tales que las células vegetales productoras de aceite cultivadas producen al menos un ácido graso y/o aceite, y extraer el al menos un ácido graso y/o aceite del segundo cultivo celular en suspensión de células vegetales productoras de aceite como se define en la reivindicación 11, se llevan a cabo por un procedimiento que comprende:
 - (i) mantener el segundo cultivo celular en suspensión de células vegetales productoras de aceite a un pH de 7,0 o menos, de tal manera que las células cultivadas sintetizan y secretan al menos un ácido graso y/o un aceite en el medio del cultivo celular en suspensión y

(ii) extraer el al menos un ácido graso y/o un aceite así secretados del segundo medio del cultivo celular en suspensión y, opcionalmente, procesarlo para convertirlo en un biocombustible, u, opcionalmente, purificarlo aún más y/o utilizarlo en un procedimiento posterior, tal como por incorporación en un producto alimenticio, cosmético o lubricante.

- 5 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el pH al que se mantiene el medio del cultivo celular en suspensión del segundo cultivo celular en suspensión de células vegetales productoras de aceite es un pH de 4,5 a 6,5, más preferentemente un pH de 4,5 a 5,5 y la secreción de el al menos un ácido graso y/o un aceite de las células cultivadas en el medio de cultivo de la suspensión celular circundante tiene como resultado la formación de un sistema bifásico en el que el al menos un ácido graso y/o aceite se acumulan en una capa separada del medio del cultivo celular en suspensión y la etapa de extraer el al menos un ácido graso y/o un aceite así secretados y/o aceite del medio del cultivo celular en suspensión comprende la extracción directa del al menos un ácido graso y/o un aceite de la capa que se forma dentro del sistema bifásico .
- 10 14. El procedimiento de la reivindicación 12 o 13, donde la célula vegetal productora de aceite es de una planta productora de aceite, tales como una planta seleccionada del grupo que consiste de *Triticum*, *Brassica*, *Zea*, *Rhus*, *Olea* y *Glycine*.
- 15 15. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que al primer cultivo celular en suspensión de células vegetales no algales fotosintéticas se añade dióxido de carbono procedente de una fuente de dióxido de carbono seleccionada de dióxido de carbono líquido o dióxido de carbono gaseoso obtenidos como un subproducto de un procedimiento de producción de dióxido de carbono.
- 20 16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que el primer cultivo celular en suspensión y opcionalmente, también el segundo cultivo de células, es o se mantienen en el sitio del procedimiento de producción de dióxido de carbono.
- 25 17. Un sistema de dos cultivos para la producción de un producto biológico, que comprende un primer cultivo en suspensión de células vegetales no algales y un segundo cultivo de células, cada uno como se define en cualquier reivindicación anterior.
- 30 18. Un sistema de captura de dióxido de carbono, que comprende al menos el primer cultivo en suspensión de células vegetales no algales como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, y el segundo cultivo de células como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
- 35 19. El sistema de captura de dióxido de carbono de la reivindicación 18, que comprende además una fuente generadora de dióxido de carbono que genera y alimenta dióxido de carbono en el primer cultivo en suspensión de células vegetales.
- 40 20. El uso del sistema de dos cultivos de la reivindicación 17, o del sistema de captura de dióxido de carbono de la reivindicación 18 o 19, para capturar dióxido de carbono.
21. El uso de la reivindicación 20, en el que el dióxido de carbono que se captura es el subproducto de un procedimiento de producción de dióxido de carbono, tal como un procedimiento seleccionado de un procedimiento de generación de energía que utiliza combustibles de carbono, o un procedimiento de producción de biocombustible por microorganismos que libera dióxido de carbono.
22. Una instalación de generación de energía productora de dióxido de carbono o una instalación de generación de biocombustible productor de dióxido de carbono (como bioetanol u otro alcohol) que comprende el sistema de dos cultivos de la reivindicación 17, o el sistema de captura de dióxido de carbono de la reivindicación 18 o 19.

