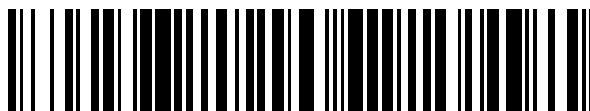


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 628**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
C05D 9/00 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
C12N 1/36 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2012** **PCT/GB2012/050194**
87 Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2012** **WO12101459**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2012** **E 12704896 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017** **EP 2668259**

54 Título: **Proceso para la producción de microalgas, cianobacterias y metabolitos de las mismas**

30 Prioridad:

28.01.2011 GB 201101487
28.01.2011 GB 201101489

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.07.2017

73 Titular/es:

ALGAECYTES LIMITED (100.0%)
Camburgh House 27 New Dover Road Canterbury
Kent CT1 3DN, GB

72 Inventor/es:

DODD, JOHN;
MARSALEK, BLAHSOLOV;
VOSATKA, MIROSLAV y
BASHIR, NAZIR

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 622 628 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

Proceso para la producción de microalgas, cianobacterias y metabolitos de las mismas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un proceso donde un cultivo de microalgas se expone a un estímulo con el fin de potenciar la producción de uno o más metabolitos. También se describe en la presente memoria, un proceso para la producción de microalgas y/o cianobacterias que comprende una etapa de adaptación donde se cultiva un cultivo de

10 algas/cianobacterias en el agua de alimentación del proceso y/o bajo diodos emisores de luz (LED) que emiten luz dentro del espectro de las longitudes de onda lumínicas entre aproximadamente 400 nm y 700 nm y una etapa de producción, donde las microalgas o cianobacterias se cultivan en el mismo agua de alimentación del proceso y/o en las mismas condiciones de luz utilizadas en la etapa de adaptación.

15 La presente invención integra métodos de cultivo de microalgas formadoras de lípidos preferiblemente en sistema(s) de fotobiorreactores, estanques abiertos u otros métodos de cultivo. Proporciona un proceso integrado y continuo para la producción de biomasa de algas y la conversión en subproductos de alto valor como EPA o biocombustibles. También se describe una cepa específica para su uso en la invención, a la que se hace referencia aquí como ALG02.

20 En la presente memoria se describe un proceso para aumentar la producción de exopolisacáridos (EPS) de una única cepa de microalgas (*Dictyosphaerium chlorelloides* ALG03) que está pre-ajustada/adaptada en cultivo para su posterior producción a gran escala usando espectros de iluminación LED definidos junto con el CO₂ de los residuos industriales y agua como nutriente y energía para el crecimiento en fotobiorreactores (FBR). Además, proporciona un proceso integrado y continuo para la producción de biomasa de algas antes/después de la extracción de hidratos

25 de carbono que puede usarse para otros propósitos posteriores, por ejemplo, para aumentar la disponibilidad de nutrientes y la adherencia del suelo en las zonas de las raíces de las plantas irrigadas con riego por goteo subterráneo; como biomasa para unidades de digestores anaerobios o plantas de bioetanol o para la producción de biogas. También se describe una cepa específica para su uso en la invención, a la que se hace referencia aquí como ALG03.

30 **Antecedentes de la invención**

Las algas son uno de los organismos que crecen más rápido en la tierra. Pueden reproducirse (floración) en cuestión de horas. Solo requieren CO₂ y luz para crecer en agua fresca, aguas residuales o agua de mar. Además, los niveles

35 elevados de nutrientes (principalmente nitrógeno y fosfatos) que se encuentran en el agua de los procesos industriales con otros compuestos que favorecen el crecimiento pueden aumentar el crecimiento de la biomasa por las algas (a).

Las algas están siendo objeto de interés tanto para futuros combustibles como para soluciones de tratamiento de

40 aguas residuales en investigaciones que se están llevando a cabo en todo el mundo. Esto se debe a que las algas, en el proceso de producir combustible de algas, pueden secuestrar las emisiones de CO₂ de fuentes industriales y ayudar a secuestrar los nutrientes (y algunos metales pesados) que se mantienen en el agua de proceso parcialmente tratada (b, c).

45 Las algas y las cianobacterias son también fuentes valiosas de metabolitos, por ejemplo ácidos grasos incluyendo ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido behénico, ácido láurico, ácido linoleico, ácido alfa y gamma linolénico, ácido esteárico, ácido araquidónico y ácido eicosapentaenoico. Además, las sustancias poliméricas extracelulares de las microalgas y las cianobacterias (de naturaleza polisacáridica) presentan propiedades bioquímicas únicas que las hacen interesantes desde el punto de vista biotecnológico. Las cianobacterias producen

50 exopolisacáridos complejos y sus aplicaciones incluyen revestimiento de alimentos, agentes emulsionantes y gelificantes, floculantes, viscosificantes e hidratantes en las industrias alimentaria y no alimentaria. También hay potencial para su uso como una fuente de nuevos compuestos en adhesivos de tejidos blandos en el sector sanitario (d). En el campo de la biorremediación, los polisacáridos extracelulares (EPS) pueden eliminar los metales pesados tóxicos de los suelos y aguas contaminadas (e, f) y en el reciclaje de aguas residuales de nutrientes y otros

55 elementos.

De lo anterior se desprende que las algas y cianobacterias representan recursos valiosos en muchas áreas diferentes de la tecnología, por lo que los presentes inventores buscaron desarrollar nuevos procesos para el

60 Hu et al. (Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grain (2003) Carbohydrate polymers. 54; 33-42) describe la caracterización de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) de cuatro cianobacterias filamentosas: *Microcoleus vaginatus*, *Scytonema javanicum*, *Phormidium tenue* y *Nostoc* sp., y un alga verde coccoide unicelular *Desmococcus olivaceus*.

65

Hu et al. (Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production; perspectives and advances. (2008) The Plant Journal. 54; 621-639) es un artículo de revisión relacionado con la síntesis de triacilgliceroles (TAG) por las algas. El documento resume entre otros el conocimiento de las algas oleaginosas y su biosíntesis de ácidos grasos y TAG, sistemas de modelos de algas y el potencial de uso de las algas en la investigación y comercialización de biocombustibles.

Molina Grima et al. (EPA from Isochrysis galbana. Growth Conditions and Productivity. (1992) Process Biochemistry 27; 299-305) describe la producción de EPA por el alga *Isochrysis galbana*. En el estudio descrito, se ensayaron los efectos de diversas condiciones de crecimiento sobre la producción de EPA.

Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un proceso para el aumento de la producción de (a) ácido eicosapentaenoico en microalgas seleccionadas de la familia Pleurochloridaceae o (b) exopolisacárido en microalgas de la especie *Dictyosphaerium chlorelloides*, comprendiendo dicho proceso las etapas de:

- (i) cultivar una cepa de microalgas seleccionada de la familia Pleurochloridaceae o de la especie *Dictyosphaerium chlorelloides* mediante una fase de producción;
- (ii) exponer el cultivo de microalgas a un estímulo, donde el estímulo comprende (a) una disminución del pH hasta un pH no mayor de aproximadamente pH 6, seguido de un aumento del pH hasta un pH no inferior a aproximadamente pH 7 y (b) un aumento de la irradiancia lumínica hasta al menos 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{segundo}$.

