

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 482 592**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/12** (2006.01)  
**C11C 3/00** (2006.01)  
**C12P 5/02** (2006.01)  
**C12P 7/64** (2006.01)  
**C12R 1/89** (2006.01)  
**C11B 1/10** (2006.01)  
**C12P 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2010 E 10761319 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2418270**

54 Título: **Microalga perteneciente al género Navicula, proceso para la producción de aceite mediante el cultivo de la microalga y aceite recogido a partir de la microalga**

30 Prioridad:

**10.04.2009 JP 2009096362**

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

**04.08.2014**

73 Titular/es:

**ELECTRIC POWER DEVELOPMENT CO., LTD.  
(100.0%)  
15-1 Ginza 6-chome  
Chuo-ku, Tokyo 104-8165, JP**

72 Inventor/es:

**MATSUMOTO, MITSUFUMI**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

ES 2 482 592 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

Microalga perteneciente al género *Navicula*, proceso para la producción de aceite mediante el cultivo de la microalga y aceite recogido a partir de la microalga

5

## CAMPO TÉCNICO

**[0001]** La presente invención se refiere a: la microalga depositada con el número de registro FERM BP-11201 perteneciente al género *Navicula* y a un proceso para la producción de aceite, que comprende una etapa de cultivo de dicha microalga. Más específicamente, la presente invención se refiere a: la microalga depositada con el número de registro FERM BP-11201 perteneciente al género *Navicula*, que es capaz de producir hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono; a un proceso para la producción de aceite, que comprende una etapa de cultivo de dicha microalga; a una biomasa de algas seca producida mediante el secado de dicha microalga; y a un procedimiento para la fijación de dióxido de carbono, que comprende una etapa de cultivo de dicha microalga.

10

15

## ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

**[0002]** Se ha informado de varios procedimientos para la producción de hidrocarburos pesados basados en aceite o ligeros basados en aceite, los denominados biocombustibles, a través del cultivo de microalgas.

20

**[0003]** Con respecto a las algas capaces de producir hidrocarburos pesados basados en aceite se ha conocido: una microalga, *Botryococcus braunii*, que es capaz de producir un hidrocarburo de 36 átomos de carbono (cotéjese el Documento no Patente 1); y una microalga, *Botryococcus braunii* de raza A, que es capaz de producir un hidrocarburo de 33 átomos de carbono (cotéjese el Documento Patente 1).

25

**[0004]** Además, con respecto a las algas capaces de producir hidrocarburos ligeros basados en aceite, se han conocido: microalgas, *Nostoc muscorum*, *Trichodesmium erythraeum*, *Plectonema terebrans*, y similares, que son capaces de producir un hidrocarburo de 17 átomos de carbono (cotéjese el Documento no Patente 1); una microalga, *Coccochloris elabens*, y similares, que son capaces de producir un hidrocarburo de 19 átomos de carbono (cotéjese el Documento no Patente 1); una microalga, *Pseudochoricystis ellipsoidea* cepa MBIC11204, que es capaz de producir hidrocarburos de 17, 18, 19 y 20 átomos de carbono (cotéjese el Documento Patente 2); y una microalga, *Choricystis minor* cepa SAG17.98, que es capaz de producir hidrocarburos de 17, 19, 21 y 23 átomos de carbono (cotéjese el Documento Patente 2).

30

35

**[0005]** Los hidrocarburos ligeros basados en aceite que pueden ser producidos por las microalgas son industrialmente útiles como combustible diésel, y también se muestran prometedores como un combustible de carbono neutro destinado a la prevención del calentamiento global.

40

**[0006]** Sin embargo, el contenido porcentual en hidrocarburos ligeros basados en aceite en la biomasa de algas seca producida mediante el secado de las microalgas es habitualmente de aproximadamente entre el 0,025 y el 0,12 % en masa (cotéjese el Documento no Patente 1), lo que significa que la productividad del hidrocarburo de las mismas no siempre es suficiente.

45

## Referencias

[Documento Patente]

**[0007]**

50 Documento Patente 1: Solicitud de Patente Japonesa no Examinada, Primera Publicación N° H09-234055  
Documento Patente 2: Publicación Internacional PCT N° WO 2006/109588, Folleto

[Documento no Patente]

55

**[0008]** Documento no Patente 1: R. Raja, S. Hemaiswarya, N. Ashok Kumar, S. Sridhar y R. Rengasamy (2008), A Perspective on the Biotechnological Potential of Microalgae. *Critical Reviews in Microbiology*, 34: 77 - 88.

## DESVELACIÓN DE LA INVENCION

60

**[0009]** La presente invención se completó teniendo en consideración la situación mencionada anteriormente. Es un objeto proporcionar: una microalga altamente capaz de producir hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono; un proceso para la producción de aceite, que comprende una etapa de cultivo de la microalga; el aceite recogido partir de la microalga; una biomasa de algas seca producida mediante el secado de la microalga; un combustible producido a partir de la microalga; y un procedimiento para la fijación de dióxido de carbono, que

comprende una etapa de cultivo de la microalga.

**[0010]** Con el fin de conseguir el objeto mencionado anteriormente, la presente invención adopta las siguientes constituciones.

- (1) Una microalga, la cepa FERM BP-11201 (JPCC DA0580) de *Navicula oiliticus*.
- (2) Un proceso para la producción de aceite, que comprende: una etapa de cultivo de la microalga de acuerdo con (1).
- (3) Un proceso para la producción de aceite de acuerdo con (2) mencionado anteriormente, que comprende adicionalmente, después de la etapa de cultivo: una etapa de cultivo adicional de la microalga con un medio diferente con una(s) menor(es) concentración(es) de sale(s) nutriente(s) en comparación con el medio que se ha usado para el cultivo anterior.
- (4) Un proceso para la producción de aceite de acuerdo con alguno de (2) y (3) mencionados anteriormente, en el que el aceite incluye un lípido neutro.
- (5) Un proceso para la producción de aceite de acuerdo con uno cualquiera de (2) a (4) mencionados anteriormente, el que el aceite incluye escualeno.
- (6) Un proceso para la producción de aceite de acuerdo con uno cualquiera de (2) a (5) mencionados anteriormente, que comprende adicionalmente, después de la etapa de cultivo: una etapa de extracción del aceite a partir del producto del cultivo mediante el uso de un disolvente orgánico, siendo el disolvente orgánico uno cualquiera de los disolventes elegidos de entre un disolvente que comprende n-hexano, un disolvente que comprende n-hexano y metanol, y un disolvente que comprende n-hexano y etanol.
- (7) Una biomasa de algas seca producida mediante el secado de la microalga de acuerdo con (1) mencionado anteriormente.
- (12) Un procedimiento para la fijación de dióxido de carbono, que comprende: una etapa de cultivo de la microalga de acuerdo con (1) mencionado anteriormente.

**[0011]** Nótese que, en la descripción de esta solicitud, la frase "capaz de producir hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono" significa que tiene la capacidad de producir hidrocarburos alifáticos principalmente de 16, 18, 20, 22, 24 y 26 átomos de carbono. Además, el término "aceite" se refiere a un componente líquido que consiste principalmente en compuestos orgánicos hidrófobos. Los compuestos orgánicos hidrófobos pueden ser ejemplificados mediante los hidrocarburos alifáticos, los lípidos neutros, y similares.

**[0012]** La presente invención es capaz de proporcionar; la microalga depositada con el número de registro FERM-BP-11201 altamente capaz de producir hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono; un proceso para la producción de aceite, que comprende una etapa de cultivo de dicha microalga; el aceite recogido a partir de dicha microalga; una biomasa de algas seca producida mediante el secado de dicha microalga; un combustible producido a partir de dicha microalga; y un procedimiento para la fijación de dióxido de carbono, que comprende una etapa de cultivo de dicha microalga.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

##### **[0013]**

La FIG. 1 muestra un árbol filogenético molecular elaborado mediante el uso de la secuencia de nucleótidos del ADNr 18S de la cepa JPCC DA0580.

La FIG. 2 muestra las curvas de crecimiento de la cepa JPCC DA0580.

La FIG. 3 muestra las curvas de crecimiento de la cepa JPCC DA0580 cuando se cultiva con variaciones en la concentración de los componentes del agua marina.

La FIG. 4 muestra imágenes de microscopía electrónica de la cepa JPCC DA0580 de *Navicula oiliticus* (FERM BP-11201) (a la izquierda: aumento de 310.000, a la derecha: aumento de 315.000).

La FIG. 5 muestra una imagen de microscopía de fluorescencia de la cepa JPCC DA0580 de *Navicula oiliticus* (FERM BP-11201) teñida con rojo del Nilo (áreas brillantes con emisión fluorescente: el aceite de la biomasa de algas y suavizado con rojo del Nilo, áreas tenues: pigmentos fotosintéticos y similares visualizados mediante autofluorescencia).

#### MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

**[0014]** En lo sucesivo hay una explicación detallada de la presente invención.

< Microalgas pertenecientes al género *Navicula* >

**[0015]** Las microalgas pertenecientes al género *Navicula* de la presente invención son capaces de producir hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono. Aquí, el término "hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono" se refiere a hidrocarburos alifáticos principalmente de 16, 18, 20, 22, 24 y 26 átomos de

carbono.

**[0016]** Como la microalga mencionada anteriormente, se prefiere particularmente una microalga, *Navicula oilliticus*, debido a que tiene un elevado contenido porcentual en hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono en la biomasa de algas, y también puede ser fácilmente cultivada. En la invención se usa la cepa JPCC DA0580 de *Navicula oilliticus* (FERM BP-11201) (en lo sucesivo, abreviada como "cepa JPCC DA0580") debido a su elevada capacidad de producción de lípidos neutros y de escualeno, así como por ser capaz de producir hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono como se ha mencionado anteriormente. Los lípidos neutros se explicarán posteriormente.

**[0017]** La cepa JPCC DA0580 es una nueva cepa de una nueva especie de microalga marina perteneciente a la división *Chromophyta*, clase *Bacillariophyceae*, orden *Pennales*, suborden *Raphidineae*, familia *Naviculaceae*, aislada a partir de agua marina en un área de aguas salobres por el inventor de la presente invención.

**[0018]** En lo sucesivo hay una explicación del procedimiento para el aislamiento de la microalga y la situación concerniente a cómo se determinó que la cepa de microalga JPCC DA0580 era una nueva cepa de una nueva especie.

