(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 537 982**

(51) Int. CI.:

C12N 1/06 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
C12P 1/00 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2011 E 11160790 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2505636**

(54) Título: **Método para la recuperación de un componente celular específico a partir de un microorganismo**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.06.2015

(73) Titular/es:

NESTE OIL OYJ (100.0%)
Keilaranta 21
02150 Espoo, FI

(72) Inventor/es:

LEGRAND, CATHERINE y
OLOFSSON, MARTIN

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Método para la recuperación de un componente celular específico a partir de un microorganismo

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para la recuperación de un componente celular específico a partir de un microorganismo, en particular para la recuperación de lípidos a partir de un microorganismo productor de lípidos.

También se divulga en el presente documento un sistema integrado para la ruptura de las células de las algas productoras de lípidos.

Antecedentes

Algunos microorganismos, tales como algas, bacterias y hongos, pueden contener triglicéridos en hasta el 80 % de su contenido de sustancia seca. Sin embargo, la recuperación de los lípidos a partir de una biomasa de microorganismos con los métodos convencionales puede encontrarse con problemas inesperados relativos a la biomasa residual, ya que el método de ruptura celular usado con los microorganismos puede afectar negativamente al posterior uso de la biomasa residual en otras aplicaciones.

Por ejemplo, algunas algas autótrofas son ricas en lípidos, robustas y fáciles de cultivar. La dificultad con algunas especies de algas está relacionada con su pared celular, que es prácticamente imposible de romper eficientemente con los métodos convencionales para la liberación de lípidos de las células manteniendo al mismo tiempo una calidad lo suficientemente alta de la biomasa residual de algas para un procesado y utilización continuos.

Como consecuencia de los métodos convencionales usados actualmente, basados en disolventes químicos y a menudo a elevada temperatura o presión, la biomasa residual de microorganismos, tal como de células de algas, no puede usarse para muchas aplicaciones de gran valor, por ejemplo, proteínas funcionales (desnaturalización), alimentos o comida (disolventes residuales), que es importante con objeto de maximizar el valor de la cadena de algas y disminuir así el precio del bioaceite en bruto. Además, los costes relacionados con el consumo energético (elevada temperatura y presión) y la regeneración de grandes cantidades de disolventes podrían evitarse parcialmente.

WU J T et al., (2006) "Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria", AQUATIC TOXICOLOGY, vol. 80, nº 4, páginas 338 - 345, divulgan que el potasio y las ficobilinas (componentes celulares) son liberados por las cianobacterias tras el tratamiento mediante una toxina de algas. No todos los compuestos celulares que son liberados en forma de clorofila son detectados en el medio. No hay ninguna divulgación de la liberación de lípidos a partir de las cianobacterias.

El documento US 2011/076748 A1 (SALVO ROBERTO DI [US] ET AL), 31 de marzo de 2011, divulga un método de aislamiento de componentes celulares (tales como proteínas y lípidos) a partir de algas mediante el lisado de las células en una solución iónica.

Sumario

La presente invención aborda los problemas mencionados anteriormente de una forma nueva, proporcionando un método alternativo para la recuperación del aceite a partir de la biomasa microbiana, especialmente a partir de células de algas, basándose en la extracción con disolvente, que es uno de los principales retos en las aplicaciones que usan el aceite de algas como materia prima para el NExBTL (diésel renovable). La ruptura de las células de algas mediante un medio biológico no convencional facilita la ruptura de las paredes celulares duras o, de otro modo, irrompibles, de algunos microorganismos. Posiblemente, este método puede aplicarse también con otras células de algas y con células de microbios. Los medios bioquímicos usados en el nuevo método bioquímico anteriormente mencionado romperán preferiblemente las paredes celulares/membranas celulares de las algas productoras de lípidos o de otras especies microbianas productoras de lípidos, de forma que el propio medio bioquímico no perjudique el medio ambiente sino que se descomponga cuando acabe en la naturaleza.

El primer aspecto del presente método se refiere a un método para la recuperación de lípidos a partir de un microorganismo productor de lípidos de acuerdo con la reivindicación 1.

También se divulga en el presente documento un sistema integrado para la ruptura de lípidos a partir de células de algas productoras de lípidos.

Descripción

La presente invención proporciona nuevas técnicas para la ruptura de las células de microorganismos productores de lípidos, especialmente de algas, y la posterior recolección de los lípidos intracelulares secretados a partir de la

fase acuosa.

Una de las principales ideas subyacentes en la presente invención es el uso de la capacidad de ruptura bioquímica de algas altamente citotóxicas sobre la membrana celular o la pared celular de algas o de otros microorganismos ricos en lípidos, y recoger a continuación el (los) lípido(s) a partir de las mencionadas algas u otros microorganismos ricos en lípidos mediante la extracción de las gotitas de aceite de la fase acuosa de la suspensión acuosa de algas o de microbios que contiene los residuos de las células de algas y los componentes intracelulares liberados.

Tomando como base este principal descubrimiento, el primer aspecto de la invención se refiere a un método para la recuperación de lípidos a partir de un microorganismo productor de lípidos que comprende las siguientes etapas:

- proporcionar una biomasa de un microorganismo productor de lípidos,
- romper la pared celular y/o la membrana celular de dicho microorganismo mediante una citotoxina de algas
- liberando así los lípidos a partir de la célula del microorganismo, y
- recuperar dichos lípidos.

Ventajosamente, el método descrito anteriormente se usa para la recuperación de lípidos a partir de algas productoras de lípidos. En este caso, el método comprende las siguientes etapas:

- proporcionar una biomasa de algas productoras de lípidos,
- romper la pared celular y/o la membrana celular de dichas algas mediante una citotoxina de algas
- liberando así los lípidos a partir de la célula de las algas, y
- recuperar dichos lípidos mediante una extracción.

En una forma de realización ventajosa, la citotoxina es capaz de romper la pared celular y/o la membrana celular del microorganismo, y también la pared celular la pared celular y/o la membrana celular de al menos una de las microalgas que consisten en las especies de los géneros *Cryptomonas, Ciclotella, Dunaliella, Haematococcus, Phaeodactylum, Thalassiosira* y *Rhodomonas.*

Mediante el uso de citotoxinas de algas en el método mencionado anteriormente, las paredes celulares o las membranas celulares de los microorganismos pueden romperse de forma que sea posible recuperar los productos celulares sin causar daños a la biomasa microbiana residual, que puede usarse posteriormente en otras aplicaciones.

Con este tipo de método suave y biológico de ruptura de la pared celular/membrana celular, también pueden disminuirse los costes relacionados con el consumo de energía o la regeneración de los disolventes.

El método descrito anteriormente es especialmente adecuado para la ruptura de las paredes celulares de algas autótrofas pertenecientes a diferentes grupos con una pared semirrígida o rígida (por ejemplo, diatomeas y algunas algas verdes).

También se divulga en el presente documento un sistema integrado para la ruptura de los lípidos de las células de algas productoras de lípidos, que comprende un recipiente de crecimiento para las algas productoras de lípidos y un recipiente de crecimiento para algas productoras de citotoxinas.

Ventajosamente, el sistema integrado para la ruptura de las células de algas productoras de lípidos comprende un recipiente de crecimiento para las algas productoras de lípidos y un recipiente de crecimiento para las algas productoras de citotoxina(s), que son capaces de romper la pared celular y/o la membrana celular de al menos una de las microalgas que consisten en las especies de los géneros *Cryptomonas, Ciclotella, Dunaliella, Haematococcus, Phaeodactylum, Thalassiosira* y *Rhodomonas.*

En dicho sistema integrado, las algas productoras de lípidos se cultivan en unas condiciones adecuadas para la producción de lípidos, y dichas algas productoras de citotoxinas se cultivan en unas condiciones adecuadas para la producción de citotoxinas. Las citotoxinas producidas se añadirán al recipiente de crecimiento que contiene las algas productoras de lípidos, en una cantidad suficiente para romper las paredes celulares y/o las membranas celulares de las mencionadas algas productoras de lípidos, liberando así el componente lipídico desde las células y recuperando los lípidos a partir de los demás componentes celulares.