También se describe en la presente memoria un proceso para la producción o crecimiento de microalgas y/o cianobacterias o la producción de uno o más metabolitos derivados de las mismas, proceso que comprende:

- (i) una etapa de adaptación, que comprende cultivar microalgas o cianobacterias:
 - (a) en el agua de alimentación del proceso y seleccionar aquellas microalgas o cianobacterias capaces de crecer en el agua de alimentación del proceso y/o
 - (b) bajo diodos emisores de luz (LED) que emiten 2 picos de luz roja y azul dentro del espectro de las longitudes de onda lumínicas entre aproximadamente 400 y 700 nm y
- (ii) una fase de producción, que comprende cultivar las microalgas o cianobacterias seleccionadas de (i) en el mismo agua de alimentación del proceso utilizada en la etapa de adaptación y/o en las mismas condiciones de luz utilizadas en la etapa de adaptación.

También se describe en la presente memoria un microorganismo que es, o tiene las características de identificación de, una cepa de *Chlorogibba allorgei* depositada en la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos con el número de acceso CCAP 817/1, o una cepa mutante derivada de la misma. La cepa de *Chlorogibba allorgei* depositada con el número de acceso CCAP 817/1 también se denomina aquí ALG02.

Se describe adicionalmente en la presente memoria un microorganismo que es o tiene las características de identificación de una cepa de *Dictyosphaerium chlorelloides* depositada en la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos con el número de acceso CCAP 222/98 o una cepa mutante derivada de la misma. La cepa de *Dictyosphaerium chlorelloides* depositada con el número de acceso CCAP 222/98 también se denomina aquí ALG03.

El proceso descrito en la presente memoria puede ser para el aumento de la producción de microalgas que contienen bioproteínas, lípidos y metabolitos valiosos comercialmente incluyendo ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido mirístico, ácido palmítico, ácido behénico, ácido láurico, ácido linoleico, ácido alfa linolénico y ácido esteárico. El proceso utiliza longitudes de onda de luz optimizadas para el cultivo y la producción preferiblemente en fotobiorreactores de cepas de microalgas ricas en lípidos tales como las del filo Chlorophyta y seleccionadas de la familia Pleurochloridaceae. Se usan subproductos industriales tales como agua de proceso y CO_2 como fuentes recuperadas de nutrientes y carbono para ajustar/adaptar las algas para un mayor crecimiento utilizando estos insumos.

También se describe un proceso único en dos etapas para la optimización de la producción de un exopolisacárido comercialmente valioso en algas, en particular en *Dictyosphaerium chlorelloides* y puede aplicarse a una cepa de microalgas específica. El proceso tiene lugar en un sistema fotobiorreactor (FBR). El proceso aprovecha el dióxido de carbono (CO_2)/agua del proceso industrial para cultivar el alga y aumentar las tasas de crecimiento en condiciones similares en el sistema de FBR escalado. El proceso utiliza el cultivo de pre-adaptación del alga para ajustar el organismo al uso escalado de agua del proceso/ CO_2 y la iluminación de LED. Esto, a su vez, permite que el alga produzca niveles elevados de un exopolisacárido con usos comerciales. La biomasa de algas cargada de hidratos de carbono se puede emplear en el riego de cultivos como un fertilizante rico en nutrientes y con un alto contenido de carbono o, en otra alternativa, en la producción de energía en procesos posteriores (producción de bioetanol u otros sistemas de biomasa energética, por ejemplo, digestores anaeróbicos o vasos de fermentación).

En la presente memoria se describe además un nuevo proceso de producción con rendimientos elevados de un exopolisacárido a partir de una cepa adaptada de *Dictyosphaerium chlorelloides* ALG03 que se ha desarrollado para crecer a altas velocidades en una fuente secundaria de aguas residuales tratadas bajo luces LED ajustadas. Este tratamiento duplica el rendimiento del polisacárido extracelular del 38 % al 77 % observado en la fase de adaptación del crecimiento. El alto porcentaje de polisacárido producido puede ser trasladado a un proceso posterior donde el polímero se puede extraer para una variedad de usos. La biomasa residual que queda después de la extracción de los hidratos de carbono puede utilizarse tanto para alimentación animal (si se utiliza agua pura en el biorreactor) como para la producción de energía, por ejemplo, en digestores anaerobios, procesos de fermentación o sistemas de pirólisis.

En la presente memoria se describe una cepa específica (aislada) de algas pertenecientes a la familia de *Dictyosphaeriaceae* y en particular al género *Dictyosphaerium*, más específicamente una cepa de *Dictyosphaerium chlorelloides*. La cepa se depositó en la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos con el número de acceso CCAP 222/98 y se aceptó el 25 de enero de 2011. Esta cepa se muestra en la presente memoria como útil en la producción de metabolitos específicos.

Se describe adicionalmente en la presente memoria un nuevo proceso de utilización de la biomasa de algas producida como acondicionador de suelo específico utilizando sistemas de riego por goteo subterráneo (SDI). La biomasa cultivada dentro del agua tratada pasa a un tanque de retención de riego listo para mezclarse con agua de riego normal y otros productos químicos compatibles. El suministro de dosis de las células de algas que ya han absorbido fosfatos y nitratos junto con otros nutrientes de los desechos o del agua de proceso ayuda a proporcionar un fertilizante de 'liberación lenta natural' a la zona de las raíces de las plantas. También aumenta el carbono en los suelos y ayuda a agregar las partículas de suelo alrededor de las raíces en desarrollo de las plantas, evitando la erosión del suelo, que es vital en las zonas áridas.

Estos y otros objetos, que se pondrán de manifiesto durante la siguiente descripción detallada, se han logrado mediante el descubrimiento de los inventores de que la formación de exopolisacárido por cepas de algas pre-ajustadas/adaptadas puede duplicar los rendimientos del biopolímero rico en hidratos de carbono mediante la manipulación de su pre-cultivo y manejo durante el crecimiento en FBR.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 Adaptación de iluminación LED - Perfil FAME.

Perfiles FAME de HPLC aumentados bajo luces LED ajustadas en comparación con la iluminación fluorescente de una especie de *Scenedesmus* (ALG05), que tenía 6 meses de pre-exposición a la iluminación LED PAR (400-700 nm) con 6 ciclos de sub-cultivo.

Los perfiles de HPLC (FAME) obtenidos a partir de cepas de algas cultivadas utilizando iluminación LED PAR solo en ciclos de 24 horas durante 6 meses (6 sub-cultivos). Obsérvese la aparición de ácidos grasos de mayor peso molecular (flecha en la imagen derecha) en comparación con la misma cepa cultivada con iluminación fluorescente (imagen izquierda) de la misma irradiancia.

Fig. 2 Aumento del crecimiento en el agua de proceso tratada con pre-cultivo.

Aumento del crecimiento de *Trachydiscus* sp. (ALG01), *Chlorella* sp. (ALG04) y *Scenedesmus* sp. (ALG05) mediante pre-cultivo con 6 meses (6 ciclos) de exposición al agua de proceso tratada y luces LED PAR ajustadas (27 °C y 24 horas de luz).

Las células adaptadas se cultivaron durante 6 meses en agua de una planta de proceso (tratamiento secundario) y se volvieron a cultivar cada 4 semanas en agua de proceso fresca. Se cultivaron células no adaptadas en medio de crecimiento ZBB estándar 100 % y se volvieron a cultivar cada 4 semanas en medio nuevo ZBB. A continuación, ambas cepas se cultivaron durante 9 días (hasta la fase estacionaria) en el agua de proceso nueva. Los resultados muestran una clara adaptación al entorno del agua de proceso y la iluminación LED por células pre-adaptadas.

Fig. 3 Contenido de lípidos de diferentes cepas.