Fig. 1



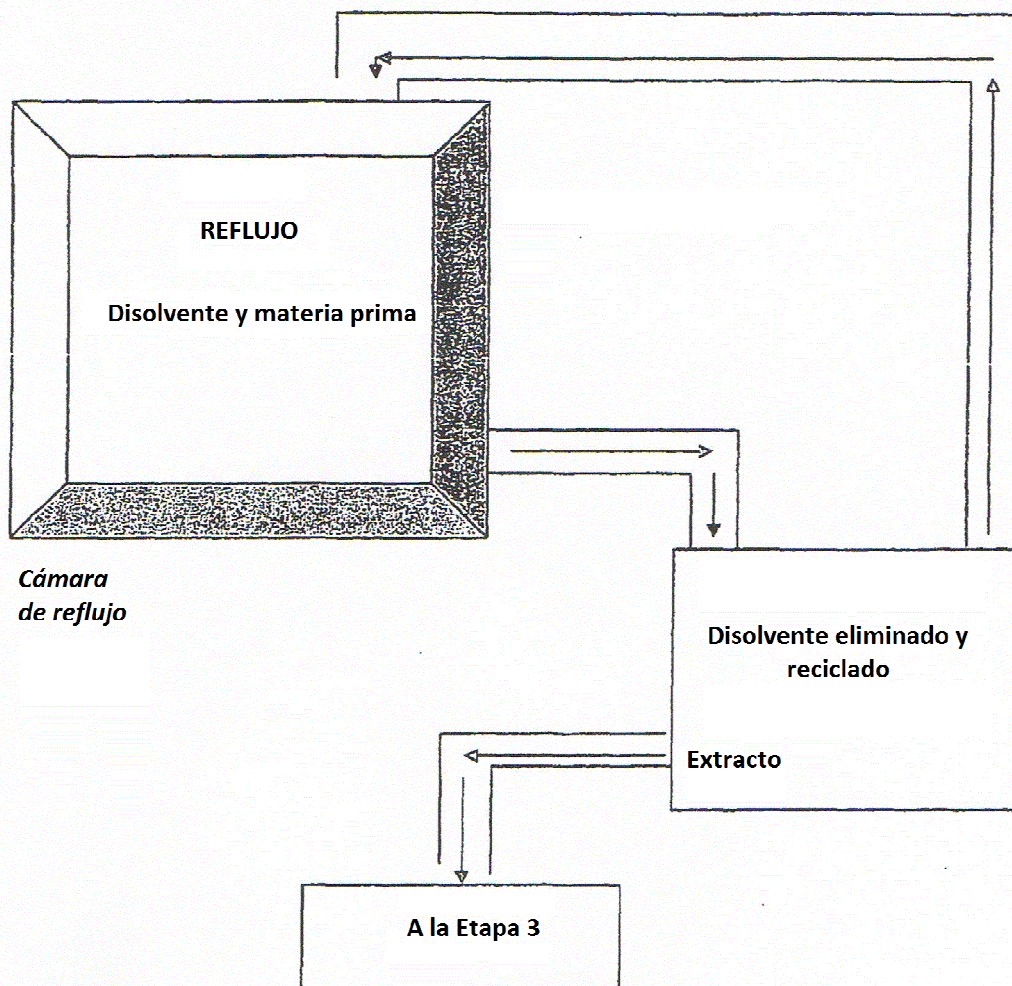


Fig. 2

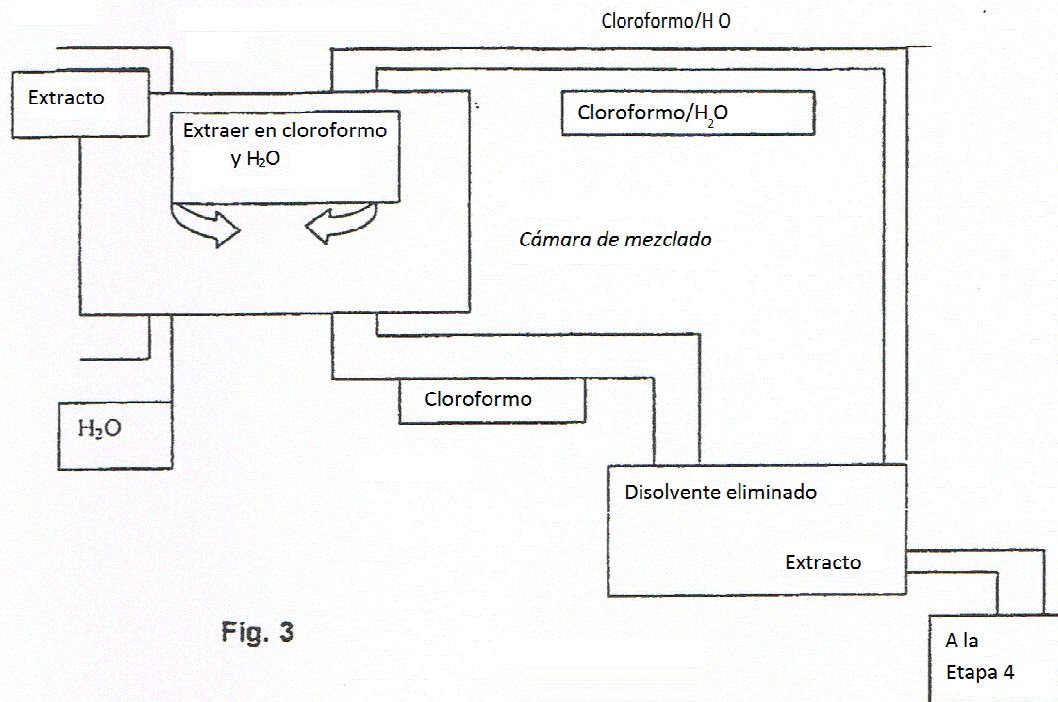


Fig. 3

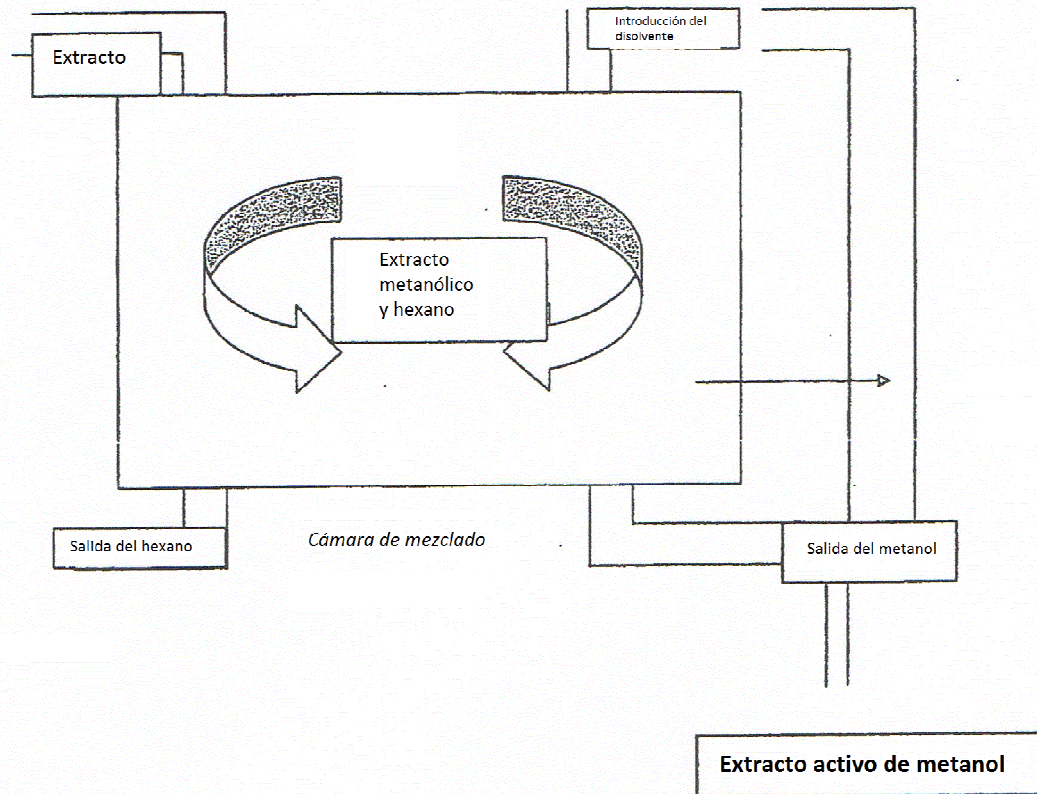


Fig. 4

Fig. 5A

Tabla 1: CG aceite método 4		Muestra N°						
Compuesto	1	2	3	4	5	6	7	
	%	%	%	%	%	%	%	
1-metoxi-3-(2-trimetilsililoxietil)nonano	2,24							
Adamantano-1-carboxamida, N-(2,4-dimetilfenil)-	8,91							
Ácido butanoico, 2-[(trimetilsilil)amino]-trimetilsililéster	12,41							
Ácido propanodioico, [(trimetilsilil)-bis-(trimetilsililéster)]	15,17							
Ácido 3-metoxibencilfórmico, trimetilsilililéster	13,65							
4-metoxiandrosta-4-eno-3,17-diol, diacetato	5,83							