(Método de preparación del medio)

**[0019]** Se preparó un medio líquido en el que se habían disuelto a las concentraciones predeterminadas en agua destilada 75,0 mg/l de nitrato de sodio, 5,0 mg/l de hidrogenofosfato disódico, 30,0 mg/l metasilicato de sodio nonahidratado, 1,0 ml de una disolución f/2 de metales traza, 0,5 ml de una disolución f/2 de vitaminas y 37 g/l de agua marina artificial (nombre del producto: Marine Art SF-1, elaborado por Senju Pharmaceutical Co., Ltd.) como un medio f/2.

**[0020]** La disolución f/2 de metales traza se preparó como una disolución acuosa con la siguiente composición: 4,36 g/l de Na<sub>2</sub> EDTA dihidratado, 3,15 g/l de cloruro férrico hexahidratado, 180 mg/l de cloruro de manganeso (II) tetrahidratado, 22,0 mg/l de sulfato de cinc heptahidratado, 10,0 mg/l de cloruro de cobalto (II) hexahidratado, 6,3 mg/l de molibdato de sodio (VI) dihidratado y 9,8 mg/l de sulfato de cobre (II) pentahidratado.

**[0021]** La disolución f/2 de vitaminas se preparó como una disolución acuosa con la siguiente composición: 200,0 mg/l de tiamina, 0,1 mg/l de biotina y 1,0 mg/l de vitamina B<sub>12</sub>.

**[0022]** Además se preparó medio agar f/2 mediante la adición de agar a la composición del medio f/2 a una concentración del 1,2 % (p/v).

**[0023]** El agua marina artificial es una mezcla de sales que simula las sales contenidas en el agua marina natural. Puede producirse una disolución acuosa con un componente de agua marina que simule el agua marina natural mediante la disolución de una cantidad predeterminada (37 g/l) del agua marina artificial en agua destilada.

(Método de aislamiento)

**[0024]** En una placa de microtitulación de 24 pocillos que contiene 2 ml del medio f/2 se añadió una cantidad apropiada de una muestra de cieno recogida en un manglar en la unión del río Sumiyo con el río Yakugachi, Amami-shi, Kagoshima Prefecture, Japón, en julio de 2005. Después la placa se sometió a un cultivo estático bajo una iluminación de 1.000 lux (lx), y se recogió una parte de la disolución de cultivo del pocillo en la que se observó el crecimiento de una microalga. La disolución del cultivo así recogida fue inoculada en el medio de agar f/2, y se incubó con las mismas condiciones de iluminación. Al hacerlo se obtuvo la cepa del alga unicelular JPCC DA0580 en forma de colonias pardas unialgales (aisladas).

(Características morfológicas)

**[0025]** Como resultado de los siete días de cultivo a 25 °C en el medio de agar, se obtuvieron colonias pardas de la cepa JPCC DA0580 con unos diámetros de desde aproximadamente 2,0 hasta 5,0 mm. Estas colonias eran puntiformes y semilenticulares sin elevación. La periferia era completa, y la superficie era lisa. Además, no se encontró ninguna alteración morfológica de la colonia debida a mutaciones, ni ninguna alteración morfológica de la colonia debida a las condiciones de cultivo o a las condiciones fisiológicas.

**[0026]** La microalga marina era unicelular en las colonias, con un tamaño medio de entre aproximadamente 10 y 20 µm, y a veces formaba grupos de colonias. La célula vegetativa tenía forma de célula romboide sin instilaciones ni vacuolas contráctiles. No se encontraron propiedades planctónicas. La lórica era vítrea con un rafe, y la superficie celular era lisa. La célula vegetativa no era flagelada ni tenía motilidad.

**[0027]** Se muestran imágenes de microscopía electrónica de la cepa JPCC DA0580 en la FIG. 4.

(Comportamiento reproductor)

5 **[0028]** La cepa JPCC DA0580 se reproduce tanto sexualmente como asexualmente. En la reproducción asexual, la proliferación tiene lugar asexualmente a través de una división binaria. La división celular se produce dentro de la lórica. Dos células hijas forman respectivamente nuevas semi-lóricas dentro de la cubierta externa y de la cubierta interna de la célula parental. Las semi-lóricas de la célula parental son ubicadas respectivamente en las células hija una por una. Como resultado, una de las células hija tiene el mismo tamaño (de la lórica) que el de la célula parental, mientras que la otra usa la cubierta interna de la célula parental como su cubierta externa. Como resultado, la otra célula hija es de un tamaño menor que la célula parental. Cuando su tamaño se hace pequeño hasta un cierto punto, tiene lugar la reproducción sexual. Esta célula experimenta una división meiótica para crear homogametos. Los cigotos resultantes se aproximan entre sí a través de sus lóricas y se unen alterando sus protoplastos en formas de ameba. Al hacerlo se produce una auxospora. Esta crece hasta expandir su volumen de nuevo hasta un tamaño razonable como una célula normal. Dicho comportamiento reproductivo es adoptado.

(Propiedades fisiológicas / bioquímicas)

**[0029]**

20

- Disolución de cultivo: crece en una disolución de cultivo basada en agua marina. No puede crecer en agua dulce.
- Fotosíntesis: es capaz de crecer fotoautotróficamente a través de la fotosíntesis. No se observa crecimiento heterótrofo.
- 25 • Pigmentos contenidos: clorofilas a, c1 y c2, y pigmentos carotenoides que consisten principalmente en fucoxantina y derivados de la fucoxantina
- Sustancia de reserva: almidón
- Temperatura de crecimiento: desde 20 °C hasta 35 °C (temperatura óptima: 25 °C)
- pH de crecimiento: entre pH 7,0 y 9,0 (pH óptimo: 8,0)
- 30 • Acumulación intracelular de abundante aceite que incluye hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono, lípidos neutros y escualeno, que pueden ser teñidos con rojo del Nilo.
- Periodo de crecimiento: una semana (el periodo de crecimiento significa un periodo de tiempo necesario para que la turbidez (DO750) alcance entre 0,05 y 1,2)

35 **[0030]** Como se muestra en la FIG. 5, la observación de la cepa JPCC DA0580 teñida con rojo del Nilo bajo el microscopio de fluorescencia confirma la presencia de aceite visualizado mediante rojo del Nilo, según indican las áreas con una brillante de emisión fluorescente dentro de la biomasa de algas en el campo visual de fluorescencia. El aceite puede estar acumulado intracelularmente en forma de gotitas de aceite en la biomasa de algas. Además, el aceite incluye hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono, lípidos neutros y escualeno.

40 **[0031]** A partir de los puntos mencionados anteriormente sobre las características morfológicas, el comportamiento reproductor y las propiedades fisiológicas / bioquímicas, se sugirió que la cepa JPCC DA0580 era una alga perteneciente a la división *Chromophyta*, clase *Bacillariophyceae*, orden *Pennales*, suborden *Raphidineae*, familia *Naviculaceae*. Además, se determinó la secuencia de nucleótidos de la región 18S del ADN mediante la realización de una extracción del ADN a partir de la cepa JPCC DA0580, una amplificación mediante PCR de la región 18S del ADN de la misma y el subsiguiente análisis de la secuencia con el uso de un kit de extracción de ADN (nombre del producto: QIAamp ADN Blood Mini Kit 50, elaborado por QIAGEN) de acuerdo con un procedimiento conocido convencionalmente. La secuencia de nucleótidos del ADN 18S así obtenida se muestra en la ID. SEC. Nº: 1 de la lista de secuencias. La secuencia de nucleótidos del ADN 18S obtenida se sometió después a una búsqueda de homologías (búsqueda Blast) mediante comprobaciones cruzadas con las bases de datos públicas, el DNA Data Bank de Japón (DDBJ) y un análisis filogenético mediante el uso del programa informático de alineación Clustal W y el programa informático Treeview display. El diagrama filogenético resultante se muestra en la FIG. 1.

55 **[0032]** La cepa aislada JPCC DA0580 se clasificó en la familia *Naviculaceae* en el árbol filogenético mencionado anteriormente, y formaba un racimo con diatomeas pertenecientes al género *Navicula*. Sin embargo, dado que se confirmó una rama que se separaba de las especies conocidas identificadas genéticamente del género *Navicula*, se determinó que la cepa JPCC DA0580 aislada por el inventor de la presente invención era una nueva especie de alga del género *Navicula*. Por lo tanto, a la cepa se le dio el nombre de cepa JPCC DA0580 de *Navicula oilliticus*.

60 **[0033]** La cepa JPCC DA0580 fue depositada en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken #305-8566, Japón) el 16 de marzo de 2009 con el número de registro FERM BP-11201 (transferida desde el número

de registro nacional FERM P-21788 depositado el 16 de marzo de 2009).

**[0034]** La cepa JPCC DA0580 es capaz de acumular un aceite que incluye hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono, lípidos neutros y escualeno, en la biomasa de algas. Adicionalmente, el contenido porcentual de los hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono en la biomasa de algas seca de la cepa JPCC DA0580 puede alcanzar el 0,2 % en masa o más. Además, el contenido porcentual de los lípidos neutros en la biomasa de algas seca de la cepa JPCC DA0580 puede alcanzar el 36 % en masa o más. Además, el contenido porcentual de escualeno en la biomasa de algas seca de la cepa JPCC DA0580 puede alcanzar el 0,3 % en masa o más.

**[0035]** Además, el aceite no sólo incluye los hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono, los lípidos neutros y el escualeno, sino que también puede contener hidrocarburos alifáticos de 27 o más átomos de carbono, fosfolípidos, ácidos grasos libres, compuestos esteroideos, pigmentos fotosintéticos tales como carotenoides incluyendo fucoxantina y derivados de la fucoxantina, y similares.

**[0036]** El término "hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono" se refiere a hidrocarburos alifáticos principalmente de 16, 18, 20, 22, 24 y 26 átomos de carbono, y con más detalle, hidrocarburos alifáticos lineales saturados principalmente de 16, 18, 20, 22, 24 y 26 átomos de carbono.

**[0037]** Como se explicará posteriormente, el término "lípidos neutros" se refiere a lípidos neutros que tienen principalmente un grupo tetradecanoilo (grupo miristoilo), un grupo hexadecanoilo (grupo palmitoilo), un grupo hexadecenoilo (grupo palmitoleoilo), un grupo octadecenoilo (grupo oleoilo) y un grupo eicosapentaenoilo, como grupos acilo, la mayoría de los cuales son triglicéridos con estos grupos acilo.

**[0038]** El término "escualeno" se refiere al 2,6,10,15,19,23-hexametiltriacosa-2,6,10,14,18,22-hexaeno.

**[0039]** El término "hidrocarburos alifáticos de 27 o más átomos de carbono" se refiere a hidrocarburos alifáticos distintos al escualeno.