Comparación de la producción de hidratos de carbono/lípidos/proteínas por cepas en fase de crecimiento exponencial y valores caloríficos de la biomasa. Los cultivos se cosecharon en la fase de crecimiento exponencial.

Fig. 4 Producción de ácido eicosapentaenoico (EPA) en una cepa de *Chlorogibba* sp. (ALG02)

Porcentaje de contenido de ácidos grasos principales en la muestra de biomasa producida en condiciones de crecimiento subóptimo (sin adición de CO₂ o irradiancia PAR) y analizados por cromatografía capilar. Otros análisis de esta cepa y *Trachydiscus* sp. ALG01 cultivada utilizando fuentes de luz PAR y a la que se añadió CO₂ han mostrado porcentajes de EPA en el intervalo del 30-38 % del contenido total de ácidos grasos. Se han detectado niveles significativos de ácidos grasos palmítico y mirístico en los análisis bajo iluminación PAR controlada.

La **Fig. 5A y B** son gráficos que muestran los resultados de trabajos experimentales que ilustran la relación entre las concentraciones de nutrientes y los niveles de luz y el crecimiento de la cepa de algas *Dictyosphaerium chlorelloides* ALG03.

5A. Requisitos de bajos niveles de nutrientes

El crecimiento durante 4 días en el medio basal de Bold para algas muestra que el alga necesita niveles relativamente bajos de nutrientes para un crecimiento óptimo a 27 °C bajo irradiancia óptima de luz.

5B. Niveles de irradiancia lumínica LED para el crecimiento

El gráfico muestra que el alga crece mejor en condiciones de poca luz durante 7 días en medio BB 25 % a 27 °C.

La **Fig. 6** Es una ilustración esquemática de un sistema para producir biopolímero de algas de acuerdo con la presente invención para su uso en el riego.

La **Fig. 7** es un gráfico que muestra la recolección secuencial de *Dictyosphaerium chlorelloides* ALG03. La biomasa se muestra como lecturas de densidad óptica (680 nm) en un FBR que muestra que la cosecha diaria a tasas del 50 % permite el nuevo crecimiento de la misma biomasa de *Dictyosphaerium chlorelloides* ALG03 en 24 horas cuando se rellena con nuevo medio de crecimiento.

La **Fig. 8** muestra la adaptación de la cepa a las aguas residuales y la iluminación LED, lo que aumenta las tasas de crecimiento en comparación con la cepa no adaptada.

Aumento del crecimiento de *Dictyosphaerium chlorelloides* por adaptación fisiológica con 6 meses (6 ciclos) de exposición a aguas residuales y luces LED PAR ajustadas (27 °C y 24 horas de luz).

La **Fig. 9** muestra la duplicación de EPS después del final de la segunda fase de cultivo (imagen a la derecha).

La **Fig. 10** muestra la comparación de los contenidos de hidratos de carbono/lípidos/proteínas de las células de 3 organismos y los valores caloríficos.

Comparación de la producción de hidratos de carbono/lípidos/proteínas por una cepa de *Dictyosphaerium chlorelloides* ALG03 en fase logarítmica de crecimiento y valores caloríficos de la biomasa. Los cultivos se cosecharon en la fase de crecimiento exponencial.

La **Fig. 11** muestra los resultados del uso del riego por goteo para cultivar puerros en un suelo arenoso infértil en un ensayo en invernadero durante un período de 12 semanas.

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona un proceso para el aumento de la producción de (a) ácido eicosapentaenoico en microalgas seleccionadas de la familia Pleurochloridaceae o (b) exopolisacárido en microalgas de la especie *Dictyosphaerium chlorelloides*, comprendiendo dicho proceso las etapas de:

(i) cultivar una cepa de microalgas seleccionada de la familia *Pleurochloridaceae* o de la especie *Dictyosphaerium chlorelloides* mediante una fase de producción;

(ii) exponer el cultivo de microalgas a un estímulo, donde el estímulo comprende (a) una disminución del pH hasta un pH no mayor de aproximadamente pH 6, seguido de un aumento del pH hasta un pH no inferior a aproximadamente pH 7 y (B) un aumento de la irradiancia lumínica hasta al menos 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{segundo}$.

En el contexto de la presente invención, el término “cultivo” se usa para indicar el crecimiento de una o más cepas de microalgas en cualquier medio adecuado. Dichos medios pueden incluir medios de crecimiento estándar como serían conocidos por un experto en la materia, por ejemplo, el medio basal de Bold o equivalente. En una realización preferida, las cepas de microalgas se cultivan en agua de proceso, donde la expresión “agua de proceso” incluye agua de proceso procedente de sistemas industriales y aguas residuales domésticas. El agua del proceso puede ser tratada antes de su uso (por ejemplo, esterilizada o no) y suplementada con nutrientes de manera que los niveles de nutrientes estén dentro de los intervalos observados en los medios de crecimiento estándar.

El cultivo puede ser un lote, un lote alimentado o un cultivo al menos parcialmente continuo (antes de la fase estacionaria) en ciertas realizaciones.

La fase de producción

El crecimiento de la cepa de microalgas durante la fase de producción generalmente ocurre a una velocidad exponencial. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la fase de producción corresponde a la fase exponencial del crecimiento del cultivo.

La “fase exponencial”, también conocida como “fase log” o “fase logarítmica”, es un período definido durante el cultivo discontinuo de microorganismos, incluyendo microalgas, caracterizado por la duplicación de las células. El número de nuevos organismos que aparecen por unidad de tiempo es proporcional a la población existente. Si el crecimiento no es limitado, la duplicación continuará a una tasa constante de modo que tanto el número de células como la tasa de aumento de población se duplican con cada período de tiempo consecutivo. La velocidad de crecimiento real puede variar dependiendo de la cepa del microorganismo utilizado y/o de las condiciones de crecimiento.

Las condiciones medioambientales o de cultivo utilizadas durante la fase de producción pueden seleccionarse específicamente para permitir un crecimiento exponencial de la cepa de microalgas que se está utilizando.

En ciertas realizaciones, la densidad celular para la cepa de microalgas en el punto en que el crecimiento exponencial comienza a cesar, antes del comienzo de la fase estacionaria, el final de la fase exponencial de producción, no debe ser inferior a 10^8 células por ml de medio de cultivo y preferiblemente entre 10^7 y 10^8 células por ml. Las condiciones de cultivo utilizadas para conseguir un crecimiento óptimo del cultivo o crecimiento exponencial del cultivo pueden seleccionarse de entre las siguientes:

- luz artificial continua de longitud de onda entre aproximadamente 400 nm y 700 nm y/o
- luz artificial continua de entre aproximadamente $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ y $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ y/o
- temperatura entre aproximadamente 20°C y 40°C y/o
- niveles de oxígeno entre aproximadamente 500 mV y 800 mV y/o
- pH entre aproximadamente pH6 y pH9.

El experto en la materia entenderá que las condiciones de cultivo pueden variarse dependiendo de la cepa de microalgas a cultivar. Las condiciones específicas se describen en la presente memoria para cepas específicas de la invención y tales condiciones pueden usarse como una guía para aplicar a otras cepas, como sería entendido por un experto en la materia.