En una forma de realización alternativa del sistema integrado anterior, las algas productoras de lípidos y las algas productoras de citotoxinas se cultivan, ambas, en el mismo recipiente de crecimiento y en un entorno tal que se

suprima la producción de citotoxinas. Una vez que la biomasa de algas productoras de citotoxinas esté a un nivel adecuado, se desencadena la producción de exotoxinas mediante el uso, por ejemplo, de unas condiciones de estrés adecuadas.

En esta memoria descriptiva también se describe una composición usada para la ruptura de las células de las algas productoras de lípidos, que comprende una citotoxina de algas, que se elige de forma que sea capaz de romper la pared celular y/o la membrana celular de las algas productoras de lípidos.

Ventajosamente, la(s) citotoxina(s) de algas se elige(n) de forma que sea(n) capaz(ces) de romper la pared celular y/o la membrana celular de al menos una de las siguientes microalgas elegidas de entre el grupo que consiste en *Cryptomonas* spp.; *Ciclotella* spp.; *Dunaliella* spp.; *Haematococcus* spp.; *Phaeodactylum* spp.; *Thalassiosira* spp. y *Rhodomonas* spp., liberando así el componente lipídico a partir de dichas células de algas productoras de lípidos.

Según se usa en este documento, la definición "citotoxina de algas" se refiere a una sustancia tóxica de algas procedente de algas, sustancia tóxica de algas que es capaz de romper la(s) pared(es) celular(es) y/o la(s) membrana(s) celular(es) de algas o de otros microorganismos. Estas citotoxinas de algas incluyen, por ejemplo, toxinas extracelulares de algas (exotoxinas), excretadas por microalgas. En el presente documento, el término "citotoxina" se usa para especificar la acción de ruptura de la pared celular o/y de la membrana celular de las toxinas de un alga liberadas en el medio que rodea a las células de algas, dado que las toxinas de algas también pueden provocar la muerte de microorganismos mediante otros mecanismos sin romper realmente las paredes celulares/membranas celulares de dichos microorganismos.

Las sustancias tóxicas de algas, según se usan en el presente documento, significan lo mismo que las toxinas de algas.

Las estructuras químicas de las citotoxinas de algas difieren considerablemente, dado que cada alga puede producir diversas sustancias tóxicas diferentes de algas. Por lo tanto, el mecanismo mediante el cual actúa cada sustancia tóxica de algas sobre las algas y otros microorganismos difiere considerablemente. En el caso de que la sustancia tóxica de algas destruya microorganismos, un mecanismo de destrucción habitual es la lisis de la pared celular/membrana celular. Las citotoxinas de algas pueden encontrarse habitualmente entre las algas, que excretan, en ciertas condiciones, toxinas extracelulares en el medio que las rodea.

Una de estas fuentes principales es el plancton marino o de agua dulce, que comprende grupos de algas que incluyen diatomeas, cianobacterias, dinoflagelados, primnesiofitos y rafidofitos, y que pueden producir posiblemente toxinas citotóxicas de algas en sus entornos. La comprobación de si todas las exotoxinas de algas tienen realmente efectos citotóxicos frente a ciertos microorganismos debería realizarse por separado con respecto a la sonda de prueba, que consiste en un microorganismo de interés, y también al menos una de las microalgas, bacterias o levaduras mencionadas en esta descripción. Ventajosamente se menciona la sonda de prueba que incluye microalgas elegidas de entre el grupo que consiste en los géneros *Cryptomonas, Ciclotella, Dunaliella, Haematococcus, Phaeodactylum, Rhodomonas* y *Thalassiosira.* Si una exotoxina es citotóxica frente a los microorganismos ensayados, romperá sus paredes celulares/membranas celulares y también la pared celular/membrana celular de al menos una de las microalgas mencionadas en esta descripción.

Las citotoxinas de algas, que pueden romper o lisar la pared celular/membrana celular de microorganismos, pueden derivar preferiblemente de especies de algas pertenecientes a los grupos mencionados anteriormente: diatomeas, cianobacterias, dinoflagelados, primnesiofitos o rafidofitos.

A continuación se proporcionan algunos ejemplos de especies de algas pertenecientes a los géneros de algas mencionados anteriormente cuyas toxinas de algas o metabolitos secundarios tóxicos pueden ser citotóxicos, es decir, puede ser capaces de romper las membranas celulares/paredes celulares de al menos algas (incluyendo cianobacterias), bacterias u hongos, incluyendo también la pared celular y/o la membrana celular de al menos una de las siguientes microalgas elegidas de entre el grupo que consiste en los géneros *Cryptomonas, Ciclotella, Dunaliella, Haematococcus, Phaeodactylum, Rhodomonas* y *Thalassiosira.*

Las algas posiblemente citotóxicas, que pertenecen a las cianobacterias, incluyen los géneros *Anabaena, Aphanizomenon, Calothrix, Cylindrospermopsis, Fisherella, Gomfosfaeria, Hapalosiphon, Microcystis, Nodularia* y *Nostoc.* Algunos ejemplos de algas posiblemente citotóxicas pertenecientes a los dinoflagelados son *Alexandrium, Coolia, Dinophysis, Heterocapsa, Karlodinium, Karenia, Ostreopsis, Peridinium* y *Prorocentrum.* Algunos ejemplos de algas posiblemente citotóxicas pertenecientes a los primnesiofitos son *Chrysochromulina, Phaeocystis* y *Prymnesium.* Algunos ejemplos de diatomeas posiblemente citotóxicas son *Pseudonitzschia* y *Nitzschia,* y algunos ejemplos de rafidofitos posiblemente citotóxicos son *Heterosigma* y *Chattonella.*

De entre las especies de algas mencionadas anteriormente, *Alexandrium* produce sustancias tóxicas de algas estables que pueden usarse como citotoxinas, dado que son capaces de romper y lisar un amplio abanico de células de algas, incluyendo, por ejemplo, aquellas pertenecientes a los flagelados y a las diatomeas. Las sustancias tóxicas de algas más preferibles para su uso como citotoxinas de algas son aquellas cuya toxicidad desaparece

rápidamente de la fase acuosa mediante un efecto químico tal como la temperatura o la luz, o un efecto biológico tal como la degradación bacteriana. Estos tipos de citotoxinas de algas son, por ejemplo, las citotoxinas excretadas por el género *Prymnesium,* que es un haptofito de crecimiento rápido. Por ejemplo, las citotoxinas de algas producidas por el mixótrofo *P. parvum* pueden ser degradadas por el efecto de la luz solar y de la radiación UV.

Además de las algas, muchas toxinas de algas o metabolitos secundarios tóxicos de algas pueden tener también un efecto citotóxico sobre las membranas celulares/paredes celulares de hongos o bacterias, tales como de bacterias heterótrofas (Phycologia (2003) Vol. 42 (4) 406 - 419). Si estos hongos o bacterias pueden acumular un elevado contenido lipídico intracelular, puede merecer la pena recuperar estos lípidos mediante el uso del método y los medios de acuerdo con la presente invención.

Según se usa en el presente documento, la definición "ruptura" de células de algas o de otros microorganismos se refiere a un proceso que daña las paredes celulares o las membranas celulares de las algas o de otros microorganismos mediante la acción de una citotoxina de algas, y que da como resultado la destrucción, la lisis, la degradación, la descomposición o la pérdida de integridad de las paredes celulares/membranas celulares en un grado tal que permite la liberación del aceite/lípidos desde el interior de las mencionadas células de algas o de microbios.