p-ciclopentanodienil-dicarbonil-etilisonitril-triclorgermil-tungsteno	5,64							
Ácido pentanoico, 2-[(terc-butild...	2,62							
Ácido acético, 2-[2,3-dihidro-4-(...	4,15							
Ácido malónico, 2-(2,3-dihidroben...	9,64							
benzamida, N-[1-(2,2-bis-tri...	10,78							
1,4-ciclohexadiano, 1,3,6-tris(...	3,44							
Ácido pentadecanoico, 14-metil, éster metílico (C15)				0,21	0,21			
Ácido hexadecanoico, éster metílico (C16)				0,11	0,22	0,22		
Ácido 9-octadecenoico (Z)- éster metílico (C18)		76,52	78,17	84,59	77,07	73,59	61,93	
Ácido 9-octadecenoico, éster metílico (C18)					23,21			
Ácido 6-octadecenoico, éster metílico (C18)		14,16	6,74					

Fig. 5B

CG aceite método 4	Muestra N°						
	1	2	3	4	5	6	7
Compuesto	%	%	%	%	%	%	%
Ácido 11-octadecenoico, éster metílico (C18)		5,82			6,8		
Ácido 8-octadecenoico, éster metílico (C18)			13,09		13,85		
Ácido 11-eicosanoico, éster metílico (C20)				0,35			
Ácido eicosanoico, éster metílico (C20)		0,02	0,16	0,2		0,22	
Ácido docasanoico, éster metílico (C22)		0,13	0,39	0,65		0,21	
9,12,15-octadecatrien-1-ol (C18)				12,44			
1,5-Ciclooctadieno (EZ) (C8)							35,14
Total ésteres metílicos	0	96,65	98,55	98,55	97,94	97,45	
Total constituyentes	94,48	96,65	98,55	98,55	97,94	97,45	97,07
% Ésteres metílicos	0	100	100	100	100	100	

Tabla 1. Resultados de la CG de la transesterificación del aceite y reacción de Fenton