En realizaciones preferidas de la invención, el cultivo o crecimiento de la cepa de microalgas durante la fase de producción se produce en un fotobiorreactor (FBR). Tal como se utiliza en la presente memoria, un fotobiorreactor debe entenderse como un biorreactor que incorpora una o más fuentes de luz para proporcionar una entrada de energía fotónica al reactor. En realizaciones preferidas, las microalgas crecen en un sistema cerrado al entorno (externo). Las fuentes de luz preferidas incluyen diodos emisores de luz (LED) y, en particular, LED que emiten luz PAR (radiación fotosintéticamente activa en el intervalo de 400-700 nm). En ciertas realizaciones, un FBR puede configurarse de manera que incluya fuentes de luz LED (muy ajustadas) diseñadas para proporcionar iluminación de ángulo de 360 grados desde el centro del biorreactor para maximizar el crecimiento de diferentes cepas de algas alrededor de la fuente de luz. En realizaciones preferidas, la luz es suministrada por LED que emiten 2 picos de luz roja y azul dentro del espectro PAR de 400-700nm. En una realización preferida, la luz es suministrada por LED que emiten un pico de luz roja en el intervalo entre aproximadamente 500-665 nm, preferiblemente aproximadamente 660 nm y un pico de luz azul en el intervalo entre aproximadamente 440-500 nm, preferiblemente aproximadamente 460 nm.

Cuando la fase de producción se lleva a cabo en un FBR, la densidad para la cepa de microalgas no debe ser inferior al 10 % (v/v) del volumen del FBR al comienzo de la fase de producción. En las mismas realizaciones o realizaciones alternativas, los cultivos de microalgas no están expuestos a la luz solar natural.

El estímulo

En la segunda etapa del proceso de la invención, el cultivo de microalgas se expone a un estímulo, donde el estímulo comprende, consiste esencialmente en (a) una disminución del pH hasta un pH no superior a aproximadamente pH 6 seguido por un aumento del pH hasta un pH no inferior a aproximadamente pH 7, y (b) un aumento de la irradiancia lumínica hasta al menos aproximadamente $400 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{segundo}$.

El pH del cultivo durante la fase de producción estará generalmente en la región de aproximadamente pH 7-9 y, por lo tanto, el estímulo puede comprender una disminución del pH desde un pH de entre aproximadamente 7 y 9 hasta un pH entre aproximadamente pH 3 y pH 6, preferiblemente entre aproximadamente pH 5 y pH 6. El pH del cultivo puede disminuirse y aumentarse posteriormente por cualquier medio adecuado conocido por el experto en la materia, siempre que la viabilidad del cultivo no se vea comprometida. En una realización preferida, el pH se reduce por la adición de dióxido de carbono, CO_2 .

La irradiancia lumínica suministrada al cultivo durante la fase de producción estará generalmente en la región de 50-200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ y por lo tanto el estímulo puede comprender un aumento de la irradiancia lumínica entre aproximadamente 50-200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ entre aproximadamente 400-2000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$. La fuente de luz comprende preferiblemente, consiste esencialmente en o consiste en uno o más LED.

El cultivo de microalgas se expone generalmente al estímulo una vez que el cultivo ha alcanzado el pico de crecimiento de fase exponencial. Este pico se produce inmediatamente antes del comienzo de la fase estacionaria. La fase estacionaria es un periodo bien definido durante el cultivo discontinuo de microorganismos, incluyendo microalgas, donde la velocidad de crecimiento del cultivo se ralentiza, generalmente como resultado del agotamiento de los nutrientes y la acumulación de productos tóxicos. Durante esta fase, la tasa de crecimiento de microorganismos es generalmente igual a la tasa de mortalidad de los microorganismos. El experto en la materia comprenderá que cualquier cultivo de microalgas experimenta una transición del pico de crecimiento exponencial a la fase estacionaria. El cultivo puede estar expuesto al estímulo en cualquier momento durante el pico de

crecimiento de fase exponencial o en cualquier momento durante la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria.

La tasa de crecimiento de las microalgas puede controlarse a lo largo de la fase de producción, por ejemplo, utilizando técnicas de muestreo tales como recuentos celulares o midiendo los niveles de clorofila *a* en el cultivo. El número de células se puede determinar usando muestreo espectrofotométrico del cultivo, por ejemplo, tomando lecturas a aproximadamente una de DO 680 nm. Estas medidas pueden ser utilizadas para identificar la fase exponencial del crecimiento, el pico de crecimiento de la fase exponencial y el momento en el que el cultivo empieza a entrar en la fase estacionaria de crecimiento. Se puede emplear cualquier técnica adecuada.

El estímulo comprende como mínimo una disminución del pH hasta un pH no superior a aproximadamente pH 6 seguido de un aumento del pH hasta un pH no inferior a aproximadamente pH 7 y un aumento de la irradiancia lumínica hasta al menos 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$. El estímulo puede comprender adicionalmente la adición de una fuente de carbono, donde la fuente de carbono es CO_2 en sus diversas formas.

En realizaciones preferidas, la disminución y el subsiguiente aumento del pH preceden al aumento de la irradiancia lumínica. El pH puede reducirse hasta un pH no superior a aproximadamente pH 6, preferiblemente entre aproximadamente pH 5 y pH 6, durante un periodo de entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 2 horas. Posteriormente, el pH puede aumentarse hasta un pH entre aproximadamente pH 6 y pH 9, preferiblemente entre aproximadamente pH 7 y pH 9. El pH puede elevarse usando cualquier medio adecuado, siempre que esto no comprometa la viabilidad del cultivo. En general, el pH se restaura a los niveles pre-estímulo.

En ciertas realizaciones, el cultivo de microalgas se cultiva durante un período adicional de crecimiento de al menos aproximadamente 12, 24, 36, 48 horas, etc., después de que comience la exposición al estímulo. En las realizaciones en las que el pH disminuye durante un periodo comprendido entre aproximadamente 30 minutos y 2 horas, y subsiguientemente elevado, por ejemplo, a niveles pre-estímulo, el periodo de cultivo después de la exposición al estímulo puede calcularse a partir del momento de disminución del pH inicial, o desde el momento en que se restaura el pH y se aumenta posteriormente la irradiancia.

Producción de metabolitos

Un efecto de la exposición de la cepa de microalgas al estímulo es inducir o promover la producción de metabolitos particulares dentro de las microalgas. Los presentes inventores han observado que la exposición de ciertas cepas de microalgas al estímulo como se define en la presente memoria, conduce a la producción de grandes cantidades de metabolitos particulares, dependiendo el metabolito particular de la cepa del microorganismo utilizado. El propósito de llevar a cabo el proceso reivindicado descrito anteriormente es, por tanto, mejorar la producción de uno o más metabolitos en células de microalgas. Tales metabolitos se recogen generalmente después del período adicional de crecimiento después de que el cultivo haya sido expuesto al estímulo. Los metabolitos pueden recogerse, purificarse y/o analizarse utilizando cualquier medio adecuado conocido por los expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en Bligh, E.G. Y Dyer, W.J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. Can.J.Biochem.Physiol. 37:911-917.

Los lípidos también pueden ser cosechados/analizados de acuerdo con procesos estándar industriales tales como las variantes de CO_2 supercrítico en extracciones con disolvente, destilación fraccionada y cromatografía, o de acuerdo con el siguiente protocolo:

Se mezclan 25 mg de muestra de producto de algas con el patrón interno si se usa para medidas de GC-MS en tubos de cultivo. Añadir 1,5 ml de hidróxido de sodio 0,5 N en metanol, tapar los tubos y calentar a 100 °C durante 5 minutos. Dejar enfriar y añadir 2 ml de reactivo de BF₃/metanol, tapar los tubos, mezclar y calentar a 100 °C durante 30 minutos. Dejar enfriar y añadir 2 ml de isohexano + BHT y después 5 ml de cloruro de sodio saturado, tapar el tubo y agitar vigorosamente durante 30 segundos. Enfriar a temperatura ambiente y dejar que las capas se separen. La capa de isohexano superior se coloca en una columna corta de sulfato sódico anhidro y se recoge. La capa acuosa se extrae con 2 ml de isohexano + BHT (hidroxitolueno butilado) y la capa superior de isohexano se coloca en la columna de sulfato sódico anhidro y el disolvente se recoge con la otra muestra. La columna se lava con 2 ml de iso-hexano + BHT y también se coloca en el mismo tubo de muestra.