**[0040]** Si se usa n-hexano como disolvente para extraer el aceite de la cepa JPCC DA0580, habitualmente los tipos de lípidos neutros mencionados anteriormente, tales como los triglicéridos, suponen aproximadamente el 80 % en masa del aceite extraído, lo que significa que estos lípidos neutros pueden alcanzar el 36 % en masa o más de la biomasa de algas seca de la cepa JPCC DA0580. Nótese que estos valores están calculados basándose en la asunción de que los anteriormente mencionados tipos de triglicéridos son triglicéridos del ácido oleico.

**[0041]** Además, las cantidades de los hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono, y de escualeno, contenidas en el aceite extraído, pueden alcanzar respectivamente el 0,2 % en masa o más, y el 0,3 % en masa o más, de la biomasa de algas seca de la cepa JPCC DA0580.

**[0042]** Nótese que la composición del aceite extraído muestra los valores habituales obtenidos mediante el cultivo de la cepa JPCC DA0580 con el medio f/2 de acuerdo con el procedimiento de cultivo en aireación que se explicará posteriormente. Si se modifica el procedimiento de cultivo de la microalga, la composición del aceite extraído puede ser diferente.

**[0043]** La mayoría de los ácidos grasos que constituyen los anteriormente mencionados tipos de lípidos neutros, tales como los triglicéridos, son ácido tetradecanoico (ácido mirístico con 14 átomos de carbono sin ningún doble enlace), ácido hexadecanoico (ácido palmítico con 16 átomos de carbono sin ningún doble enlace), ácido hexadecenoico (ácido palmitoleico con 16 átomos de carbono con un doble enlace), ácido octadecenoico (ácido oleico con 18 átomos de carbono con un doble enlace) y ácido eicosapentaenoico (EPA con 20 átomos de carbono con cinco dobles enlaces). Los contenidos de éstos ácidos grasos que constituyen los anteriormente mencionados tipos de lípidos neutros, tales como los triglicéridos, en la biomasa de algas seca de la cepa JPCC DA0580 son, en el orden de los ácidos grasos según se indica, de aproximadamente el 1,0 % en masa, de aproximadamente el 12,7 % en masa, de aproximadamente el 17,0 % en masa, de aproximadamente el 0,8 % en masa, y de aproximadamente el 1,4 % en masa. En otras palabras, los ácidos grasos que constituyen los anteriormente mencionados tipos de lípidos neutros, tales como los triglicéridos, suponen aproximadamente el 32,9 % en masa de la biomasa de algas seca. Nótese que los contenidos porcentuales de los ácidos grasos que constituyen los anteriormente mencionados tipos de lípidos neutros, tales como los triglicéridos, en la biomasa de algas seca significan las proporciones en masa de los ésteres de metilo de los ácidos grasos, que son los productos de la metil esterificación de estos ácidos grasos, en la biomasa de algas seca.

< Proceso para la producción de aceite >

**[0044]** El proceso para la producción de aceite de la presente invención comprende una etapa de cultivo de la anteriormente mencionada microalga depositada con el número de registro FERM BP-11201 perteneciente al género

*Navicula* de acuerdo con la presente invención. El aceite puede ser producido mediante el cultivo de la microalga de acuerdo con la presente invención, la recuperación de la microalga crecida mediante la etapa de cultivo a partir del medio y la recolección del aceite contenido en la microalga así obtenida.

5 **[0045]** Como la microalga perteneciente al género *Navicula* se usa la cepa JPCC DA0580 de *Navicula oiliticus*, porque tiene un elevado contenido porcentual en hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono en la biomasa de algas, y también puede ser cultivada con facilidad.

10 **[0046]** La cepa JPCC DA0580 usada como la microalga de la presente invención es altamente capaz de producir lípidos neutros y escualeno, así como también es capaz de producir hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono.

15 **[0047]** Con respecto a la etapa de cultivo de la microalga, es posible aplicar un procedimiento conocido capaz de cultivar microalgas pertenecientes al género *Navicula*. Por ejemplo, esta etapa puede conseguirse mediante la inoculación de la microalga en un medio líquido en un recipiente de cultivo tal como un matraz plano, y someterlo a un cultivo en aireación bajo iluminación con agitación suave hasta un grado suficiente para evitar la sedimentación de la biomasa de algas.

20 **[0048]** El medio líquido no está específicamente limitado siempre que el medio líquido sea capaz de cultivar la microalga, y es posible usar un medio conocido. Un ejemplo preferido del mismo puede ser proporcionado por el anteriormente mencionado medio f/2 que había sido usado para el aislamiento de la cepa JPCC DA0580, debido a que la microalga puede crecer bien en el mismo.

25 **[0049]** La concentración del agua marina artificial (nombre del producto: Marine Art SF-1, elaborado por Senju Pharmaceutical Co., Ltd.) en el medio líquido es preferiblemente de entre el 30 y el 100 % (p/v), más preferiblemente de entre el 50 y el 100 % (p/v), aún más preferiblemente de entre el 70 y el 100 % (p/v), particularmente preferiblemente de entre el 90 y el 100 (p/v), y lo más preferiblemente de entre el 95 y el 100 % (p/v), con la condición de que la dosis de 37 g/l se defina como el 100 % (p/v). Aquí, se considera que una disolución acuosa del agua marina artificial, producida mediante la disolución de la cantidad predeterminada (37 g/l) en agua destilada, tiene una concentración de sal sustancialmente equivalente a la del agua marina natural.

30 **[0050]** La condición de iluminación puede ajustarse apropiadamente dependiendo de la concentración de la biomasa de algas en la disolución de cultivo. Por ejemplo, preferiblemente es de 500 lx o mayor, más preferiblemente es de entre 1.000 y 30.000 lx, aún más preferiblemente es de entre 1.000 y 10.000 lx, particularmente es de entre 1.000 y 6.000 lx, y lo más preferiblemente es de entre 1.000 y 3.000 lx.

35 **[0051]** Con respecto al gas de aireación en el cultivo en aireación, es posible usar un gas de aireación conocido adecuado para el crecimiento de la microalga. Por ejemplo, es posible usar aire normal, aire con CO<sub>2</sub> añadido, y similares. De entre estos se prefiere aire con CO<sub>2</sub> añadido porque la microalga puede crecer mejor y puede acortarse el periodo de crecimiento.

40 **[0052]** La concentración de CO<sub>2</sub> en el aire con CO<sub>2</sub> añadido es preferiblemente de entre el 0,05 y el 10 % (v/v), más preferiblemente de entre el 0,05 y el 5,0 % (v/v), y lo más preferiblemente de entre el 1,0 y el 3,0 % (v/v).

45 **[0053]** Con respecto a la tasa de aireación en el cultivo en aireación, es posible aplicar una tasa de aireación conocida adecuada para el crecimiento de la microalga. Por ejemplo, preferiblemente es de entre 0,5 y 5 vvm, más preferiblemente es de entre 0,5 y 3,0 vvm, y aún más preferiblemente es de entre 0,5 y 2,0 vvm.

50 **[0054]** La temperatura de incubación en el cultivo en aireación puede ser una temperatura de incubación conocida adecuada para el crecimiento de la microalga. Habitualmente es preferible llevarlo a cabo a entre 20 y 35 °C, y más preferiblemente a entre 25 y 30 °C.

55 **[0055]** Con respecto al periodo del cultivo en aireación, es posible continuar el cultivo siempre que la microalga pueda crecer. Habitualmente es preferible llevarlo a cabo durante entre una y cuatro semanas, más preferiblemente durante entre una y tres semanas, y aún más preferiblemente durante entre una y dos semanas.

60 **[0056]** En el proceso para la producción de aceite de la presente invención, también es posible cultivar adicionalmente la microalga bajo una restricción de nutrientes, tras el periodo del cultivo en aireación. El contenido porcentual de aceite en la biomasa de algas (porcentaje en peso de aceite en la biomasa de algas seca) puede ser aumentado mediante el cultivo bajo dicha restricción de nutrientes. Consecuentemente, es posible aumentar el contenido porcentual de aceite en la biomasa de algas haciendo crecer la microalga en un medio sin restricción de nutrientes (medio nutriente) durante el periodo del cultivo en aireación, y completar el cultivo hasta una cantidad predeterminada cambiándolo por un cultivo con restricción de nutrientes. Al hacerlo puede mejorarse la producción de aceite.