Según se usa en el presente documento, el término "lípido" se refiere a una sustancia grasa cuya molécula contiene generalmente, como una parte, una cadena hidrocarbonada alifática, que se disuelve en disolventes orgánicos no polares pero que es poco soluble en agua.

Los lípidos son un grupo esencial de moléculas grandes en las células vivas. Algunos lípidos comprenden, por ejemplo, grasas, aceites, ceras, ésteres de ceras, esteroles, terpenoides, isoprenoides, carotenoides, polihidroxialcanoatos, ácidos grasos, alcoholes grasos, ácido ésteres de ácidos grasos, fosfolípidos, glucolípidos, esfingolípidos y acilgliceroles, tales como monoglicéridos (monoacilglicerol), diglicéridos (diacilglicerol) o triglicéridos (triacilglicerol, TAG). En la presente invención, los lípidos deseados que pueden ser recuperados en el producto incluyen grasas, aceites, ceras y ácidos grasos y sus derivados.

Según se usa aquí, se entiende que el término "biomasa" significa la biomasa derivada de un cultivo que contiene microorganismos que incluyen bacterias, cianobacterias, hongos tales como levaduras, hongos filamentosos y mohos, arqueobacterias, protistas; plantas microscópicas tales como algas, microalgas o plancton. Este término incluye también una biomasa preparada, congelada o de otro modo trabajada previamente, que posteriormente se usa en este método.

La definición "proporcionar una biomasa" comprende en el presente documento el uso de una biomasa derivada de un cultivo de microorganismos o el uso de una biomasa preparada, congelada o de otro modo trabajada previamente.

La mayoría de los microorganismos productores de lípidos son unicelulares, es decir, tienen una única célula, sin embargo, algunos organismos pluricelulares microscópicos también son capaces de acumular lípidos. Los microorganismos acumulan fácilmente lípidos o han sido modificados genéticamente para acumular lípidos o para mejorar la acumulación de lípidos. En una forma de realización preferida de la presente invención, la biomasa de microbios que contiene lípidos se elige de entre el grupo de bacterias, cianobacterias, hongos tales como levaduras, hongos filamentosos, mohos, arqueobacterias, protistas; microalgas, bacterias, hongos, hongos filamentosos, mohos y levaduras.

Preferiblemente, algunas microalgas adecuadas comprenden uno o más representantes de las siguientes clases taxonómicas: *Clorophyceae*, *Cryptophyceae* (algas retráctiles), *Chrysophyceae, Diatomophyceae* (diatomeas), *Dinophyceae* (dinoflagelados), *Euglenophyceae, Eustigmatophyceae, Pavlovophyceae, Pedinophyceae, Prasinophyceae, Prymnesiophyceae* (algas haptofitas) y *Raphidophyceae.*

En una forma de realización más preferida, la biomasa microbiana comprende géneros de microalgas de agua dulce y marina que comprenden *Achnantes, Agmenellum, Amphiprora, Amphora, Anabaena, Anabaenopsis, Ankistrodesmus, Arthrospira, Attheya, Boeklovia, Botryococcus, Biddulphia, Brachiomonas, Bracteococcus, Carteria, Chaetoceros, Characium, Chlamydomonas, Cricophaera, Crypthecodinium, Cryptomonas, Chlorella, Clorococcum, Chrysophaera, Coccocloris, Cocconeis, Ciclotella,Cylindrotheca, Dermocarpa, Dunaliella, Ellipsoidon, Entomoneis, Euglena, Eremosphaera, Extubocellulus, Franceia, Fragilaria, Gleocapsa, Gleothamnion, Hantzschia, Haematococcus, Hormotilopsis, Hymenomonas, Isochrysis, Lepocinclis, Melosira, Minidiscus, Micractinum, Microcystis, Monallanthus, Monoraphidium, Muriellopsis, Nannocloris, Nannocloropsis, Navicula, Neocloris, Nephroselmis, Nitzschia, Nodularia, Nostoc, Ochromonas, Oedogonium, Oocystis, Oscillatoria, Papiliocellulus, Paraclorella, Pascheria, Pavlova, Peridinium, Phaeodactylum, Phagus, Plankthothrix, Platymonas, Plectonema, Pleurochrysis, Phormidium, Pleurosigma, Porphyridium, Prymnesium, Pseudoclorella, Piramimonas, Pirobotrus,Radiosphaera, Rhodomonas, Rhodosorus, Sarcinoid, Scenedesmus, Schizochytrium, Scrippsiella, Seminavis, Skeletonema, Spirogyra, Spirulina, Stichococcus, Synechococcus, Synechocystis, Synedra, Tetraedron, Tetraselmis, Thalassiosira, Trachyneis, Traustrochytrium, Trentepholia, Ulkenia, Viridiella, Volvox* y *Xenococcus.*

Se encontró que el método era particularmente eficaz con microalgas elegidas de entre el grupo que consiste en *Chlorella* spp., tales como *Chlorella pyrenoidosa; Dunaliella* spp., tales como *Dunaliella tertiolecta, Dunaliella marina* y *Dunaliella salina; Nannocloropsis* spp. y *Phaeodactylum* spp., tales como *Phaeodactylum tricornutum,* capaces de acumular un elevado contenido lipídico.

En otra forma de realización preferida, la biomasa microbiana comprende especies fúngicas, especialmente especies de hongos filamentosos, pertenecientes a los siguientes géneros *Aspergillus, Chaetomium, Claviceps, Cladosporidium, Cunninghamella, Emericella, Fusarium, Glomus, Humicola, Malbranchea Mortierella, Mucor, Paecilomyces, Penicillium, Pythium, Rhizopus, Trichoderma, Zygorhynchus* y *Ustilago,* especialmente aquellas especies con unas elevadas cantidades de lípidos y de ácidos grasos esenciales. Preferiblemente, la biomasa microbiana comprende *Mortierella isabellina, Mucor, Aspergillus o Rhizopus.*

En otra forma de realización preferida más, la biomasa microbiana comprende levaduras oleaginosas pertenecientes a los siguientes géneros *Candida* tales como *Candida curvata, Clavispora, Cryptococcus,* tales como *Cryptococcus curvatus, Deparyomyces, Endomycopsis, Galactomyces, Hansenula, Kluyveromyces, Lipomyces* tales como *Lipomyces starkeyi, Pachysolen, Pichia,* tales como *Pichia stipitis, Rhodosporidium,* tales como *Rohodosporidium toruloides, Rhodotorula,* tales como *Rhodotorula glutinis, Saccharomyces, Waltomyces, Yarrowia,* tales como *Yarrowia lipolitica* y *Trichosporon,* tales como *Trichosporon cutaneum* o *Trichosporon pullulans,* que acumula lípidos con facilidad o que han sido modificados genéticamente para producir lípidos. Más preferiblemente, las levaduras comprenden *Lipomyces, Rhodosporidium* o *Cryptococcus.*

En otra forma de realización preferida más, la biomasa microbiana comprende bacterias pertenecientes a los siguientes géneros *Acinetobacter, Actinobacter, Alcanivorax, Aerogenes, Anabaena, Arthrobacter, Bacillus, Clostridium, Dietzia, Escherichia, Flexibacterium, Gordonia, Micrococcus, Mycobacterium, Nocardia, Nostoc, Oscillatoria, Pseudomonas, Rhodococcus, Rhodomicrobium, Rhodopseudomonas, Shewanella, Shigella, Streptomyces* y *Vibrio.* Más preferiblemente, las bacterias comprenden *Rhodococcus opacus, Acinetobacter, Nocardia* o *Streptomyces.*

Por el término tal como "ventajoso", "preferido", "preferente" o "especial" se entiende en el presente documento que el asunto en cuestión elegido es ventajosamente pero no necesariamente usado en relación con el mismo debido a que hay algunas ventajas relativas a su uso. Sin embargo, también puede haber algunos inconvenientes implicados en el uso del asunto en cuestión que es "ventajoso", "preferido", "preferente" o "especial", y por lo tanto, estos términos no deben ser interpretados en modo alguno de forma restrictiva.