Los polisacáridos pueden analizarse por técnicas de cromatografía disponibles para los expertos en la materia. El análisis de hidratos de carbono y alcoholes de azúcar puede realizarse en extractos de biomasa de microalgas mediante cromatografía de intercambio aniónico a pH elevado (HPAE) seguida de detección electroquímica (IPAD) y detección de espectrometría de masas en paralelo. En una realización preferida, el extracto de muestra se analiza utilizando un sistema modular ICS-5000 acoplado a un espectrómetro de masas MSQ Plus. Los analitos se separan en una columna CarboPac MA1 usando una condición isocrática. Después de la columna analítica, se divide el efluente de las columnas, de modo que la mitad de éste fluye a través de la célula de amperometría, donde se realiza la detección amperométrica integrada y pulsada (IPAD), mientras que la otra mitad se desaliniza continuamente utilizando un dispositivo de desalinización de membrana (ASRS). El efluente neutralizado se mezcla a continuación con una solución acuosa de cloruro de litio para facilitar la detección de los hidratos de carbono en la

EM como sus aductos de litio.

La biomasa gastada puede, a su vez, ser utilizada para una variedad de aplicaciones, incluyendo, pero sin limitarse a, alimentación de rumiantes, alimentación de ganado, acuicultura, pienso para aves de corral, fracción de hidratos de carbono para producción de bioetanol de la biomasa y extracción de valiosos aminoácidos a partir de proteínas.

En ciertas realizaciones, el proceso de la invención es para el aumento de la producción de ácido eicosapentaenoico (EPA). El proceso descrito en la presente memoria puede utilizarse en particular para obtener perfiles de ácidos grasos deseados en las cepas de microalgas cultivadas, para optimizar la producción de EPA en cepas productoras de EPA. La EPA producida por medio del proceso descrito en la presente memoria puede, por ejemplo, ser utilizada en el sector alimentario, para la producción de biocombustibles líquidos, para ingredientes cosméticos.

En ciertas realizaciones, el proceso de la invención es para el aumento de la producción de exopolisacárido (EPS).

Microalgas/Cianobacterias

Las microalgas para su uso junto con el proceso de la presente invención se seleccionan de la familia Pleurochloridaceae y *Dictyosphaerium chlorelloides* de acuerdo con las presentes reivindicaciones.

En realizaciones en las que el proceso se va a utilizar para el aumento de la producción de ácido eicosapentaenoico, se prefiere que la cepa de microalgas se seleccione de *Trachydiscus* sp. y *Chlorogibba* sp., y es en particular, la cepa de *Chlorogibba allorgei* depositada en la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos con el número de acceso CCAP 817/1 (también denominada ALG02), o una cepa mutante derivada de la misma.

En realizaciones en las que el proceso se va a usar para el aumento de la producción de exopolisacárido, se prefiere que la cepa de microalgas sea en particular la cepa de *Dictyosphaerium chlorelloides* depositada en la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos con el número de acceso CCAP 222/98 (también denominada ALG03), o una cepa mutante derivada de la misma.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "cepa mutante" pretende significar una cepa derivada de la cepa de microalgas original, que retiene las características de la cepa de origen en la medida en que dichas características se relacionan con el perfil de metabolitos producidos cuando la cepa se expone a un estímulo de acuerdo con el proceso de la invención, descrito anteriormente.

Las microalgas para su uso junto con el proceso de la presente invención pueden haber sido preseleccionadas, por ejemplo en base a un crecimiento óptimo en las mismas condiciones de cultivo que las utilizadas durante la fase de producción. Esta etapa de preselección o adaptación, que puede preceder a las etapas del proceso detallado anteriormente, se describe con más detalle a continuación. Todas las realizaciones descritas a continuación en la presente memoria son aplicables al primer aspecto de la invención.

En la presente memoria se describe un proceso para la producción o crecimiento de microalgas y/o cianobacterias o la producción de al menos un metabolito derivado de las mismas, cuyo proceso comprende:

(i) una etapa de adaptación, que comprende cultivar microalgas o cianobacterias:

(a) en el agua de alimentación del proceso y seleccionar aquellas microalgas o cianobacterias capaces de crecer en el agua de alimentación del proceso y/o

(b) bajo diodos emisores de luz (LED) que emiten 2 picos de luz roja y azul dentro del espectro de las longitudes de onda lumínicas entre aproximadamente 400 y 700 nm y

(ii) una fase de producción, que comprende cultivar las microalgas o cianobacterias seleccionadas de (i) en el mismo agua de alimentación del proceso utilizada en la etapa de adaptación y/o en las mismas condiciones de luz utilizadas en la etapa de adaptación.

Adaptación

El agua de alimentación del proceso puede ser obtenida de sistemas de procesos industriales o sistemas de aguas residuales domésticas. En dicho material de alimentación existen generalmente importantes nutrientes para el crecimiento de las algas tales como nitratos y fosfatos. También pueden estar presentes otros estimulantes de las algas, tales como elementos menores y vitaminas. Los sectores de los alimentos, refrescos y cervecerías tienen muchos flujos de agua de este tipo adecuados. Otras fuentes de agua dulce menos ricas en nutrientes pueden usarse si se añaden nutrientes equivalentes a los niveles usados en los medios de crecimiento estándar.

Las microalgas o cianobacterias se cultivan generalmente en el agua de alimentación del proceso durante la etapa de adaptación en condiciones óptimas de cultivo incluyendo, pero sin limitarse a lo siguiente:

- luz artificial continua de longitud de onda entre aproximadamente 400 nm y 700 nm y/o
- luz artificial continua de entre aproximadamente 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ y 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ y/o
- temperatura entre aproximadamente 20 °C y 29 °C y/o
- pH entre aproximadamente pH 7 y pH 9.

5 El agua de proceso puede ser pre-acondicionada, por ejemplo para reducir las partículas. El crecimiento de microalgas o cianobacterias durante la etapa de adaptación se puede llevar a cabo utilizando matraces Erlenmeyer (100-500 ml) o fotobiorreactores preparativos. La luz puede ser suministrada por fuentes LED u otra luz no natural. En una realización preferida, la luz es suministrada por LED que emiten 2 picos de luz roja y azul dentro del espectro de PAR de 400-700 nm. En una realización preferida adicional, la luz es suministrada por LED que emiten un pico de luz roja en el intervalo entre aproximadamente 500-665 nm, preferiblemente aproximadamente 660 nm y un pico de luz azul en el intervalo entre aproximadamente 440-500 nm, preferiblemente aproximadamente 460 nm.

10 En ciertas realizaciones, el objetivo de la etapa de adaptación es identificar cepas de microalgas o cianobacterias que sean capaces de crecer en el agua de alimentación del proceso para ser usadas en la fase de producción del proceso.