- 5 **[0057]** Aquí, el anteriormente mencionado término "cultivo con restricción de nutrientes" se refiere a un cultivo con un medio que tiene unas cantidades menores de lo habitual de sales nutrientes que incluyen vitaminas (medio con restricción de nutrientes). Por ejemplo, asumiendo que el contenido de las sales nutrientes que incluyen vitaminas (nitrato de sodio, hidrogenofosfato disódico, metasilicato de sodio, la disolución f/2 de metales traza y la disolución f/2 de vitaminas) en el anteriormente mencionado medio f/2 (medio líquido nutriente) que se ha usado para el aislamiento de la cepa JPCC DA0580, es el 100 %, entonces el cultivo con un medio f/2 con un menor contenido de estas sales, por debajo del 100 % (medio líquido con restricción de nutrientes) cumple los criterios del término "cultivo con restricción de nutrientes".
- 10 **[0058]** El contenido en sales nutrientes que incluyen vitaminas en el medio líquido con restricción de nutrientes es preferiblemente de entre el 0 y el 60 %, más preferiblemente de entre el 0 y el 30 %, aún más preferiblemente de entre el 0 y el 20 %, particularmente preferiblemente de entre el 0 y el 10 %, y lo más preferiblemente del 0 %, para aumentar el contenido porcentual de aceite en la microalga.
- 15 **[0059]** El procedimiento de cambiar desde un medio líquido nutriente a un medio líquido con restricción de nutrientes como se ha mencionado anteriormente no está específicamente limitado, y es posible cambiar al medio con restricción de nutrientes de una vez o gradualmente. El procedimiento de cambiar de una vez puede ser ejemplificado por un procedimiento en el que la biomasa de algas es precipitada mediante centrifugación, después el medio líquido nutriente en forma de sobrenadante se elimina, y a continuación se carga el medio líquido con restricción de nutrientes. Además, el procedimiento de cambiar gradualmente puede ser ejemplificado por un procedimiento en el que se carga un medio líquido nutriente que incluye la biomasa de algas en un lado de las dos áreas separadas por una membrana semipermeable, y se carga un medio líquido con restricción de nutrientes en el otro lado, de forma que se utilice el principio de la presión osmótica para disminuir gradualmente concentración contenida de las sales nutrientes que incluyen vitaminas en el medio líquido que incluye la biomasa de algas, haciendo así que sea un medio líquido con restricción de nutrientes.
- 20 **[0060]** El periodo de cultivo con restricción de nutrientes no está específicamente limitado siempre que no se deteriore el efecto de la presente invención. El periodo puede ser opcional siempre que el contenido porcentual de aceite en la microalga pueda aumentar durante el periodo. El periodo es preferiblemente de entre 3 y 20 días, más preferiblemente de entre 3 y 10 días, y aún más preferiblemente de entre 3 y 7 días.
- 25 **[0061]** El procedimiento de recuperación de la microalga cultivada puede llevarse a cabo mediante un procedimiento conocido, que puede ser ejemplificado por: un procedimiento en el que la biomasa de algas es precipitada mediante la centrifugación de la disolución de cultivo, y después se recupera como un sedimento; un procedimiento en el que la disolución de cultivo se hace pasar a través de un filtro con poros que no permiten el paso de la microalga, y se recupera la biomasa de algas que queda en el filtro; o similares.
- 30 **[0062]** El procedimiento de recoger el aceite contenido en la biomasa de algas producida mediante el procedimiento de cultivo y el procedimiento de recuperación mencionados anteriormente no está específicamente limitado siempre que no se deteriore el efecto de la presente invención. Por ejemplo, el aceite contenido en la biomasa de algas puede ser extraído con un disolvente orgánico mediante la suspensión de la biomasa de algas recuperada en el disolvente orgánico.
- 35 **[0063]** El disolvente orgánico no está específicamente limitado siempre que no se deteriore el efecto de la presente invención, y siempre que el aceite contenido en la biomasa de algas pueda ser disuelto en el mismo. El disolvente orgánico puede ser ejemplificado por n-hexano (en lo sucesivo denominado hexano), acetona, acetonitrilo, metanol, etanol, butanol, cloroformo, y similares. De entre estos se prefiere el hexano en términos de eficacia de extracción del aceite. Además, es posible usar bien un único tipo individualmente, o bien una combinación de dos o más tipos, de estos disolventes orgánicos.
- 40 **[0064]** Además, con el fin de mejorar la eficacia de extracción del aceite, es preferible desorganizar físicamente la biomasa de algas sometiendo el disolvente orgánico con la biomasa de algas suspendida a un homogeneizador ultrasónico, o similares.
- 45 **[0065]** El hexano que ha sido ejemplificado como un disolvente preferido para extraer el aceite a partir de la biomasa de algas de la microalga, puede usarse bien por sí mismo como un disolvente monofásico, o bien como un disolvente bifásico mezclado con metanol y/o con etanol.
- 50 **[0066]** En el caso de usar un disolvente bifásico mezclado con metanol, es preferible tener la mezcla a una proporción (en volumen) de hexano:metanol = entre 10:0 y 5:5, más preferiblemente a una proporción de hexano:metanol = entre 10:0,5 y 8:2, y aún más preferiblemente a una proporción de hexano:metanol = entre 10:1 y 9:1.
- 55 **[0067]** En el caso de usar un disolvente bifásico mezclado con etanol, es preferible tener la mezcla a una proporción (en volumen) de hexano: etanol = 10:0 y 5:5, más preferiblemente a una proporción de hexano: etanol =

entre 10:0,5 y 8:2, y aún más preferiblemente a una proporción de hexano:etanol = entre 10:1 y 9:1.

5 **[0068]** En el caso de usar un disolvente bifásico en forma de una mezcla de hexano con etanol y metanol, el etanol y el metanol se mezclan en una proporción opcional (en volumen) para su uso como un disolvente monofásico. En este caso, es preferible tener la mezcla a una proporción (en volumen) de hexano: etanol + metanol = entre 10:0 y 5:5, más preferiblemente hexano:etanol + metanol = entre 10:0,5 y 8:2, y aún más preferiblemente hexano:etanol + metanol = entre 10:1 y 9:1.

10 **[0069]** Es más preferible usar etanol en lugar de metanol para mejorar la seguridad del disolvente y para aumentar el rendimiento de extracción del aceite.

15 **[0070]** Para la extracción del aceite a partir de la biomasa de algas mediante el uso de un disolvente orgánico, es posible llevar a cabo la extracción del aceite con el disolvente orgánico después de haber secado la biomasa de algas, o llevar a cabo la extracción del aceite con el disolvente orgánico mientras la biomasa de algas está en un estado no seco que contiene humedad.

20 **[0071]** Para la extracción del aceite a partir de la biomasa de algas de la microalga de acuerdo con la presente invención mediante el uso de un disolvente orgánico, es preferible llevar a cabo la extracción del aceite con el disolvente orgánico a partir de la biomasa de algas en un estado no seco, mejor que secar previamente la biomasa de algas, ya que puede aumentarse el rendimiento de la extracción del aceite.

25 **[0072]** Para la extracción del aceite a partir de la biomasa de algas de una microalga conocida mediante el uso de un disolvente orgánico, es habitual que el rendimiento de extracción del aceite puede aumentarse secando previamente la biomasa de algas, y llevando a cabo después la extracción del aceite con el disolvente orgánico a partir de la biomasa de algas en un estado seco. Sin embargo, es desfavorable secar previamente la biomasa de algas cuando se trata de ahorrar el tiempo y la energía requeridos para el tratamiento de secado. En este punto, la biomasa de algas de la microalga de acuerdo con la presente invención puede tener una propiedad muy favorable que permite una eficaz extracción del aceite a partir de la biomasa de algas en un estado no seco. Esta ventaja hace posible conseguir una reducción energética en el proceso de producción de un biocombustible o similares con el uso de la microalga de la presente invención.

30 **[0073]** Para la extracción del aceite a partir de la biomasa de algas en un estado no seco mediante el uso de un disolvente orgánico, el uso de un disolvente bifásico que consiste en hexano con metanol y/o etanol puede aumentar el rendimiento de extracción. Con respecto a este disolvente bifásico, es particularmente preferido un disolvente bifásico con la mezcla a una proporción (en volumen) de hexano:metanol = 10:1, o un disolvente bifásico con la mezcla a una proporción (en volumen) de hexano:etanol = 10:1.

35 **[0074]** Para la extracción del aceite a partir de la biomasa de algas en un estado seco mediante el uso de un disolvente orgánico, el uso de un disolvente monofásico de hexano puede mejorar la eficacia de extracción.

40 **[0075]** Dado que dicho disolvente orgánico tiene un punto de ebullición menor que el del anteriormente mencionado aceite, el disolvente puede ser eliminado introduciendo una corriente de gas nitrógeno, reduciendo la presión, o medios similares. También es posible el reciclado del disolvente.

45 **[0076]** Además, el aceite extraído por el disolvente orgánico puede ser refinado adicionalmente si fuera necesario. Este procedimiento de refinado puede realizarse mediante un procedimiento conocido, que es ejemplificado mediante el aislamiento preparativo de cada componente contenido en el aceite mediante una extracción en fase sólida mediante el uso de una cromatografía líquida en gel de sílice, una destilación, o similares.

50 **[0077]** El aceite producido mediante el proceso para la producción de aceite de la presente invención incluye un tipo de aceite que se vuelve observable mediante la tinción de la microalga con rojo del Nilo. Este aceite incluye hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono. El término "hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono" se refiere a hidrocarburos alifáticos principalmente de 16, 18, 20, 22, 24 y 26 átomos de carbono.

55 **[0078]** Además, el aceite no sólo incluye los hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono, sino que también puede contener lípidos neutros, escualeno, hidrocarburos alifáticos de 27 o más átomos de carbono, fosfolípidos, ácidos grasos libres, compuestos esteroideos, pigmentos fotosintéticos tales como carotenoides, y similares.

60 **[0079]** La cepa JPCC DA0580 se usa como la microalga para el proceso de producción de aceite de la presente invención. La explicación del aceite así producido es la misma que la explicación mencionada anteriormente del aceite que puede acumularse en la biomasa de algas de la cepa JPCC DA0580.

## &lt; Aceite &gt;

**[0080]** El aceite desvelado es producido mediante el proceso para la producción de aceite de acuerdo con la presente invención.

**[0081]** La explicación de este aceite es la misma que la explicación mencionada anteriormente del aceite en el proceso para la producción de aceite.

**[0082]** Además, es posible refinar los hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono a partir del aceite. Adicionalmente, si el aceite incluye lípidos neutros y/o escualeno, también es posible refinar los lípidos neutros y/o el escualeno a partir del aceite.

**[0083]** Este procedimiento de refinado no está específicamente limitado y puede realizarse mediante un procedimiento conocido. Por ejemplo, el refinado puede llevarse a cabo mediante la disolución del aceite extraído con hexano a partir de la microalga en un disolvente orgánico tal como hexano, y cargando después un gel de sílice en esta disolución para adsorber otras sustancias además de los hidrocarburos alifáticos, de forma que estos hidrocarburos alifáticos eluyan por sí mismos. Además, el refinado también puede llevarse a cabo mediante la adsorción de los lípidos neutros en un gel de sílice, y eluyéndolos después con el uso de un disolvente orgánico, o similares. Adicionalmente, los hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono eluidos pueden separarse del escualeno mediante la aplicación de un procedimiento de refinado conocido, tal como una destilación o una cromatografía, a los hidrocarburos alifáticos.

**[0084]** El disolvente orgánico para la disolución del aceite puede ser ejemplificado por los mismos disolventes orgánicos que han sido ejemplificados en la anteriormente mencionada explicación del proceso para la producción de aceite.

## &lt; Biomasa de algas seca &gt;

**[0085]** La biomasa de algas seca de la presente invención es una materia seca de la microalga perteneciente al género *Navicula*, es decir, de la cepa depositada con el número de registro FERM BP-11201 de acuerdo con la presente invención.

**[0086]** El procedimiento de secado de la microalga no está específicamente limitado siempre que sea capaz de eliminar la humedad de la biomasa de algas. El procedimiento puede ser ejemplificado por un procedimiento de secado de la biomasa de algas al sol, un procedimiento de soplado de aire seco en la biomasa de algas, un procedimiento de liofilización de la biomasa de algas, o similares. De entre estos se prefiere un procedimiento de secado mediante liofilización dado que los componentes contenidos en la biomasa de algas pueden protegerse de la degradación.

## &lt; Combustible &gt;

**[0087]** El combustible de la presente invención es producido a partir de la microalga perteneciente al género *Navicula* de acuerdo con la presente invención.

**[0088]** La microalga es la misma microalga que ha sido ejemplificada en la anteriormente mencionada explicación de microalga perteneciente al género *Navicula* de acuerdo con la presente invención.

**[0089]** El procedimiento de utilización de la microalga como combustible puede ser ejemplificado por un procedimiento de combustión de la microalga, un procedimiento de combustión del aceite recogido a partir de la microalga, un procedimiento de combustión de los hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono, lípidos neutros y/o escualeno, que han sido refinados a partir del aceite recogido a partir de la microalga, o similares.