Método general

El método general usado para la recuperación de productos tales como lípidos a partir de una biomasa microbiana, especialmente a partir de células de algas, se representa en la figura 1.

Aunque este método se describe para la recuperación de lípidos a partir de microalgas, también puede usarse el mismo tipo de método para la recuperación de otros productos a partir de biomasas microbianas adecuadas, siempre que sus paredes celulares y/o sus membranas celulares sean rompibles mediante sustancias tóxicas de algas, que también pueden romper al menos una microalga elegida de entre el grupo que consiste en los géneros *Achnantes, Agmenellum, Amphiprora, Amphora, Anabaena, Anabaenopsis, Ankistrodesmus, Arthrospira, Attheya, Boeklovia, Botryococcus, Biddulphia, Brachiomonas, Bracteococcus, Carteria, Chaetoceros, Characium, Chlamydomonas, Cricophaera, Crypthecodinium, Cryptomonas, Chlorella, Clorococcum, Chrysophaera, Coccocloris, Cocconeis, Ciclotella, Cylindrotheca, Dermocarpa, Dunaliella, Ellipsoidon, Entomoneis, Euglena, Eremosphaera, Extubocellulus, Franceia, Fragilaria, Gleocapsa, Gleothamnion, Hantzschia, Haematococcus, Hormotilopsis, Hymenomonas, Isochrysis, Lepocinclis, Melosira, Minidiscus, Micractinum, Microcystis, Monallanthus, Monoraphidium, Muriellopsis, Nannocloris, Nannocloropsis, Navicula, Neocloris, Nephroselmis, Nitzschia, Nodularia, Nostoc, Ochromonas, Oedogonium, Oocystis, Oscillatoria, Papiliocellulus, Paraclorella, Pascheria, Pavlova, Peridinium, Phaeodactylum, Phagus, Plankthothrix, Platymonas, Plectonema, Pleurochrysis, Phormidium, Pleurosigma, Porphyridium, Prymnesium, Pseudoclorella, Piramimonas, Pirobotrus,Radiosphaera, Rhodomonas, Rhodosorus, Sarcinoid, Scenedesmus, Schizochytrium, Scrippsiella, Seminavis, Skeletonema, Spirogyra, Spirulina, Stichococcus, Synechococcus, Synechocystis, Synedra, Tetraedron, Tetraselmis, Thalassiosira, Trachyneis, Traustrochytrium, Trentepholia, Ulkenia, Viridiella, Volvox* y X*enococcus,* o bacterias elegidas de entre el grupo que consiste en los géneros *Acinetobacter, Actinobacter, Aerogenes, Alcanivorax, Arthrobacter, Bacillus, Clostridium, Cupriviadus, Dietzia, Gordonia, Escherichia, Flexibacterium, Micrococcus, Mycobacterium, Nocardia, Pseudomonas, Ralstonia, Rhodococcus, Rhodomicrobium, Rhodopseudomonas, Shewanella, Shigella, Streptomyces, Wautersia* y *Vibrio,* o al menos una levadura elegida de entre el grupo que consiste en los géneros *Candida, Clavispora, Cryptococcus, Deparyomyces, Endomycopsis, Galactomyces, Hansenula, Kluyveromyces, Lipomyces, Pachysolen, Pichia, Rhodosporidium, Rhodotorula, Saccharomyces, Waltomyces, Yarrowia* y *Trichosporon, o* al menos un hongo filamentoso elegido de entre el grupo que consiste en los géneros *Absidia, Aspergillus, Blakeslea, Chaetomium, Cladosporium, Claviceps, Cladosporidium, Cunninghamella, Emericella, Entomophthora, Fusarium, Gibberella, Glomus, Humicola, Malbranchea, Mucor, Mortierella, Paecilomyces, Penicillium, Puccia, Pythium, Rhizopus, Saprolegnia, Trichoderma, Thermomycs, Ustilago* y *Zygorhynchus.*

Ventajosamente, estas sustancias tóxicas de algas romperán las microalgas elegidas de entre el grupo que consiste en *Cryptomonas* spp.; Ciclotella spp.; *Dunaliella* spp.; *Haematococcus* spp.; *Phaeodactylum* spp.; *Thalassiosira* spp. y *Rhodomonas* spp.

Otras biomasas microbianas adecuadas se han proporcionado anteriormente en el análisis del significado de la definición de "biomasa".

El método representado en la figura 1 puede usarse para la recuperación de lípidos a partir de los mismos microorganismos (microalgas, bacterias, levaduras u hongos filamentosos) mencionados anteriormente, al menos una de cuyas paredes celulares y/o membranas celulares también debería ser rompible por parte de las sustancias tóxicas de algas. Estos microorganismos también incluyen las siguientes microalgas pertenecientes a los géneros: *Cryptomonas, Ciclotella, Dunaliella, Haematococcus, Phaeodactylum, Thalassiosira* spp. y R*hodomonas* spp., o las siguientes bacterias *Rhodococcus opacus, Acinetobacter, Nocardia o Streptomyces.,* o las siguientes levaduras *Cryptococcus curvatus, Rhodosporidium toruloides, Rhodotorula glutinis, Yarrowia lipolitica, Pichia stipitis, Candida curvata, Lipomyces starkeyi* o *Lipomyces lipofer* y *Trichosporon cutaneum* o *Trichosporon pullulans* y los siguientes hongos filamentosos: *Absidia spinosa,* especies pertenecientes al género *Aspergillus* tales como A. *ficheri, A. flavus, A. nidulans, A. ochraceus, A. oryzae* y A. *terrius, Blakeslea trispora, Chaetomium globosum, Cladosporidium herbarum, Claviceps purpurea,* especies pertenecientes al género *Cunninghamella* tales como C. *echinulata, C. japonica* y C. *elegans, Entomophthora coronata, Fusarium bulbigenum, Fusarium graminaarum, Fusarium sp., Gibberella fujikuroi, Glomus caledonius, Humicola lanuginosa,* especies pertenecientes al género *Mucor* tales como *M. circinelloides, M. plumbeus* y *M. rouxii,* especies pertenecientes al género *Mortierella* tales como *M. isabellina, M. alpina* y *M. ramanniana,* especies pertenecientes al género *Penicillium* tales como *P. javanicum, P. lilacinum, P. spinulosum* y P. *soppii, Puccia coronata, Pythium ultimum, Rhizopus delemar, Rhizopus oryzae, Ustilago zeae, Zygorhynchus moelleri, Malbranchea pulchella, Myrothecium sp., Sclerotium bataticola, Pellicularia practicola, Sphacelothea reiliana, Tylopospоridium ehren bergii, Achyla americana, Lepista nuda, Tilletia controversa y Cronartium fusiform.*

Las algas pueden crecer en condiciones de luz o en condiciones de oscuridad. En condiciones de luz, el crecimiento de las algas es fotoautótrofo o autótrofo, y es necesaria la energía lumínica para su crecimiento. En condiciones de oscuridad, el crecimiento del alga es heterótrofo, lo que significa que se requiere otra energía distinta a la lumínica para su crecimiento. Las algas productoras de lípidos pueden ser cultivadas en estas dos condiciones. Sin embargo, el crecimiento autótrofo y el crecimiento heterótrofo requieren diferentes condiciones de crecimiento y nutrientes, que deberían tenerse en cuenta al considerar el cultivo.