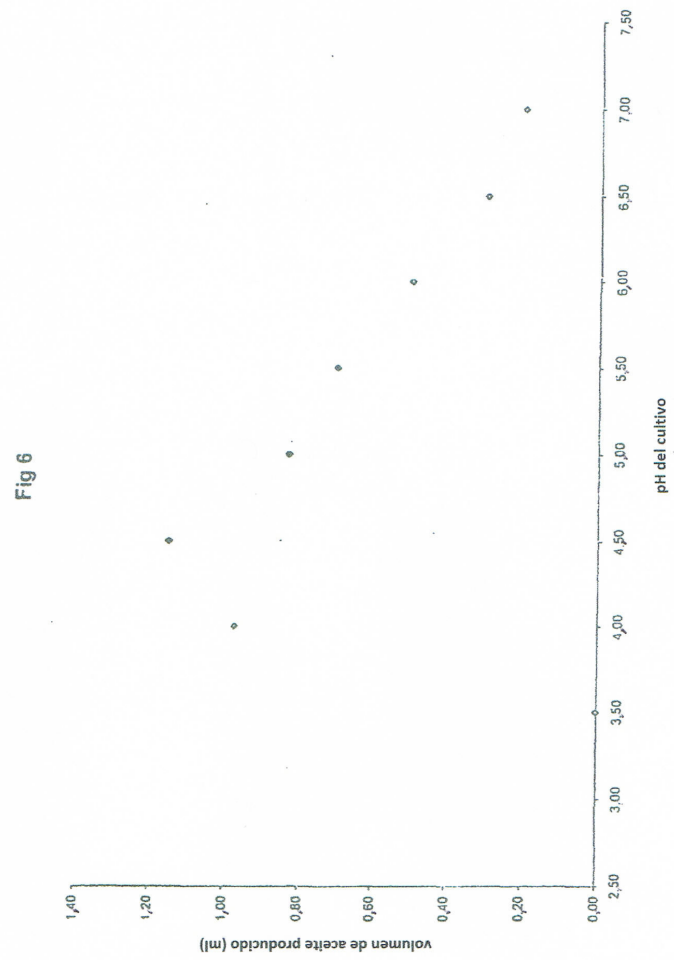


Fig. 7

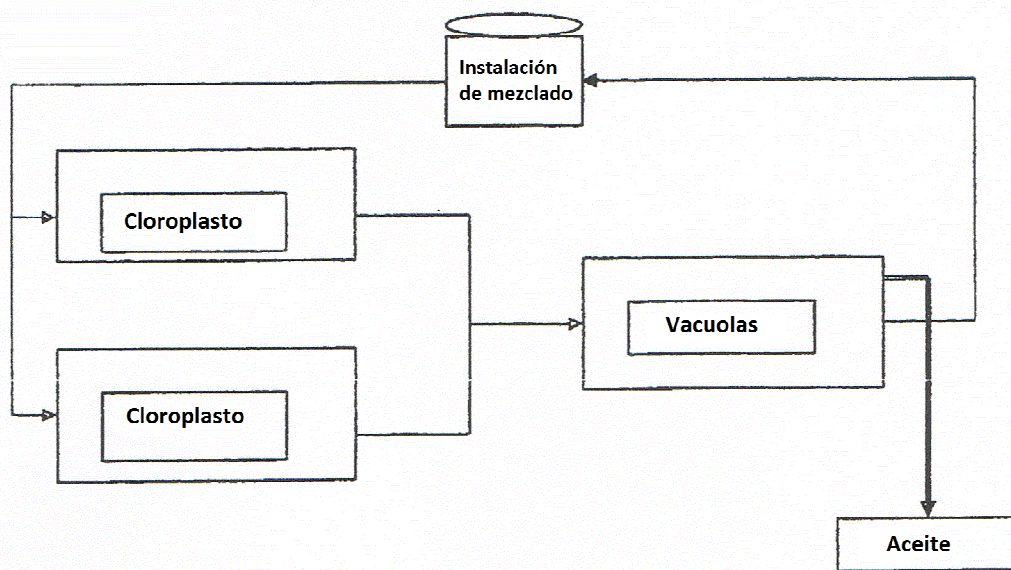


Fig 8