**[0090]** En el caso de la combustión de la microalga, es preferible el uso de una biomasa de algas seca producida mediante el secado de la microalga, de forma que se mejora la eficacia de combustión. Esta biomasa de algas seca es la misma que la anteriormente mencionada biomasa de algas seca de acuerdo con la presente invención. Con la cepa JPCC DA0580, el valor calorífico de la biomasa de algas seca de la misma puede alcanzar valor un equivalente o superior al valor calorífico del carbón vegetal (aproximadamente 6.000 kcal/kg).

**[0091]** En el caso de la combustión del aceite recogido a partir de la microalga, el aceite es el mismo que el anteriormente mencionado aceite producido de acuerdo con la presente invención. Dado que el aceite recogido a partir de la microalga es inflamable, puede usarse, por ejemplo, como combustible en una caldera, o similares. Si la microalga es la cepa JPCC DA0580, el valor calorífico del líquido extraído con hexano (aceite) del mismo puede alcanzar las 8.700 kcal/kg o superior.

**[0092]** En el caso de la combustión de los hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono, de los lípidos neutros y/o del escualeno, que han sido refinados a partir del aceite recogido a partir de la microalga, estos hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono, los lípidos neutros y el escualeno son los mismos que los hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono, los lípidos neutros y el escualeno del anteriormente mencionado aceite producido de acuerdo con la presente invención. Los hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono pueden usarse como combustible para un motor diésel. Además, los lípidos neutros pueden ser convertidos en un combustible diésel (el denominado combustible biodiésel) a través de un proceso de intercambio de éster conocido, o similares.

10 < Método para la fijación del dióxido de carbono >

**[0093]** El procedimiento para la fijación del dióxido de carbono de la presente invención comprende una etapa de cultivo de la microalga perteneciente al género *Navicula* de acuerdo con la presente invención.

15 **[0094]** La fotosíntesis realizada por la microalga para crecer tiene un efecto de asimilación del dióxido de carbono de la disolución de cultivo (de la atmósfera). En otras palabras, el dióxido de carbono puede ser fijado mediante el cultivo de la microalga.

20 **[0095]** La microalga es la misma microalga que se ha descrito en la anteriormente mencionada explicación de la microalga perteneciente al género *Navicula* de acuerdo con la presente invención.

**[0096]** La etapa de cultivo de la microalga es la misma que la etapa de cultivo de la microalga del anteriormente mencionado proceso para la producción de aceite de acuerdo con la presente invención.

25 **[0097]** A continuación hay una explicación más detallada de la presente invención con referencia a los Ejemplos, aunque la presente invención no se va a limitar a estos Ejemplos.

#### **[Ejemplo 1]**

30 < Productividad de hidrocarburos de la cepa JPCC DA0580 >

**[0098]** La cepa JPCC DA0580 se cultivó en una placa de 24 pocillos durante 12 semanas, y a continuación se tiñó la biomasa de algas con rojo del Nilo, mediante lo que se confirmó la producción y la acumulación de aceite en la biomasa de algas.

35 **[0099]** Hablando específicamente, la cepa JPCC DA0580 fue inoculada en 2 ml del medio f/2 en una placa de microtitulación de 24 pocillos, y se sometió a un cultivo estático bajo una iluminación de 1.000 lx durante 12 semanas. Después, la disolución de cultivo se transfirió a unos microtubos de 1,5 ml de volumen y se centrifugó a 13.000 rpm. Después la biomasa de algas se recuperó en forma de un sedimento. Con el fin de eliminar el medio contenido en el sedimento, el sedimento se suspendió en 0,5 ml de disolución salina fisiológica y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos, y después la biomasa de algas se recuperó en forma de un sedimento.

40 **[0100]** A continuación, este sedimento se resuspendió en 450 µl de disolución salina fisiológica, y al mismo se añadieron 50 µl de una disolución de rojo del Nilo. Esta suspensión se mezcló, y después se incubó a la temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación esto se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos, y después el sedimento se recuperó. Con el fin de eliminar el exceso de disolución de rojo del Nilo, el sedimento se suspendió en 0,5 ml de disolución salina fisiológica y se centrifugó de nuevo, y después se recuperó la biomasa de algas en forma de un sedimento. La biomasa de algas producida se suspendió en 50 µl de disolución salina fisiológica y se observó mediante microscopía de fluorescencia. Como resultado se encontraron aéreas con una emisión fluorescente amarilla visualizadas mediante rojo del Nilo, que indicaban las áreas en las que estaba el aceite en la biomasa de algas. En la imagen de microscopía de fluorescencia (FIG. 5), se confirmó una acumulación de una abundancia de aceite en forma de gotitas de aceite en la biomasa de algas.

45 **[0101]** La disolución de rojo del Nilo se refiere a una disolución preparada mediante la disolución de 1 mg de rojo del Nilo en 10 ml de acetona, y diluyendo después el producto disuelto cuatro veces en disolución salina fisiológica.

#### **[Ejemplo 2]**

60 **[0102]**

< Identificación de los hidrocarburos acumulados en la cepa JPCC DA0580 >

**[0103]** La cepa JPCC DA0580 se inoculó en 500 ml del medio f/2 en un matraz plano de 500 ml de volumen, y

se sometió a un cultivo en aireación a una tasa de aireación de 1 vvm bajo una iluminación de 3.000 lx durante una semana. A continuación se recuperó un sedimento de la biomasa de algas mediante centrifugación y se liofilizó durante una noche.

5 **[0104]** A la biomasa de algas seca (0,1 g) producida se añadieron 6 ml de hexano, y la mezcla se suspendió. La extracción se llevó a cabo mediante la desorganización de la biomasa de algas con un homogeneizador ultrasónico a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, el líquido de extracción con hexano se centrifugó para precipitar así el residuo de la biomasa de algas. Al hacerlo se recuperaron aproximadamente 6 ml de la disolución de extracción con hexano en forma de un sobrenadante. Al residuo de la biomasa de algas remanente  
10 en forma de un precipitado se añadieron de nuevo 6 ml de hexano reciente y la mezcla se suspendió. Se realizó el mismo tratamiento de extracción dos veces más (tres tratamientos de extracción en total). A continuación, el líquido de extracción con hexano así recuperado (aproximadamente 18 ml) se introdujo en una columna de gel de sílice, cartucho Sep-pak (6 cc/1 g) (fabricado por Waters Corporation), para eliminar los lípidos neutros, los ácidos grasos libres, los pigmentos, y similares. Al hacerlo se produjo una fracción de 16 ml de hidrocarburos alifáticos. Esta  
15 fracción se secó con una corriente de gas nitrógeno y se redisolvió en 0,5 ml de hexano. El producto resultante se usó como muestra. Esta muestra se ensayó mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS) para identificar los hidrocarburos contenidos en la muestra.

20 **[0105]** El equipo de cromatografía de gases usado en este documento era un GC2010 fabricado por Shimadzu Co. La columna usada en este documento era una DB-1 (longitud de la columna: 30 m, diámetro interno de la columna: 0,25 mm). La condición del ensayo era tal que la temperatura se aumentaba desde 100 °C (0 min) hasta 330 °C (10 °C/min, mantenido), la temperatura de inyección era de 300 °C, el modo de inyección era sin división, el gas portador era He, y la cantidad de inyección era de 1,0 µl.

25 **[0106]** El espectrómetro de masas usado en este documento era un GCMS-QP5050A fabricado por Shimadzu Co., que conduce la ionización mediante el procedimiento de impacto electrónico (EI).

30 **[0107]** Como resultado del ensayo de la GCMS, se reveló que la cepa JPCC DA0580 había producido hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono. Más específicamente, se encontraron hidrocarburos alifáticos saturados lineales de 16, 18, 20, 22, 24 y 26 átomos de carbono como componentes principales.

35 **[0108]** Además, con el uso de una muestra con un 0,1 % de aceite ligero disuelto en hexano como muestra para la cuantificación, se cuantificaron los hidrocarburos producidos por la cepa JPCC DA0580 a partir de la proporción entre el área que muestra la presencia de estos hidrocarburos en el diagrama de la GCMS. Como resultado se demostró que el contenido porcentual de los hidrocarburos saturados alifáticos lineales de 16, 18, 20, 22, 24 y 26 átomos de carbono en la biomasa de algas seca de la cepa JPCC DA0580 era de aproximadamente el 0,2 % en masa. Este contenido porcentual era mayor que el contenido porcentual de las algas conocidas hasta la fecha que producen hidrocarburos alifáticos basados en aceites ligeros. Según se describe en la Tabla 2 del Documento no Patente 1, estas algas conocidas muestran unos hidrocarburos alifáticos basados en aceites ligeros  
40 que suponen entre el 0,025 y el 0,12 % en masa de la biomasa de algas seca.

45 **[0109]** Adicionalmente se identificó que el pico con la mayor área en el diagrama de GCMS era del escualeno. El contenido porcentual de escualeno en la biomasa de algas seca de la cepa JPCC DA0580, calculado a partir del área del pico, era de aproximadamente el 0,3 % en masa.

**[0110]** También se ensayó una cantidad traza de la muestra, que había sido tomada a partir del extracto líquido con hexano sin refinar (aproximadamente 18 ml) antes de la aplicación a la columna de gel de sílice como se ha descrito anteriormente, mediante una GCMS en las mismas condiciones.

50 **[0111]** Como resultado se confirmó que el aceite extraído con hexano suponía el 45,5 % en masa o más de la biomasa de algas seca de la cepa JPCC DA0580. Además, con la biomasa de algas de la cepa JPCC DA0580 producida a partir de un lote de cultivo diferente que se había cultivado en las mismas condiciones, se confirmó que el aceite extraído con hexano suponía el 58 % en masa de la biomasa de algas seca en su máximo.

### 55 **[Ejemplo 3]**

< Identificación de los ácidos grasos constituyentes de los triglicéridos acumulados en la cepa JPCC DA0580 >

60 **[0112]** Un sedimento de la biomasa de algas de la cepa JPCC DA0580 producido mediante la misma forma de cultivo que la del Ejemplo 2, se liofilizó durante una noche.

**[0113]** Se produjeron aproximadamente 20 ml de un extracto líquido con hexano de la misma forma que la del Ejemplo 2, excepto porque se usaron 20 mg de la biomasa de algas seca como muestra y 7 ml de hexano por cada tratamiento de extracción. El hexano, que sirve como disolvente del líquido de extracción con hexano, se eliminó

mediante evaporación con una corriente de gas nitrógeno, produciendo así 9,1 mg de un producto extraído con hexano (aceite). Al hacerlo se confirmó que el producto extraído con hexano (aceite) suponía el 45,5 % en masa de la biomasa de algas seca.