Durante el crecimiento heterótrofo y autótrofo pueden usarse ciertas condiciones y nutrientes de crecimiento para promover la producción de aceite dentro de las células de algas. Adicionalmente, puede mejorarse la producción de aceite de algunas algas productoras de lípidos mediante el cultivo de las algas productoras de lípidos en unas condiciones de cultivo que comprenden una fase inductora de estrés. Las formas de provocar una fase inductora de estrés son, por ejemplo, ausencia de luz, inyección de oxígeno reactivo, cambios en el pH o en la nutrición o aditivos químicos. Por ejemplo, mediante una modificación en la proporción entre el nitrógeno y el fósforo durante la fase de crecimiento de las algas se puede potenciar notablemente la producción de lípidos, según se demuestra también en los siguientes ejemplos 1 - 6.

La biomasa microbiana que se va a procesar puede obtenerse directamente a partir del cultivo o del sistema de crecimiento, tal como un recipiente de crecimiento. Cuando se usa el método presentado en la figura 1 para la recuperación del aceite a partir de las algas productoras de lípidos, el método se inicia habitualmente mediante el cultivo por separado de las algas productoras de lípidos y de las algas productoras de citotoxinas en diferentes recipientes de crecimiento.

Alternativamente, el método presentado en la figura 1 puede modificarse de forma que las algas productoras de lípidos y las algas productoras de toxinas se cultiven en el mismo recipiente de crecimiento. Sin embargo, las condiciones de cultivo son tales que se suprime la producción de la toxina extracelular. Una vez que la biomasa de algas productoras de toxinas está en un nivel adecuado, se desencadena la producción de exotoxinas mediante un cambio en las condiciones de cultivo, por ejemplo, sometiendo las algas productoras de la toxina a una fase de inducción de estrés adecuada.

El recipiente de crecimiento, según se usa en el presente documento, significa un fotorreactor solar cerrado o un fotorreactor iluminado artificialmente cerrado, un recipiente o un canal artificial abierto, o un depósito o un estanque de agua natural o artificial. El depósito o el estanque de agua pueden contener agua dulce natural o agua de mar natural o artificial.

Cada recipiente de crecimiento puede incluir una fuente de dióxido de carbono, o puede añadirse dióxido de carbono al recipiente de crecimiento durante el cultivo para ajustar el pH. El recipiente de crecimiento también puede contener unos medios adecuados para el control de la temperatura, la aireación y la circulación. También puede ser necesario suministrar nutrientes y modificar el contenido de nutrientes entre sí. Si las algas se cultivan en un fotorreactor cerrado, el reactor debe estar provisto de iluminación.

Las algas productoras de lípidos que se van a cultivar en un recipiente de crecimiento pueden estar formadas por una única especie de alga o por una combinación mixta de dos o más especies de algas.

Puede usarse una amplia variedad de algas para la producción de biomasa a partir de la cual pueden recuperarse lípidos o aceite. El método es adecuado para algas autótrofas, heterótrofas o mixótrofas. Las algas productoras de lípidos más comunes pueden encontrarse entre los grupos de diatomeas, clorofitos (algas verdes), cianobacterias (algas azules), crisofitos (algas pardas), dinoflagelados y haptofitos. Algunas algas productoras de lípidos adecuadas pueden encontrarse entre aquellas algas mencionadas anteriormente o a partir del análisis relativo al término "biomasa".

La biomasa microbiana que se va procesar se trata generalmente mediante medios conocidos, tales como centrifugación, filtración, decantación, flotación o sedimentación, posiblemente ayudado por una floculación y una evaporación del agua para eliminar el exceso de agua o la solución acuosa de crecimiento. Preferiblemente, la biomasa de microalgas, bacterias, arqueobacterias, hongos filamentosos, mohos o levaduras, se filtra o se centrifuga antes de su procesado. Por otro lado, puede usarse una biomasa procedente de un cultivo en estado sólido, de un cultivo inmovilizado o similar, suspendiéndola en un medio acuoso, si fuera necesario.

Por el término "húmeda" se entiende una biomasa microbiana que procede de una solución de cultivo acuosa y a partir de la cual se elimina el exceso de agua mediante procesos habituales de eliminación de agua de bajo consumo energético, tales como filtración o similares, y que específicamente no se seca. Alternativamente, puede suspenderse la biomasa microbiana seca sólida en una forma acuosa.

En el proceso descrito en la figura 1, se cultivan en primer lugar las algas productoras de lípidos en un primer recipiente de crecimiento, y las células de algas cultivadas se secan después parcialmente mediante la eliminación del exceso de agua mediante evaporación, sedimentación, centrifugación, que posiblemente están ayudadas por una floculación.

Las citotoxinas de algas usadas en este método pueden ser producidas mediante unas algas adecuadas, mencionadas anteriormente cuando se analizó la definición de "citotoxina de algas". Preferiblemente, las citotoxinas de algas son producidas por una única especie de fitoplancton que está presente de forma natural en el entorno de agua marina o dulce, o mediante la mezcla de dos o más especies de fitoplancton.

Las algas productoras de citotoxinas se cultivan en un segundo recipiente de crecimiento (es decir, en un fotorreactor no cerrado, en un recipiente abierto o en un depósito o un estanque de agua natural o artificial). Las condiciones de crecimiento y los nutrientes deberían ser ajustados según los requisitos de la especie de alga que se va a cultivar. Las algas productoras de citotoxinas de algas comprenden diferentes especies con diferentes necesidades según sus condiciones de crecimiento, nutrientes y proporciones de los nutrientes. Por ejemplo, algunos dinoflagelados productores de citotoxinas incluyen especies que varían desde autótrofos obligados hasta mixótrofos, y por lo tanto existe una gran diversidad de factores que afectan a su toxicidad y crecimiento. Por ejemplo, el pH, la temperatura, la salinidad del medio de crecimiento y las limitaciones de nutrientes pueden afectar a la toxicidad de las citotoxinas de algas. Después de que las algas productoras de citotoxinas hayan sido cultivadas en un recipiente de crecimiento, la suspensión de algas se filtra para eliminar las células de las algas y recuperar el filtrado exento de células, que contiene las citotoxinas de algas.

El filtrado, que contiene las citotoxinas de algas, se añade entonces a una biomasa de algas parcialmente seca. En una forma de realización, el filtrado que contiene las citotoxinas de algas y agua se añade a la biomasa de algas seca que contiene las células de algas en una cantidad tal que la proporción entre las células de algas productoras de citotoxinas, a partir de las cuales se han recuperado las toxinas de algas, y las células de algas productoras de lípidos, será de desde 1:100.000 hasta 1:10 preferiblemente de desde 1:1.000 hasta 1:100 (célula/célula). Esta proporción celular real depende de la calidad y de la cantidad de citotoxinas presentes en el filtrado y de la toxicidad de las citotoxinas frente a las células de las algas productoras de lípidos. Después de que el filtrado acuoso que contiene la(s) citotoxina(s) haya sido añadido a las células de algas parcialmente secas, el contenido sólido de esta suspensión acuosa de algas es preferiblemente de aproximadamente el 20 % en peso, siendo el resto de la suspensión en su mayor parte agua.

Alternativamente, el cultivo de algas productoras de citotoxinas se añade, sin infiltración ni extracción, a las células de algas ricas en lípidos parcialmente secas. También es posible combinar el cultivo de algas productoras de lípidos con el cultivo de algas productoras de citotoxinas sin un primer procesado de ninguno de estos cultivos de algas, y a continuación recuperar los lípidos a partir de esta suspensión de algas combinadas.

Después de haber añadido las citotoxinas de algas al cultivo de algas ricas en lípidos, las sustancias citotóxicas afectarán a las paredes celulares/membranas celulares de las células de algas, rompiéndolas. Habitualmente, las paredes celulares/membranas celulares de las algas se lisan completamente debido al efecto de la(s) citotoxina(s), y los lípidos serán liberados en una suspensión de residuos de algas, que incluye lípidos, residuos de paredes celulares, productos intracelulares, enzimas, subproductos, etc.

Los lípidos pueden ser eliminados de la mencionada suspensión acuosa de residuos de algas mediante métodos convencionales tales como una extracción, una centrifugación y/o una filtración y, por ejemplo, mediante una columna de extracción.