15 En otra alternativa, o adicionalmente, la luz puede usarse para adaptar o “ajustar” las microalgas o cianobacterias a las condiciones que se utilizarán en la fase de producción, preferiblemente para optimizar el crecimiento durante la fase de producción. En una realización preferida, la fase de adaptación implica el crecimiento de algas y/o cianobacterias bajo LED que emiten 2 picos de luz roja y azul dentro del espectro PAR de 400-700 nm. En una realización preferida adicional, la luz es suministrada por LED que emiten un pico de luz roja en el intervalo entre aproximadamente 500-665 nm, preferiblemente aproximadamente 660 nm y un pico de luz azul en el intervalo entre aproximadamente 440-500 nm, preferiblemente aproximadamente 460 nm.

20 La etapa de adaptación puede implicar cultivar las cepas de microalgas o cianobacterias durante un período de al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6 meses, preferiblemente al menos aproximadamente 3 meses. La etapa de adaptación puede implicar cultivar las cepas de microalgas o cianobacterias durante al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 generaciones de cultivo, preferiblemente al menos aproximadamente 6 generaciones de cultivo. En las realizaciones donde las microalgas o cianobacterias se cultivan durante varios meses o durante al menos 2 generaciones de cultivo, las microalgas o cianobacterias pueden ser subcultivadas, donde subcultivar se entiende que significa la transferencia de parte o la totalidad del cultivo a un nuevo medio de crecimiento. En una realización preferida, las microalgas o cianobacterias se subcultivan una vez al mes o una vez cada 4 semanas.

25 Una vez que se ha seleccionado una cepa de microalgas o cianobacterias de acuerdo con la etapa de adaptación descrita anteriormente, la segunda etapa del proceso es la fase de producción, la cual comprende cultivar las microalgas o cianobacterias seleccionadas en la misma agua de alimentación del proceso y/o en las mismas condiciones de luz utilizadas en la etapa de adaptación.

30 La expresión “el mismo” agua de alimentación del proceso se entiende que significa agua de proceso del mismo lote, es decir, con las mismas características, que se utilizan para la etapa de adaptación, en lugar de los mismos medios exactos utilizados para el crecimiento de las células durante la etapa de adaptación.

35 La fase de producción puede llevarse a cabo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de la fase de producción como se ha descrito anteriormente para el proceso del primer aspecto. Por ejemplo, el crecimiento de la cepa adaptada de microalgas o cianobacterias puede llevarse a cabo en condiciones que permitan un crecimiento exponencial. Además, el crecimiento durante la fase de producción se lleva a cabo preferiblemente en un fotobiorreactor de acuerdo con las definiciones anteriores. Las condiciones utilizadas en la fase de producción pueden reflejar las condiciones utilizadas en la etapa de adaptación. Por lo tanto, además de utilizar agua de proceso como materia prima, la adaptación puede extenderse a condiciones ambientales adicionales, como se ha indicado anteriormente (longitud de onda de luz, niveles de irradiancia, temperatura, pH, etc.). Más específicamente, la adaptación puede consistir en el uso de iluminación por LED como se describe en la presente memoria. En una realización preferida, la adaptación es a la iluminación de LED suministrada a 2 picos de luz roja y azul dentro del espectro de PAR de 400-700 nm. En una realización preferida adicional, la luz es suministrada por LED que emiten un pico de luz roja en el intervalo entre aproximadamente 500-665 nm, preferiblemente aproximadamente 660 nm y un pico de luz azul en el intervalo entre aproximadamente 440-500 nm, preferiblemente aproximadamente 460 nm.

45 En ciertas realizaciones, la fase de producción puede ser seguida por una etapa que comprende la exposición del cultivo de microalgas o cianobacterias a un estímulo para aumentar la producción de metabolitos. Todas las realizaciones del estímulo descrito anteriormente en el contexto del primer aspecto de la invención se aplican *mutatis mutandis* al proceso descrito. Además, las cepas de microalgas y/o cianobacterias para su uso de acuerdo con el proceso descrito pueden seleccionarse entre cualquiera de los filos, órdenes, familias y/o especies de microalgas y/o cianobacterias ya descritas anteriormente.

60 El proceso puede usarse para aumentar la producción de biomasa de microalgas y/o cianobacterias. Dicha biomasa puede usarse en aplicaciones tales como la producción de biocombustible, biodiesel, gasolina, queroseno o para su

uso como acondicionador de suelos o biofertilizante, incluso en sistemas de riego subterráneo, como se describe más adelante en la presente memoria. Como alternativa o además, el proceso puede usarse para la producción de metabolitos, incluyendo, pero sin limitarse a, el aumento de la producción de lípidos y/o hidratos de carbono. En realizaciones preferidas, el proceso es para el aumento de la producción de ácido eicosapentaenoico. En una realización preferida adicional, el proceso es para el aumento de la producción de exopolisacárido.

También se describe en la presente memoria un microorganismo que es, o tiene las características identificativas de una cepa de *Chlorogibba allorgei* depositada en la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos con el número de acceso CCAP 817/1 o una cepa mutante derivada de la misma.

Se describe adicionalmente en la presente memoria un microorganismo que es o tiene las características identificativas de una cepa de *Dictyosphaerium chlorelloides* depositada en la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos con el número de acceso CCAP 222/98, o una cepa mutante derivada de la misma.

La presente invención describe un proceso para la producción de ácido eicosapentaenoico a partir de algas pertenecientes a la familia Pleurochloridaceae (por ejemplo, *Trachydiscus* sp. y *Chlorogibba* sp.). Por consiguiente, la invención proporciona un proceso para cebar y seleccionar células adaptadas de dichos cultivos de algas preparadas para el biorreactor y/u otras condiciones de cultivo utilizadas para producir productos de biomasa de algas que contienen lípidos y metabolitos descritos en la presente memoria. El método puede comprender un método para preparar algas pertenecientes a la familia Pleurochloridaceae y que contengan los lípidos y ácidos grasos antes mencionados incrementando la eficiencia fotosintética, el ajuste de nutrientes y la actividad metabólica para la producción de biodiesel, gasolina, queroseno y otras sustancias químicas de alto valor. También la presente invención proporciona un proceso para obtener perfiles de ácidos grasos deseados en el ácido eicosapentaenoico formando cepas de algas. Este proceso permite optimizar la producción de ácido eicosapentaenoico para el sector alimentario. En la presente memoria se describe un método para preparar especies del orden de las cianobacterias *Chroococcales* de los géneros *Synechocystis* y *Synechococcus* que contienen algunos o todos los lípidos y ácidos grasos anteriormente mencionados aumentando la eficacia fotosintética y la actividad metabólica. Se describe adicionalmente en la presente memoria un proceso para obtener una producción específica de ácidos grasos en los lípidos ajustando la eficiencia fotosintética en presencia de bandas seleccionadas dentro de las longitudes de onda de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) usando luz continua.

En la presente memoria se describe una cepa específica (aislada) de algas pertenecientes a la familia Pleurochloridaceae y en particular el género *Chlorogibba*, más específicamente una cepa de *Chlorogibba allorgei*. La cepa se depositó en la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos con el número de acceso CCAP 817/1 y se aceptó el 25 de enero de 2011. Esta cepa se muestra en la presente memoria como útil en la producción de metabolitos específicos.