5 **[0114]** Se añadió una disolución al 5 % de ácido clorhídrico-metanol al producto extraído con hexano (aceite), y la mezcla se hizo reaccionar en un tubo de ensayo precintado a 90 °C durante 2 horas, causando así la metil esterificación de los ácidos grasos que constituyen los anteriormente mencionados tipos de lípidos neutros, tales como los triglicéridos, contenidos en el producto extraído con hexano. Este producto se extrajo entonces mediante el uso de cloroformo, y la fase de cloroformo se apartó para su uso como una muestra.

10 **[0115]** La muestra se ensayó mediante un dispositivo de GCMS como se describe a continuación. Se usó un metil éster del ácido oleico como material de referencia para la cuantificación.

15 **[0116]** El dispositivo de cromatografía de gases usado en este documento era un GC6890N (número de modelo) fabricado por Agilent Technologies International Japón, Ltd. La columna usada en este documento era una DB-WAX (longitud de la columna: 30 m, diámetro interno de la columna: 0,25 mm, espesor de la película: 0,25 µm) fabricada por J&W. Las condiciones del ensayo eran tales que la temperatura se aumentó desde 50 °C (0 min) hasta 250 °C (10 °C/min, mantenida durante 15 minutos), la temperatura de inyección era de 230 °C, el modo de inyección era una inyección sin división (proporción de división = 10:1), el gas portador era He (1,2 ml/min), el detector era un FID (250 °C) y la cantidad de inyección era de 0,6 µl.

20 **[0117]** El espectrómetro de masas usado en este documento era un JMS-GCmate-Type II fabricado por JEOL Ltd., que conduce la ionización por el procedimiento de impacto electrónico (EI).

25 **[0118]** Como resultado del ensayo de GCMS, se averiguó que la mayoría de los ácidos grasos que constituyen los anteriormente mencionados tipos de lípidos neutros, tales como los triglicéridos, eran ácido tetradecanoico (ácido mirístico (C14:0)), ácido hexadecanoico (ácido palmítico (C16:0)), ácido hexadecenoico (ácido palmitoleico (C16:1)), ácido octadecenoico (ácido oleico (C18:1)) y ácido eicosapentaenoico (EPA (C20:5)). Los contenidos de estos ácidos grasos en la biomasa de algas seca de la cepa JPCC DA0580 eran, en el orden de los ácidos grasos según se indica, de aproximadamente el 1,0 % en masa, de aproximadamente el 12,7 % en masa, de aproximadamente el 17,0 % en masa, de aproximadamente el 0,8 % en masa, y de aproximadamente el 1,4 % en masa. En otras palabras, los ácidos grasos que constituyen los anteriormente mencionados tipos de lípidos neutros, tales como los triglicéridos, suponen aproximadamente el 32,9 % en masa de la biomasa de algas seca.

35 **[0119]** Mediante el cálculo basado en la asunción de que los ácidos grasos que constituyen los anteriormente mencionados tipos de lípidos neutros, tales como los triglicéridos, eran todos triglicéridos del ácido oleico, se demostró que la glicerina que constituye los anteriormente mencionados tipos de triglicéridos supone aproximadamente el 3,8 % en masa de la biomasa de algas seca. En conclusión, aproximadamente el 36,7 % en masa de la biomasa de algas seca eran los anteriormente mencionados tipos de lípidos neutros, tales como los triglicéridos.

#### **[Ejemplo 4]**

< Tasa de crecimiento de la cepa JPCC DA0580 >

45 **[0120]** La cepa JPCC DA0580 se cultivó de la misma forma que en el Ejemplo 2. Además, la cepa JPCC DA0580 también se cultivó de la misma forma que en el Ejemplo 2, excepto porque el medio líquido se cambió por un medio IMK que se explicará posteriormente. Con el fin de evaluar el crecimiento de la cepa JPCC DA0580 en los respectivos medios, se midió la turbidez (DO750) de cada disolución de cultivo con el tiempo. Los resultados se muestran en la FIG. 2.

50 **[0121]** El medio IMK se preparó de la siguiente forma.

55 **[0122]** Un medio líquido en el que se han disuelto sales nutrientes que incluyen vitaminas (200 mg/l de nitrato de sodio, 1,4 mg/l de hidrogenofosfato disódico, 5,0 mg/l de dihidrogenofosfato de sodio, 68 mg/l de cloruro de amonio, 0,2 mg/l de tiamina, 0,0015 mg/l de biotina, 0,0015 mg/l de vitamina (B 12), 37,2 mg/l de Na<sub>2</sub>EDTA, 5,2 mg/l de FeEDTA, 0,3332 mg/l de MnEDTA, 0,18 mg/l de cloruro de manganeso (II) tetrahidratado, 0,024 mg/l de sulfato de cinc heptahidratado, 0,014 mg/l de cloruro de cobalto (II) hexahidratado, 0,0072 mg/l de molibdato de sodio (VI) dihidratado, 0,0024 mg/l de sulfato de cobre (II) pentahidratado y 0,0016 mg/l de selenito pentahidratado), y 37 g/l de agua marina artificial (nombre del producto: Marine Art SF-1, elaborado por Senju Pharmaceutical Co., Ltd.) a las concentraciones predeterminadas en agua destilada, se preparó como el medio IMK.

60 **[0123]** A partir de los resultados obtenidos se confirmó que el crecimiento de la cepa JPCC DA0580 en el medio f/2 alcanzó una DO750 de entre 0,05 y 0,9 en un periodo de cultivo de una semana, lo que significa que el

crecimiento alcanzó la meseta. La biomasa de algas que había alcanzado la meseta se recuperó y se liofilizó. La biomasa de algas seca se pesó, y pesaba 0,46 g por litro de disolución de cultivo.

5 **[0124]** Como se ha mencionado en el Ejemplo 2 anterior, el contenido del producto extraído con hexano (aceite) en la biomasa de biomasa de algas seca de la cepa JPCC DA0580 puede alcanzar el 55 % en masa o más. Por lo tanto, se confirmó que la productividad de aceite de la cepa JPCC DA0580 en una semana alcanzaba los 0,26 g o más a una escala de cultivo de un litro.

10 **[0125]** Por otro lado, el crecimiento de la cepa JPCC DA0580 en el medio IMK no alcanzó la meseta en un periodo de cultivo de una semana.

**[Ejemplo 5]**

< Requisitos de agua marina de la cepa JPCC DA0580 >

15 **[0126]** Se prepararon cinco series de diluciones de medios líquidos nutrientes variando la concentración del agua marina artificial (nombre del producto: Marine Art SF-1, elaborado por Senju Pharmaceutical Co., Ltd.) en la composición del medio f/2 que se había usado en el Ejemplo 2. La concentración del agua marina artificial se estableció al 0 % cuando la dosis era de 0 g/l. También se establecieron las concentraciones respectivamente a 11,1 g/l (30 %), 18,5 g/l (50 %), 29,8 g/l (80 %) y 37 g/l (100 %).

20 **[0127]** La cepa JPCC DA0580 se inoculó en 500 ml de cada uno de estos medios en un matraz plano de 500 ml de volumen y se sometió a un cultivo estático durante una semana en las mismas condiciones de cultivo que las del Ejemplo 2. Con el fin de evaluar el crecimiento se midió la turbidez (DO750) de cada disolución de cultivo con el tiempo. Los resultados se muestran en la FIG. 3.

25 **[0128]** A partir de los resultados obtenidos se confirmó que el crecimiento de la cepa JPCC DA0580 estaba mejor en una condición del 100 % agua marina artificial (componente de agua marina) en un periodo de cultivo de una semana. Además, también se confirmó que el crecimiento disminuyó al reducir la concentración del agua marina artificial (componente de agua marina), y no se observó crecimiento con un 0 % de agua marina artificial (componente de agua marina).

30 **[0129]** Esto aseguró que la cepa JPCC DA0580 era una microalga marina.

35 **[Ejemplo 6]**

< Valor calorífico de la biomasa de algas seca de la cepa JPCC DA0580 >

40 **[0130]** La cepa JPCC DA0580 se cultivó durante una semana mediante el mismo procedimiento de cultivo que el del Ejemplo 2. A continuación se recuperó un sedimento de la biomasa de algas a partir de la disolución de cultivo mediante centrifugación, y se liofilizó.

45 **[0131]** La biomasa de algas seca así producida se usó como muestra. Esta muestra se ensayó mediante un calorímetro de bomba (fabricado por Yoshida Seisakusyo Co., Ltd., modelo: 1013-J, intervalo de medición calorífica: entre 4.000 y 33.500 J) para medir su valor calorífico. Se demostró que era de 6.730 kcal/kg. En otras palabras, se confirmó que la biomasa de algas seca de la cepa JPCC DA0580 tenía un valor calorífico equivalente o superior al del carbón vegetal.

50 **[0132]** Mediante el uso de la biomasa de algas seca así producida como muestra, se produjo un extracto líquido con hexano de la misma forma que en el Ejemplo 2. Este se secó con una corriente de gas nitrógeno, mediante lo cual se produjo un producto extraído con hexano (aceite). Este se usó como muestra y se ensayó con el calorímetro de bomba para medir su valor calorífico. Se demostró que el valor calorífico del producto extraído con hexano (aceite) era de 8.780 kcal/kg.

55 **[Ejemplo 7]**

< Estudio 1 de los disolventes orgánicos para la extracción de aceite a partir de la biomasa de algas de la cepa JPCC DA0580 >

60 **[0133]** La cepa JPCC DA0580 se cultivó durante una semana de la misma forma que en el Ejemplo 2. A continuación se recuperó un sedimento de la biomasa de algas a partir de la disolución de cultivo mediante centrifugación.

**[0134]** Al sedimento de la biomasa de algas en un estado no seco (0,1 g cuando se secó) se añadieron 6 ml

de un disolvente bifásico de hexano / metanol (la proporción de la mezcla (en volumen) era hexano:metanol = 10:1), y la mezcla se suspendió. La extracción se llevó a cabo mediante la desorganización de la biomasa de algas con un homogeneizador ultrasónico a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, el extracto se centrifugó para precipitar así el residuo de la biomasa de algas. Al hacerlo se recuperaron aproximadamente 6 ml de la disolución del extracto en forma de un sobrenadante. Al residuo de la biomasa de algas remanente como un precipitado se añadieron de nuevo 6 ml de disolvente bifásico reciente, y la mezcla se suspendió. Se realizó el mismo tratamiento de extracción dos veces más (tres tratamientos de extracción en total). El extracto así obtenido (18 ml en total) se secó con una corriente de gas nitrógeno y se cuantificó mediante una GCMS de la misma forma que en el Ejemplo 2.