Los residuos de algas (biomasa), que se han desechado después de la extracción de los lípidos, están en buenas condiciones y pueden ser utilizados en etapas de reprocesado posteriores para la producción de otros productos valiosos. Los lípidos recuperados pueden usarse en la producción de biodiésel, de diésel renovable, de combustible pesado, de gasolina o de componentes de aceite básico.

El método también puede usarse para la recuperación de aceite/lípidos a partir de los microorganismos (microalgas, bacterias, levaduras u hongos filamentosos) mencionados anteriormente. Este método es especialmente adecuado para la recuperación de aceite a partir de las siguientes especies de algas: *Haematococcus* spp.; *Dunaliella* spp., tales como *Dunaliella tertiolecta, D. marina, D. salina (algas verdes); Phaeodactylum* spp., tales como *Phaeodactylum tricornutum* (diatomea), *Thalassiosira* spp., tales como *T. pseudonana, T. weissflogii* y C*iclotella* spp. (diatomea); *Cryptomonas* spp. y *Rhodomonas* spp., tales como *Rhodomonas salina y Rhodomonas lacustris* (algas retráctiles). Estas microalgas son capaces de acumular un elevado contenido lipídico.

Ejemplos

Algas productoras de lípidos

Clorofito *Dunaliella tertiolecta* (CCMP 1320)

Diatomea *Phaeodactylum tricornatum* (CCMP 2928)

Algas productoras de citotoxinas

Preferiblemente, la citotoxina usada es degradable en el medio ambiente mediante un efecto químico o biológico tal como la temperatura, la luz solar (o la luz UV artificial), o bacterias, o mediante su unión a matrices orgánicas. Sin embargo, con el fin de ilustrar la validez de nuestro método en la ruptura de las paredes celulares de las algas productoras de lípidos y la posterior recuperación de los lípidos a partir de los residuos celulares acuosos de las algas, aquí usamos unas citotoxinas de algas más estables procedentes del género de dinoflagelados *Alexandrium.* Estas citotoxinas fueron producidas por *Alexandrium tamarense* durante el crecimiento exponencial en un fotorreactor provisto de una iluminación artificial. Durante el cultivo de las algas productoras de lípidos se introdujo una fase inductora de estrés mediante la restricción del acceso a nutrientes durante la fase de crecimiento tardía.

Ejemplos 1 y 2

Cultivo de algas productoras de lípidos y de algas posiblemente citotóxicas

Se cultivaron dos algas productoras de aceite, el clorofito *Dunaliella tertiolecta* (CCMP 1320) y la diatomea *Phaeodactylum tricornatum* (CCMP 2928) en medio f/2 (N: P = 24) preparado a partir de agua marina artificial filtrada (al 35 ‰) en cultivos discontinuos aireados (2 - 10 l). Las algas productoras de aceite se cultivaron en unas condiciones controladas a 20 ºC en un ciclo de luz - oscuridad de 16:8 h bajo una luz fluorescente blanca fría a una irradiancia de 220 µE m^{-2} s^{-1}. Se inyectó CO_2 diariamente para reducir el pH desde 9 - 9,5 hasta 8 - 8,5 y se cultivaron hasta una fase exponencial a una biomasa de 3 x 10^6 - 5 x 10^6 células ml^{-1} que contiene un 10 - 20 % de lípidos (peso seco/peso seco).

Para potenciar la acumulación de lípidos en las células, la fase de inducción de estrés comenzó mediante la inducción de un estrés de nutrientes en los cultivos de algas productoras de aceite a través de la recolección del 20 - 30 % del volumen del cultivo antes de rellenar el cultivo con f/2 modificado (N: P = 2). El contenido de lípidos alcanzó el 40 - 50 % de lípidos celulares (peso seco/peso seco) durante un periodo de 1 - 2 días.

La cuantificación del contenido de lípidos se realizó mediante el uso de un método modificado de Bligh & Dyer (1959).

Se cultivó *Alexandrium tamarense* productora de sustancias de algas posiblemente citotóxicas en medio K (N: P = 24) preparado a partir de agua marina filtrada (salinidad de 32) en cultivos discontinuos de 2 l en condiciones controladas a 15 ºC en un ciclo de luz - oscuridad de 16:8 h con una luz fluorescente blanca fría a una irradiancia de 65 µE m^{-2} s^{-1}.

Ejemplos 3 y 4

Las algas ricas en lípidos se recogieron mediante centrifugación (20 min, 100 x g).

Las sustancias tóxicas de las algas de A. *tamarense* (Tillmann & John, 2002) se liberaron desde las células al medio

circundante. Para recoger las sustancias tóxicas de algas se preparó un filtrado exento de células de A. *tamarense* a partir de cultivos densos en fase estacionaria (8 - 20 x 10^3 células ml^{-1}) mediante una filtración suave del cultivo a través de una red de nailon con una malla de 10 µm.

Ejemplo 5

Secado parcial de las células de algas

La biomasa húmeda de algas ricas en lípidos se obtuvo después de una centrifugación (40 ml) de los cultivos objetivo y una resuspensión *(Dunaliella:* 0,2 - 1,4 x 10^8 células ml o 4,5 - 5,8 g l^{-} peso seco; *Phaeodactylum:* 2,2 - 4,5 x 10^8 células ml^{-1}). El sobrenadante se desechó, excepto por 3 - 4 ml que se conservaron en el tubo de centrifugación y se usaron para la resuspensión de la biomasa sedimentada. La resuspensión se realizó con objeto de obtener una suspensión práctica fácil de trabajar con ella.

Ejemplo 6

Ruptura de la membrana celular

La membrana celular de las algas ricas en lípidos se rompió biológicamente mediante la adición de las sustancias de las algas citotóxicas procedentes de A. *tamarense* (filtrado exento de células de los ejemplos 3 y 4). Se realizaron combinaciones de ensayos de dosis respuesta y series de tiempos para definir los parámetros óptimos (proporción de dosis:objetivo y tiempo de exposición), dando como resultado la ruptura de la membrana celular del objetivo *(Dunaliella, Phaeodactylum).* Se añadieron las citotoxinas de las algas a las células objetivo en el intervalo de proporciones de dosis:objetivo (célula:célula) de desde 1:1.000 hasta 1:100, y se incubaron durante 24 h con tomas de muestras cada 15 minutos durante 4 h y una muestra final a las 24 h. Después de la adición de las citotoxinas de algas a las células objetivo, estas células se tiñeron inmediatamente con el fluorocromo rojo del Nilo (concentración final de 3,9 µM) para teñir las gotitas de lípidos celulares (Nile Red: A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets, Greenspan et al., The Journal of Cell Biology, Vol. 100, 965 - 973, marzo de 1985). Las células teñidas se almacenaron 10 min en la oscuridad antes de la observación de las células en el microscopio de epifluorescencia (luz azul). El proceso de liberación de lípidos desde la matriz celular se siguió mediante el uso de intervalos de desde 15 min hasta 4 horas. Después de una corta exposición (de 1 - 4 h) a las citotoxinas de algas, se produjo la lisis de las células de algas ricas en lípidos, y las células se rompieron abriéndose, confirmando así el efecto citotóxico de las mencionadas sustancias tóxicas de algas. La observación microscópica reveló que en 1 h de exposición a estas citotoxinas de algas, la membrana celular donante comenzó a romperse tanto en *Dunaliella* como en *Phaeodactylum.* Después de la ruptura de la membrana celular (3 - 4 h), se liberaron gotitas de aceite desde la matriz celular al agua circundante. La liberación de lípidos puede no ser uniforme en las diferentes células; las gotitas de aceite todavía podían observarse en la matriz celular después de 4 h. Este proceso se observó mediante el uso de un microscopio de epifluorescencia (40 - 100 x, luz azul a 488 nm). Las gotitas de aceite, teñidas con el fluorocromo rojo del Nilo, eran de un color amarillo brillante, mientras que el resto de las células de las algas eran rojas (véanse las Figs. 1 - 6).