También se describe en la presente memoria un proceso para la producción de un producto de biomasa de algas que contiene ácido eicosapentaenoico y los lípidos, ácidos grasos y metabolitos anteriormente mencionados, adecuados para la producción posterior de biodiesel, gasolina, queroseno y otros biocombustibles líquidos y sustancias químicas industriales de alto valor que comprende las etapas de:

a) una etapa de cultivo previo que se usa para aislar, subcultivar y preparar algas ajustadas pertenecientes a especies de Chlorophyta incluyendo específicamente a la familia Pleurochloridaceae rica en EPA y al orden de las cianobacterias *Chroococcales* de los géneros *Synechocystis* y *Synechococcus* utilizando longitudes de onda de PAR de luz continua ajustada y tensión de agua de proceso. Las algas pertenecientes a la familia Pleurochloridaceae y las cianobacterias del orden *Chroococcales* de los géneros *Synechocystis* y *Synechococcus* están ahora listos para ser escaladas en biorreactores usando suministros de luz y fuentes de agua similares. Los resultados muestran que se puede esperar hasta un aumento del doble en las tasas de crecimiento en comparación con los mismos cultivos cultivados en agua normal con nutrientes añadidos y luz del día o iluminación fluorescente en las diferentes cepas.

b) una etapa de fotobiobiorreactor en la cual las algas pertenecientes al filo Chlorophyta, la familia Pleurochloridaceae o las cianobacterias del orden *Chroococcales* de los géneros *Synechocystis* y *Synechococcus* se cultivan en el agua de proceso industrial, +/- nutrientes (medio de crecimiento BB estándar 100 % que comprende NaNO_3 (0,25 g/l); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,025 g/l); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,075 g/l); K_2HPO_4 (0,075 g/l); NaCl (0,025 g/l); KH_2PO_4 (0,175 g/l); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4,98 mg/l); H_2SO_4 (0,01 µl/l); H_3BO_3 (0,1142 g/l); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,00882 g/l); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,00144 g/l); MoO_3 (0,00071 g/l); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,00157 g/l); $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,00049 g/l); EDTA (0,005 g/l); KOH (0,031 g/l)), longitudes de onda de luz PAR específicas y niveles de irradiancia en un sistema de flujo continuo donde se mantiene la fase de crecimiento exponencial para permitir la recolección diaria de una proporción establecida de producto de biomasa. El producto de biomasa que contiene los lípidos, ácidos grasos y metabolitos anteriormente mencionados y las bioproteínas pertenecientes a la familia Pleurochloridaceae y las cianobacterias *Chroococcales* de los géneros *Synechocystis* y *Synechococcus*. El biorreactor se rellena con agua de proceso o agua de proceso modificada con nutrientes para permitir que la densidad celular de las algas se recupere hasta la etapa de crecimiento exponencial antes de la próxima cosecha.

Generalmente, las algas contienen aproximadamente 7 a 60 % en peso de contenido de lípidos con relación al peso total de las algas secas. En el caso de las algas pertenecientes a la familia Pleurochloridaceae, el ácido eicosapentaenoico comprende del 25 al 40 % del ácido graso total en el lípido y los restantes ácidos grasos son principalmente los ácidos grasos saturados o insaturados anteriormente mencionados. Por lo tanto, las algas pertenecientes a la familia Pleurochloridaceae poseen mayores cantidades de EPA que las fuentes tradicionales derivadas de los aceites de pescado.

Los lípidos y metabolitos del ácido eicosapentaenoico, del ácido mirístico, del ácido palmítico, del ácido behénico, del ácido láurico, del ácido linoleico, del ácido alfa-linolénico y del ácido esteárico y similares pertenecientes a la familia Pleurochloridaceae están presentes como ácidos grasos libres y/o in situ en el medio de crecimiento y/o se obtienen a partir del producto de biomasa de algas húmedas y/u homogeneizado de algas y/o las algas después de la liofilización o secado al aire y extraídas en presencia de un disolvente orgánico adecuado y/o sonicadas o usando CO₂ supercrítico.

En ciertas realizaciones, cuando los medios de crecimiento (que utilizan agua para remediar o agua modificada con nutrientes) fluyen a través del biorreactor con las algas, se exponen a conjuntos ajustados de bancos de luces LED regulables internamente o externamente al biorreactor que comprende patrones únicos de diodos que emiten luz Roja y Azul (LED) que están configurados para operar a diferentes longitudes de onda dependiendo de la cepa de algas. La angulación de los LED se optimiza para obtener el máximo suministro de irradiancia a los cultivos de algas que crecen dentro del FBR para promover y mantener la fase de crecimiento exponencial de las algas. La biomasa de algas se controla para determinar la densidad celular pero también para los contenidos de lípidos/ácidos grasos para comprobar que han alcanzado los niveles objetivo. A continuación se deshidrata la biomasa y se pasa al proceso apropiado posterior para biocombustibles o se extraen ácidos grasos de alto valor. La biomasa gastada restante puede utilizarse para alimentación animal (si se utiliza agua pura en el biorreactor) o para la producción de energía en sistemas de digestión anaerobia (AD) o pirólisis.

Biorreactor

En la presente memoria se describe un proceso integrado de utilización de cualquier combinación de energías estándar o renovables tales como energía solar, eólica, hidráulica, geotérmica y térmica y/u otras energías renovables para alimentar un fotobiorreactor y producir continuos altos rendimientos de biomasa de algas. Mediante el uso de métodos eficientes y rentables la biomasa de algas se refina aún más para producir biodiesel, bioqueroseno, gasolina, etanol y otros co-productos valiosos.

El sistema abarca fuentes de luz LED muy ajustadas que están diseñadas para maximizar el crecimiento de diferentes cepas de algas. El sistema abarca, pero no se limita a, la inclusión de fuentes de luz LED muy ajustadas que están diseñadas para proporcionar iluminación en un ángulo de 360 grados desde el centro de un biorreactor para maximizar el crecimiento de diferentes cepas de algas (creciendo alrededor de la fuente de luz).

Fuentes de energía

El sistema puede ser autoalimentado utilizando energía de energía solar, eólica, hidráulica, geotérmica y térmica y/o energías renovables. Estas diversas fuentes de energía se gestionan a través de un sistema comercial de gestión de energía que utiliza una instalación de almacenamiento escalable (como un banco de baterías) para almacenar y suministrar energía.

La temperatura del proceso se controla por dos medios: el calentamiento del agua a través del suministro de agua de proceso que se produce naturalmente de los sistemas industriales o aguas residuales domésticas y que se regula mediante termostatos o intercambiadores de calor o se gestiona a través de una unidad de control automatizada de procesos.

Fuentes de luz de baja energía

El proceso emplea una amplia gama de luces de bajo voltaje (tales como LED, así como otras fuentes únicas de emisión de luz) el cual está alimentado por una combinación de fuentes de energía estándar y/o renovables, donde las luces están ajustadas para optimizar el crecimiento de algas sin comprometer el lípido u otros subproductos comercialmente valiosos.

En las realizaciones preferidas, un conjunto de luces, que emiten luz que abarca longitudes de onda con un ángulo preciso de emisiones de haz dentro de las longitudes de onda de radiación fotosintéticamente activa (PAR) de 400-700 nm, está montado internamente o externamente al FBR. Esto ayuda a estimular las algas para maximizar el crecimiento de la biomasa a una tasa de producción rentable.

Las algas han sido seleccionadas de un acondicionamiento adaptativo ambiental previo, usando fuentes de luz y longitudes de onda específicas, agua de proceso, temperatura y control del pH, para producir cepas capaces de crecimiento óptimo con insumos energéticos reducidos.