**[0135]** Como resultado se confirmó que el aceite extraído con el disolvente bifásico suponía el 51,8 % en masa de la biomasa de algas seca de la cepa JPCC DA0580. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

**[0136]** Después se sometió una biomasa de algas seca (0,1 g) producida mediante la recuperación del sedimento de la biomasa de algas a partir de la disolución de cultivo mediante su centrifugación y liofilización durante una noche, a la extracción del aceite de la misma forma, con el uso de un disolvente monofásico de hexano en lugar del disolvente bifásico. El extracto así obtenido (18 ml en total) se secó con una corriente de gas nitrógeno y se cuantificó mediante una GCMS de la misma forma que en el Ejemplo 2.

**[0137]** Como resultado se confirmó que el aceite extraído con el disolvente monofásico suponía el 46,2 % en masa de la biomasa de algas seca de la cepa JPCC DA0580. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

**[0138]** Además, la biomasa de algas seca (0,1 g) producida mediante la recuperación del sedimento de la biomasa de algas a partir de la disolución de cultivo mediante su centrifugación y liofilización durante una noche, se sometió a la extracción del aceite de la misma forma con el uso del disolvente bifásico (hexano / metanol (proporción de la mezcla (en volumen) = 10:1)). El extracto así obtenido (18 ml en total) se secó con una corriente de gas nitrógeno, y se cuantificó mediante una GCMS de la misma forma que en el Ejemplo 2.

**[0139]** Como resultado se confirmó que el aceite extraído con el disolvente monofásico de hexano suponía el 45,3 % en masa de la biomasa de algas seca de la cepa JPCC DA0580. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

[Tabla 1]

Alga	Estado no seco	Estado seco	Estado seco
	Disolvente bifásico (% en masa)	Disolvente monofásico (% en masa)	Disolvente bifásico (% en masa)
Cepa JPCC DA0580	51,8	46,2	45,3

**[0140]** En los resultados mencionados anteriormente, en la extracción de aceite a partir de la biomasa de algas de la cepa JPCC DA0580 en un estado no seco con un disolvente orgánico, la elevada eficacia de extracción fue proporcionada por el uso del disolvente bifásico hexano / metanol. Cuando se comparan estos resultados, es más preferible, en la extracción de aceite a partir de la cepa JPCC DA0580, llevar a cabo la extracción mediante el uso del disolvente bifásico de hexano / metanol para el sedimento de la biomasa de algas en un estado no seco.

**[Ejemplo 8]**

< Estudio 2 de los disolventes orgánicos para la extracción de aceite a partir de la biomasa de algas de la cepa JPCC DA0580 >

**[0141]** La cepa JPCC DA0580 se cultivó durante una semana de la misma forma que en el Ejemplo 2. A continuación se recuperó un sedimento de la biomasa de algas a partir de la disolución de cultivo mediante centrifugación.

**[0142]** Al sedimento de la biomasa de algas en un estado no seco (0,1 g cuando se secó) se añadieron 6 ml de un disolvente bifásico de hexano / etanol (la proporción de la mezcla (en volumen) era hexano:etanol = 10:1), y la mezcla se suspendió. La extracción se llevó a cabo mediante la desorganización de la biomasa de algas con un homogeneizador ultrasónico a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, el extracto se centrifugó para precipitar así el residuo de la biomasa de algas. Al hacerlo se recuperaron aproximadamente 6 ml de la disolución del extracto en forma de un sobrenadante. El extracto así obtenido (6 ml en total) se secó con una corriente de gas nitrógeno y se cuantificó mediante una GCMS de la misma forma que en el Ejemplo 2.

**[0143]** Como resultado se confirmó que el aceite extraído con el disolvente bifásico de hexano suponía el 31,5 % en masa de la biomasa de algas seca de la cepa JPCC DA0580. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

**[0144]** Después, un sedimento de la biomasa de algas en un estado no seco (0,1 g cuando se secó) se sometió a la extracción de aceite de la misma forma con el uso de un disolvente bifásico de hexano / metanol (la proporción de la mezcla (en volumen) era hexano:metanol = 10:1) en lugar del disolvente bifásico de hexano / etanol, y se cuantificó mediante una GCMS.

**[0145]** Como resultado se confirmó que el aceite extraído con el disolvente bifásico de hexano suponía el 30,7 % en masa de la biomasa de algas seca de la cepa JPCC DA0580. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

**[0146]** Nótese que la razón por la cual el rendimiento de la extracción del aceite del Ejemplo 8 era menor que el rendimiento de la extracción del aceite del Ejemplo 7 es que el número de veces de extracciones con el disolvente orgánico se redujo desde tres veces (Ejemplo 7) hasta una (Ejemplo 8).

[Tabla 2]

Alga	Estado no seco	Estado no seco
	Disolvente bifásico (% en masa) de hexano / metanol	Disolvente bifásico (% en masa) de hexano / etanol
Cepa JPCC DA0580	30,7	31,5

Eficacia de extracción del aceite a partir de la biomasa de microalgas pertenecientes a diferentes géneros

**[0147]** Se cultivaron tres tipos de microalgas, *Scenedesmus* (*Scenedesmus rubescens* cepa JPCC GA0024, número de registro: FERM P-21749), cianobacterias (*Synechocystis* sp.) y *Tetraselmis* (*Tetraselmis striata*) mediante procedimientos conocidos, produciendo respectivamente los sedimentos de la biomasa de algas. Estos tres tipos de algas tienen la propiedad de acumular aceite en su biomasa de algas. El aceite incluye al menos lípidos neutros tales como los triglicéridos.

**[0148]** Se usó un sedimento de cada biomasa de algas en un estado no seco (0,1 g cuando se secó) como muestra, que se sometió a la extracción del aceite con el uso de un disolvente bifásico (hexano / metanol (proporción de la mezcla (en volumen) = 10:1)) de la misma forma que en el Ejemplo 7.

**[0149]** Después, un sedimento de cada biomasa de algas en un estado seco (0,1 g) se usó como muestra, que se sometió a la extracción del aceite con el uso de un disolvente monofásico (hexano) de la misma forma que en el Ejemplo 7.

**[0150]** Además, también se usó el sedimento de cada biomasa de algas en un estado seco (0,1 g) como muestra, que se sometió a la extracción del aceite con el uso de un disolvente bifásico (hexano / metanol (proporción de la mezcla (en volumen) = 10:1)) de la misma forma que en el Ejemplo 7.

**[0151]** El extracto así obtenido (18 ml en total) se secó con una corriente de gas nitrógeno y se cuantificó mediante una GCMS de la misma forma que en el Ejemplo 2. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

[Tabla 3]

Alga	Estado no seco	Estado seco	Estado seco
	Disolvente bifásico (% en masa)	Disolvente monofásico (% en masa)	Disolvente bifásico (% en masa)
Scenedesmus	6,7	22,7	4,9
Cianobacteria	4,0	12,9	5,4
Tetraselmis	3,0	19,4	10,1

**[0152]** A partir de los resultados de la Tabla 3, es apreciable que, cuando se trata de la extracción de aceite a partir de la biomasa de algas de microalgas conocidas mediante el uso de un disolvente orgánico, el rendimiento de la extracción de aceite a partir de la biomasa de algas en un estado no seco es notablemente bajo. En otras

palabras, es necesaria una etapa de secado previo de la biomasa de algas. No son necesarias pequeñas cantidades de tiempo y coste para el proceso de secado de la biomasa de algas.

5 **[0153]** Por otro lado, la biomasa de algas de la microalga de acuerdo con la presente invención tiene unas propiedades bastante excelentes que permiten la extracción eficaz del aceite a partir de la biomasa de algas en un estado no seco. Por lo tanto, es posible reducir la energía del proceso de producción de un biocombustible o similar a partir de la microalga de la presente invención.

10 APLICABILIDAD INDUSTRIAL

15 **[0154]** Las microalgas de acuerdo con la presente invención tienen una elevada capacidad de producir hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono, y por lo tanto son aplicables en la producción de un combustible diésel, que se muestra prometedor como un combustible de carbono neutro destinado a la prevención del calentamiento global. La cepa JPCC DA0580 de la presente invención se muestra particularmente prometedor debido a su elevada capacidad de producción de lípidos neutros y de escualeno, así como por ser capaz de producir hidrocarburos alifáticos de entre 16 y 26 átomos de carbono, como se ha mencionado anteriormente.

20 **[0155]** Los lípidos neutros pueden ser convertidos en un combustible diésel (el denominado combustible biodiésel) a través de un proceso conocido de intercambio de éster, o similares.

25 LISTA DE SECUENCIAS

**[0156]**

30 <110> Electric Power Development Co., Ltd

<120> Microalgae Scenedesmus, procedimiento para la producción de aceite con microalgas Senedesmus, y aceite extraído a partir de microalgas Senedesmus

35 <130> BET11M2901

<140> EP10761319.2

<141> 2010-03-10

40 <150> JP2009-096362

<151> 2009-04-10

<160> 1

45 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1641 antes elegidos

<212> ADN

50 <213> Navicula sp.