En las imágenes 1 - 6 se ha mostrado el efecto de las citotoxinas de algas sobre las células de *Dunaliella* ricas en lípidos.

Descripción de las imágenes 1 - 6.

Imagen 1: células de *Dunaliella* ricas en lípidos después de un estrés de nutrientes inducido (40 - 50 % de contenido de lípidos). Las gotitas de lípidos son las estructuras amarillas después de la tinción con rojo del Nilo (flechas blancas). Las estructuras rojas indican clorofilas, proteínas y carbohidratos (micrografía de epifluorescencia, 40 x).

Imagen 2: la lisis de células de *Dunaliella* libera gotitas de lípidos (flechas blancas) después de una exposición de 1,4 h a citotoxinas de algas. Las gotitas de lípidos son las estructuras amarillas después de la tinción con rojo del Nilo. Las estructuras rojas indican clorofilas, proteínas y carbohidratos (micrografía de epifluorescencia, 40 x).

Imagen 3: célula de *Dunaliella* con la membrana rota que libera gotitas de lípidos después de una exposición de 3,3 h a citotoxinas de algas. Las gotitas de lípidos son las estructuras amarillas después de la tinción con rojo del Nilo (flechas blancas). Las estructuras rojas indican clorofilas, proteínas y carbohidratos (micrografía de epifluorescencia, 100 x)

Imagen 4: la lisis completa de células de *Dunaliella* libera gotitas de lípidos (flechas blancas) después de una exposición de 3,3 h a citotoxinas de algas. Las gotitas de lípidos son las estructuras amarillas después de la tinción con rojo del Nilo. Las estructuras rojas indican clorofilas, proteínas y carbohidratos (micrografía de epifluorescencia, 100 x).

Imagen 5: la lisis de células de *Dunaliella* libera gotitas de lípidos (flechas blancas) después de una exposición de 3,3 h a citotoxinas de algas. Las gotitas de lípidos son las estructuras amarillas después de la tinción con rojo del Nilo. Las estructuras rojas indican clorofilas, proteínas y carbohidratos (micrografía de epifluorescencia, 100 x).

Imagen 6: gotitas de lípidos de *Dunaliella* (flechas blancas) liberadas en el medio circundante tras la destrucción celular. Las gotitas de lípidos son las estructuras amarillas después de la tinción con rojo del Nilo (micrografía de epifluorescencia, 100 x).

REIVINDICACIONES

1. Un método para la recuperación de lípidos a partir de un microorganismo productor de lípidos, que comprende las siguientes etapas

- proporcionar una biomasa de un microorganismo productor de lípidos,
- romper la pared celular y/o la membrana celular de dicho microorganismo mediante una citotoxina de algas, liberando así los lípidos a partir de la célula del microorganismo, y
- recuperar dichos lípidos.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo es un alga productora de lípidos.

3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la citotoxina de algas se elige de forma que rompa la pared celular y/o la membrana celular de una microalga elegida de entre el grupo que consiste en los géneros *Phaeodactylum, Rhodomonas, Cryptomonas, Thalassiosira, Cyclotella, Haematococcus* y *Dunaliella,* preferiblemente de los géneros *Phaeodactylum* y R*hodomonas* spp.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las algas productoras de lípidos se eligen de entre el grupo de cianobacterias, diatomeas, dinoflagelados, primnesiofitos y rafidofitos, preferiblemente de entre el grupo de los géneros *Anabaena, Aphanizomenon, Calothrix, Cylindrospermopsis, Fisherella, Gomphosphaeria, Hapalosiphon, Microcystis, Nodularia, Nostoc, Alexandrium, Coolia, Dinophysis, Heterocapsa, Karlodinium, Karenia, Ostreopsis, Peridinium, Prorocentrum, Chrysochromulina, Phaeocystis, Prymnesium, Pseudonitzschia, Nitzschia, Heterosigma y Chattonella.*

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el alga productora de citotoxinas se elige de entre el género *Alexandrium,* lo más preferiblemente de la especie *Alexandrium tamarense.*

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los lípidos son recuperados mediante extracción y/o centrifugación.

7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las células de las algas productoras de lípidos se producen mediante

- la recogida de las algas productoras de lípidos a partir del cultivo de algas, y
- el secado de las células de algas hasta un contenido de agua de menos del 80 % en peso.

8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el microorganismo/las células de algas se secan mediante evaporación, floculación y/o centrifugación.

9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha citotoxina de algas está en forma de una suspensión exenta de células del medio de cultivo de las algas citotóxicas.

10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la(s) citotoxina(s) se incuba(n) con la biomasa entre 2 y 24 horas, preferiblemente entre 3 y 12 horas.

11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las algas productoras de lípidos se eligen de entre el grupo de Clorophyceae (algas verdes), Cryptophyceae (algas criptofíceas), Chrysophyceae (algas pardas), Diatomophyceae (diatomeas), Dinophyceae (dinoflagelados), Euglenophyceae, Eustigmatophyceae, Pavlovophyceae, Pedinophyceae, Prasinophyceae, Prymnesiophyceae (algas haptofitas) o Raphidophyceae.

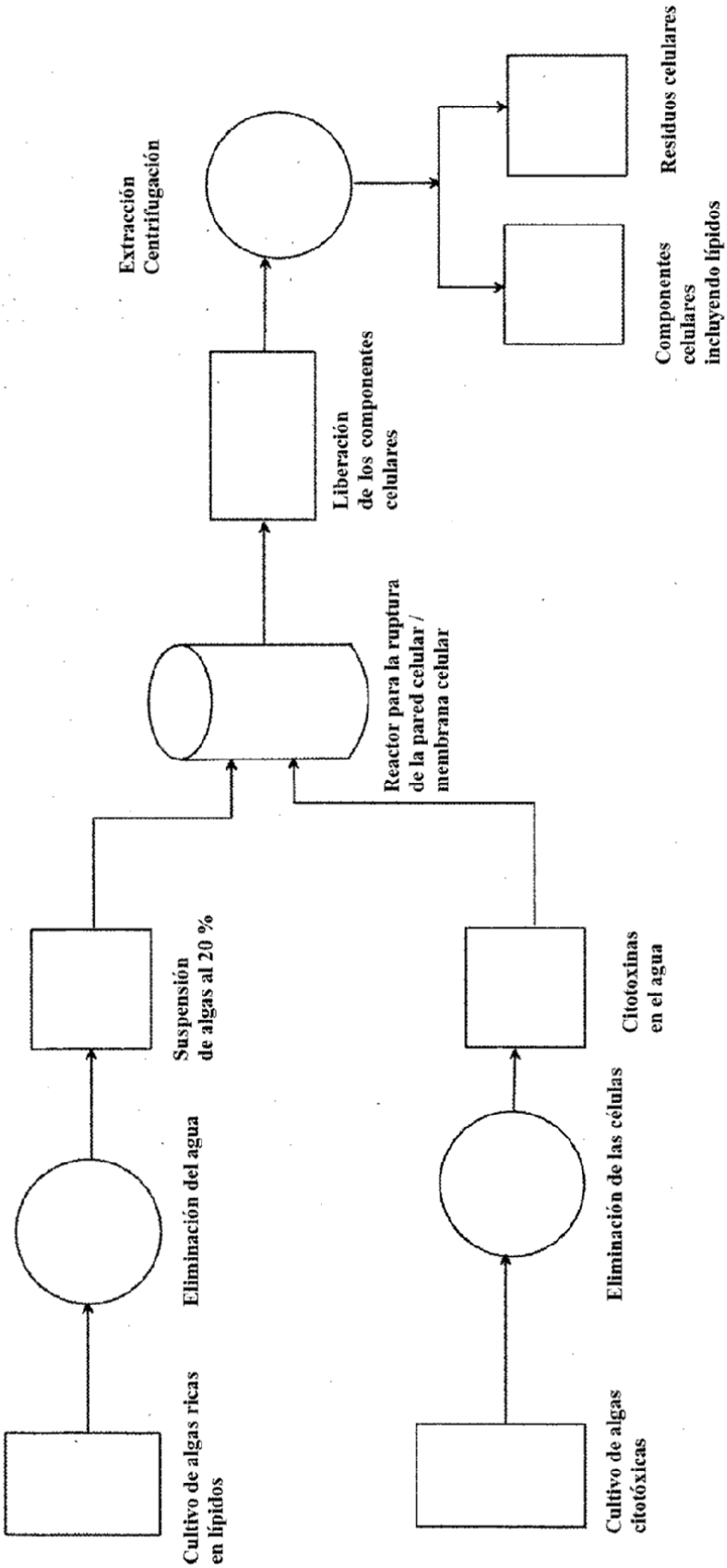
Cultivo de algas ricas en lípidos
Eliminación del agua
Suspensión de algas al 20 %
Cultivo de algas citotóxicas
Eliminación de las células
Citotoxinas en el agua
Reactor para la ruptura de la pared celular / membrana celular
Liberación de los componentes celulares
Extracción Centrifugación
Componentes celulares incluyendo lípidos
Residuos celulares

Fig. 1

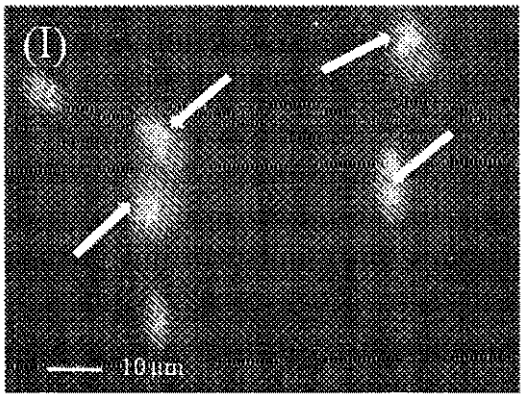

Imagen 1 Células de *Dunaliella* ricas en lípidos después de un estrés de nutrientes inducido (40 - 50 % de contenido de lípidos). Las gotitas de lípidos son las estructuras amarillas después de la tinción con rojo del Nilo (flechas blancas). Las estructuras rojas indican clorofilas, proteínas y carbohidratos (micrografía de epifluorescencia, 40 x).

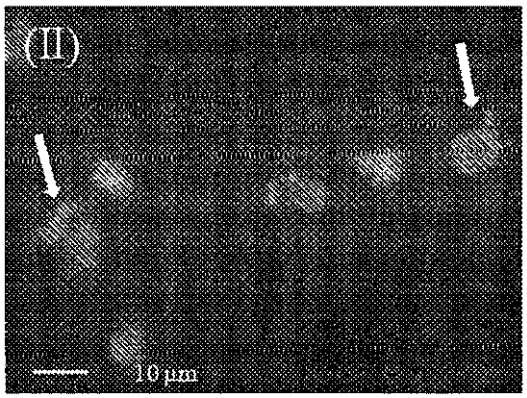

Imagen 2 La lisis de células de *Dunaliella* libera gotitas de lípidos (flechas blancas) después de una exposición de 1,4 h a citotoxinas de algas. Las gotitas de lípidos son las estructuras amarillas después de la tinción con rojo del Nilo. Las estructuras rojas indican clorofilas, proteínas y carbohidratos (micrografía de epifluorescencia, 40 x).

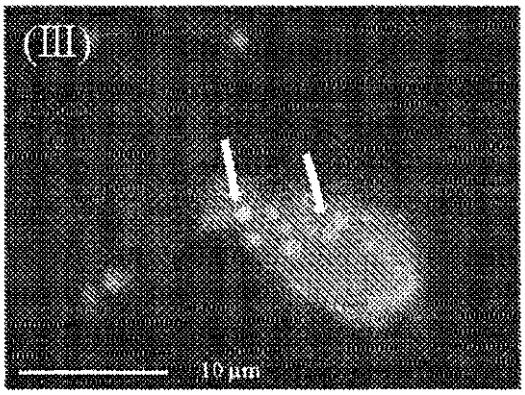

Imagen 3 Célula de *Dunaliella* con la membrana rota que libera gotitas de lípidos después de una exposición de 3,3 h a citotoxinas de algas. Las gotitas de lípidos son las estructuras amarillas después de la tinción con rojo del Nilo (flechas blancas). Las estructuras rojas indican clorofilas, proteínas y carbohidratos (micrografía de epifluorescencia, 100 x).

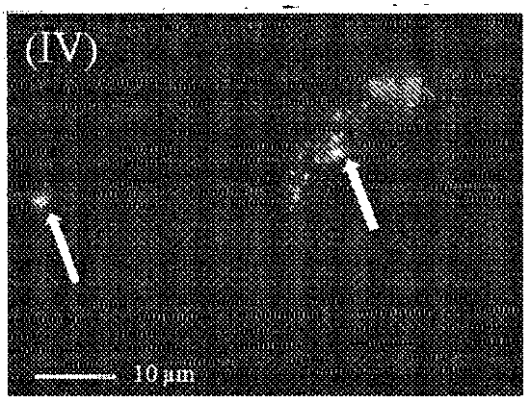

Imagen 4 La lisis completa de células de *Dunaliella* libera gotitas de lípidos (flechas blancas) después de una exposición de 3,3 h a citotoxinas de algas. Las gotitas de lípidos son las estructuras amarillas después de la tinción con rojo del Nilo. Las estructuras rojas indican clorofilas, proteínas y carbohidratos (micrografía de epifluorescencia, 100 x).

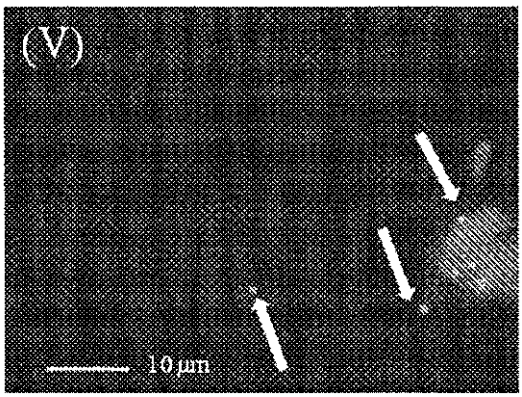

Imagen 5 La lisis de células de *Dunaliella* libera gotitas de lípidos (flechas blancas) después de una exposición de 3,3 h a citotoxinas de algas. Las gotitas de lípidos son las estructuras amarillas después de la tinción con rojo del Nilo. Las estructuras rojas indican clorofilas, proteínas y carbohidratos (micrografía de epifluorescencia, 100 x).

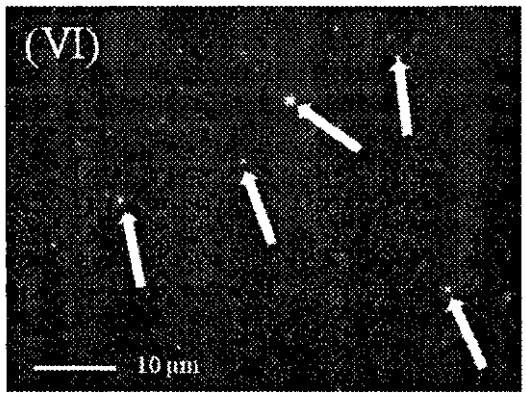

Imagen 6 Gotitas de lípidos de *Dunaliella* (flechas blancas) liberadas en el medio circundante tras la destrucción celular. Las gotitas de lípidos son las estructuras amarillas después de la tinción con rojo del Nilo (micrografía de epifluorescencia, 100 x).