<400> 1

ES 2 482 592 T3

actttgaac tgcgaacggc tcattatata agttatagtt tatttgatag tcccttacta 60  
 ctccgataac cgtagtaatt ctagagctaa tacgtgcgtc aatactcttc ggagtagtat 120  
 ttattagatg gaaaccaact gcttcggcat gatgtggtga ttcataataa gcttgccgat 180  
 cgcgtgcttc ggcygcgatg gatcattcaa gtttctgccc tatcagcttt gacggtagtg 240  
 tattggagta ccgtggcggc aacgggtaac gggaaattag ggtttgacac cggagagggg 300  
 gcctgagaga cggctaccac atccaaggaa ggcagcaggc gcgtaaatta cccaatcttg 360  
 acacaaggag gtagtgacaa taaataacaa tgccgggcct ttctaggtct ggcaattgga 420  
 atgagaacaa tttaaaccct ttatcgagga tccattggag ggcaagtctg gtgccagcag 480  
 ccgcggtaat tccagctcca atagcgtata ttaaagttgt tgcagtaaa aagctcgtag 540  
 ttggatttgt ggcgtgcggt gcggcgtcca ttgatttggc tctgcctyga ccgcgccatc 600  
 cttgggtgga atctgygtgg cattaggttg tgcgtgcaggg gatgcccatc gtttactgtg 660  
 aaaaaattag agtgttcaaa gcaggcttat gccggtgaat atattagcat ggaataataa 720  
 gataggtcta gggctctatt ttgttggttt gcggtccttg gaaatgatta acagggacag 780  
 ttgggggtat tgcgtattcca ttgtcagagg tgaaattctt ggatttctgg aagacgaact 840  
 actgcgaaag catttaccaa ggatgttttc attaatacaag aacgaaagt aggggatcga 900  
 agatgattag ataccatcgt agtottaacc ataaactatg ccgacaaggg attggcgggg 960  
 ttcgtttcgt ctccgtcagc accttatgag aatcacaag tttttgggtt ccggggggag 1020  
 tatggtcgca aggctgaaac ttaaagaaat tgacggaagg gcaccaccag gagtggagcc 1080  
 tgccgcttaa ttgactcaa cacgggaaaa cttaccaggc ccagacatag tgaggattga 1140  
 cagattgaga gctctttctt gattctatgg gtggtggtgc atggccgttc ttagttggtg 1200

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una microalga, *Navicula oiliticus*, cepa depositada en el IPOD, NITE con el número de registro FERM BP-11201 (JPCC DA0580).
2. Un proceso para la producción de aceite, que comprende una etapa de cultivo de la microalga de acuerdo con la reivindicación 1.
- 10 3. Un proceso para la producción de aceite de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende adicionalmente, después de dicha etapa de cultivo:
- 15 una etapa de cultivar adicionalmente dicha microalga con un medio diferente con una(s) menor(es) concentración(es) de sal(es) nutriente(s) en comparación con el medio que se había usado para el cultivo precedente.
4. Un proceso para la producción de aceite de acuerdo con alguna de la reivindicación 2 y la reivindicación 3, en el que dicho aceite incluye un lípido neutro.
- 20 5. Un proceso para la producción de aceite de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 2 hasta la reivindicación 4, en el que dicho aceite incluye escualeno.
6. Un proceso para la producción de aceite de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 2 hasta la reivindicación 5, que comprende adicionalmente, después de dicha etapa de cultivo:
- 25 una etapa de extracción de aceite a partir del producto del cultivo mediante el uso de un disolvente orgánico, siendo el disolvente orgánico uno cualquiera de los disolventes elegidos de entre un disolvente que comprende n-hexano, un disolvente que comprende n-hexano y metanol, y un disolvente que comprende n-hexano y etanol.
- 30 7. Una biomasa de algas seca producida mediante el secado de la microalga de acuerdo con la reivindicación 1.
8. Un procedimiento para la fijación de dióxido de carbono, que comprende una etapa de cultivo de la microalga de acuerdo con la reivindicación 1.

FIG. 1

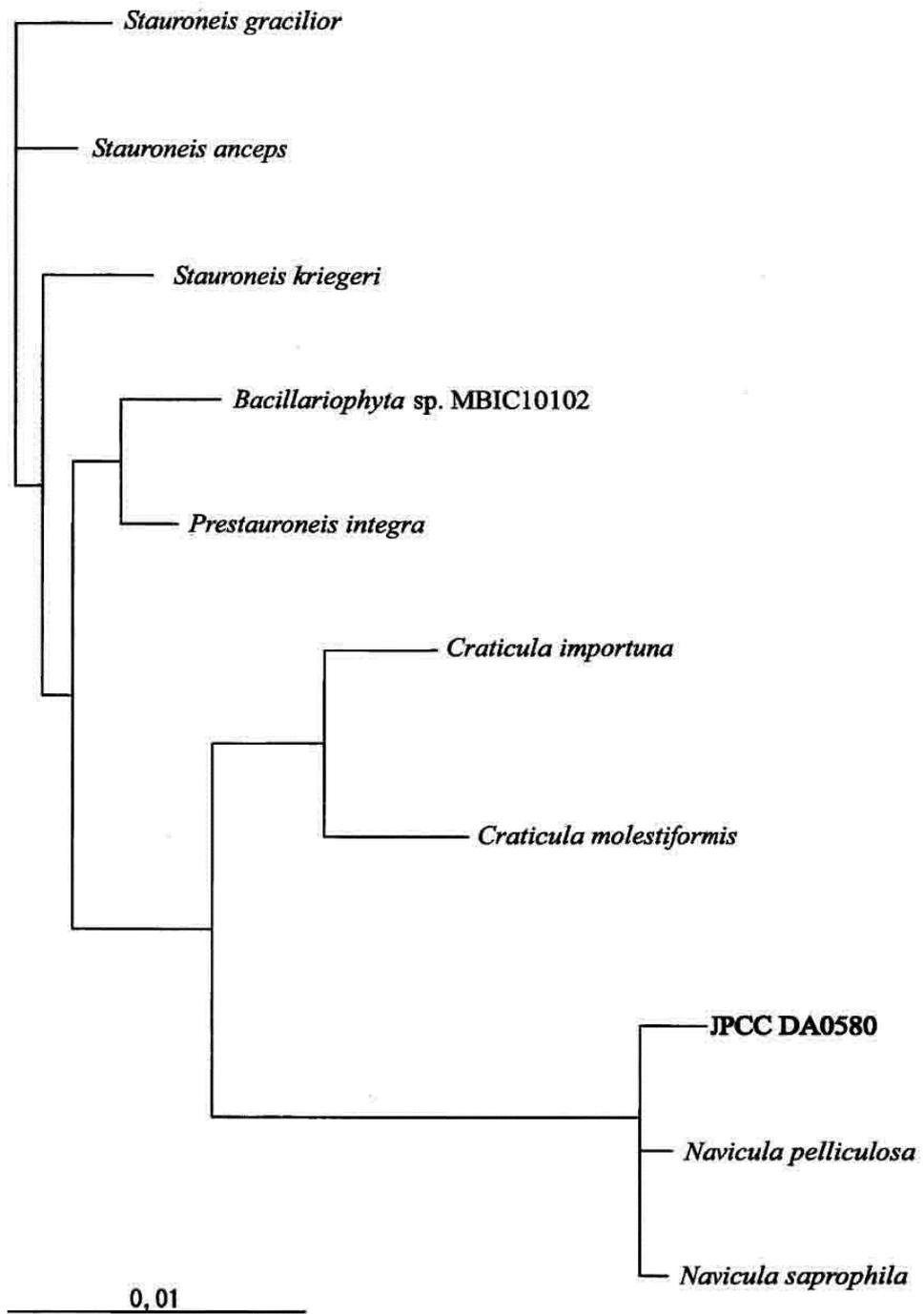


FIG. 2

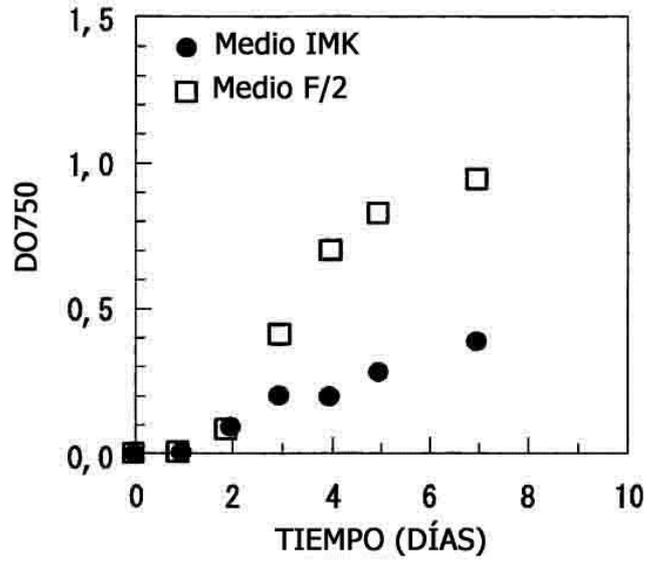


FIG. 3

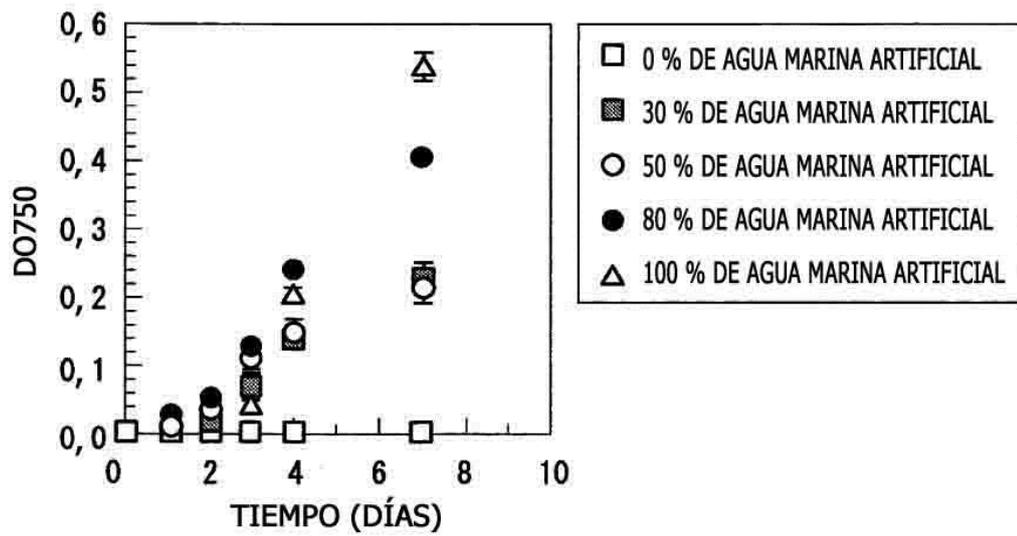


FIG. 4

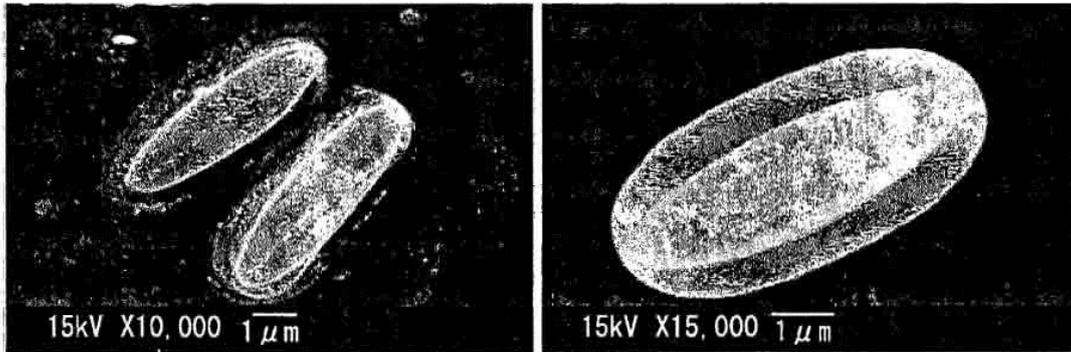


FIG. 5