En la presente memoria se describe un proceso nuevo para aumentar la producción de exopolisacárido (EPS) del alga *Dictyosphaerium chlorelloides* ALG03 dentro de cualquier sistema fotobiorreactor. Este comprende (a) precultivar para adaptar la cepa a la iluminación LED ajustada dentro de las longitudes de onda de radiación

- fotosintéticamente activa (PAR) y a las condiciones de agua de proceso industrial (por ejemplo, agua de proceso secundaria tratada); (b) cultivar la cepa de formación de EPS dentro de un FBR complementado iluminación LED PAR (radiación fotosintéticamente activa) (400-700 nm) ajustada para proporcionar a las algas cada día iluminación continua entre 1 y 24 horas; (c) trasladar después de la fase exponencial máxima de crecimiento una parte tal como
- 5 aproximadamente 50 % del rendimiento a un sistema de tanque iluminado estático con aireación suave (aire ambiente sin adición de CO₂) para mejorar la formación de EPS durante 3-4 días; (d) deshidratar la pasta de algas para la extracción del biopolímero o para otros usos descritos anteriormente o para la producción de energía mediante fermentación con etanol u otros procesos (por ejemplo, digestión anaerobia o gasificación de biomasa).
- 10 Ejemplos de las cepas gelatinosas revestidas de microalgas adecuadas para su uso en el proceso descrito pueden ser del filo Chlorophyta y seleccionadas de la familia Dictyosphaeriaceae.

Cepas de algas adaptadas

- 15 La cepa de microalgas utilizada para la producción de EPS se mantiene en suministros heterogéneos de agua de proceso industrial en cultivos en matraz estándar y se le suministra iluminación PAR a través de líneas de LED con patrones de luz ajustados. La luz se puede suministrar internamente dentro del FBR o externamente. Los cultivos se subcultivan cada mes para seleccionar células adaptadas a los constituyentes de las aguas residuales y a la iluminación LED. Este proceso de selección fenotípica incluye una etapa de evaluación para comprobar la
- 20 producción de EPS en cada subcultivo. Los cultivos madre se mantienen en estas condiciones de crecimiento para continuar el proceso de adaptación.

Algas que se desarrollan en fotobiorreactores ("FBR")

- 25 Se han hecho muchos intentos para desarrollar FBR de pequeña escala para la producción de microalgas (g). Los FBR de escala comercial (> 100.000 litros) deberían tener una gran capacidad de volumen y tener una pequeña superficie ocupada. Además, deben tener superficies transparentes, altas tasas de transferencia de masa y deben ser capaces de producir grandes rendimientos de biomasa. Además, cualquier diseño de FBR debe tener en cuenta las necesidades únicas de las cepas individuales de microalgas y ser de bajo mantenimiento y robustas.
- 30 Se ha sugerido que los FBR también pueden actuar como recipientes de cultivo para los sistemas de crecimiento de estanque al aire libre. Dado que los FBR al aire libre son generalmente iluminados naturalmente con luz solar, la productividad de la biomasa dependería de las condiciones ambientales predominantes durante todo el año en esa localidad. Hay variaciones estacionales en las temperaturas y la luz solar durante todo el año en la mayoría de las
- 35 regiones que han sido probadas (a menudo ambientes desérticos) por lo que es difícil llevar a cabo el cultivo al aire libre en masa de algas durante todo el año en esas regiones. Hay una serie de diseños para FBR del dominio público, que se venden comercialmente y diseños en artículos académicos, pero no existe un modelo definitivo de la 'mejor práctica'.
- 40 En un primer conjunto de realizaciones, cualquier aparato FBR (diseño tubular de elevación de aire o tanque plano) que tenga un dispositivo para drenar o recoger las células diariamente puede ser iluminado durante una parte del día o durante las 24 horas del día con longitudes de onda de PAR de iluminación LED (internamente o externamente). El crecimiento de las algas se monitoriza mediante un dispositivo de control de proceso adjunto para medir la DO a 680 nm que está correlacionado con el número de células mediante un cálculo previo y que permite la determinación del
- 45 crecimiento exponencial máximo desde la puesta en marcha del FBR. El sistema abarca, pero no se limita a, la inclusión de fuentes de luz LED muy ajustadas que están diseñadas para proporcionar una iluminación en un ángulo de 360 grados desde el centro de un biorreactor para maximizar el crecimiento de diferentes cepas de algas (creciendo alrededor de la fuente de luz).
- 50 Cuando se alcanza el máximo de crecimiento exponencial el 50 % de las células se cosechan diariamente a un tanque de retención del lote separado que tiene aireación (mezcla del aire ambiente) conectada e iluminación LED 24/7. Las cepas de algas se mantienen en las condiciones prescritas durante 3-4 días y las muestras del tanque se monitorizan visualmente en un microscopio diariamente para determinar la producción de EPS. Estas células se extraen finalmente por deshidratación para la extracción de hidratos de carbono o para los usos descritos
- 55 anteriormente.

Fuentes de luz

- 60 Los sistemas de cultivo de algas pueden ser iluminados por luz artificial, luz solar o ambos. Uno de los factores más importantes para controlar la elevada producción de biomasa de microalgas en el FBR cerrado es la irradiancia lumínica y la calidad del espectro de luz suministrado. Si el FBR se coloca al aire libre, se puede limitar a los niveles de luz altos observados durante el día y durante los meses de verano, pero esto puede variar geográficamente. Los niveles de luz ultravioleta ("UV") en la luz solar natural también pueden causar la foto-inhibición de las algas en ciertos momentos del día y por lo tanto carece del potencial control del FBR cultivado usando luz artificial.

65

Una fuente de luz importante que puede suministrar longitudes de onda de luz específicas es la gama de los diodos emisores de luz ("LED") que ahora están siendo desarrollados por varios fabricantes importantes de luz. Los LED tienen la capacidad de ahorrar energía y tienen una expectativa de vida útil muy larga. Su eficiencia eléctrica ayuda a minimizar la generación de calor. Esta alta eficiencia y el espectro agudo han eliminado la necesidad de un sistema de refrigeración y filtro y por lo tanto se reducen significativamente los requisitos de aporte de energía. Estos factores amplían el potencial para optimizar el suministro de luz para cepas específicas de microalgas (h).

Se sabe qué partes del espectro de radiación fotosintéticamente activa (PAR) (400-700 nm que cubre los extremos rojo y azul del espectro) podrían contribuir a maximizar la fotosíntesis eficiente de las algas en general, pero existen pocos datos (en el dominio público) sobre interacciones específicas de tal irradiancia luminosa sobre el crecimiento y estado fisiológico de precursores de biocombustibles (lípidos/hidratos de carbono) para diferentes cepas de algas cultivadas bajo luz artificial en FBR. Los solicitantes han descubierto los requisitos precisos de LED rojo/azul y los niveles de irradiancia suministrados para una serie de microalgas y para el proceso de doble etapa de producción de EPS aquí.

Insumos energéticos 'sostenibles' para sistemas de FBR

El uso potencial de las corrientes de 'residuos', donde los gases de combustión lavados proporcionan CO₂ con agua de proceso modificada utilizada como medio nutritivo para el crecimiento de algas, ha sido extensamente debatido en la bibliografía. Hasta la fecha se han desarrollado algunos proyectos de demostración significativos o exitosos. Se ha estimado que usando sistemas híbridos, las algas pueden ser usadas para reciclar el 20 % de las emisiones de CO₂ en la generación de energía industrial. Si se pueden desarrollar fuentes nuevas y baratas de captura de CO₂ se reduciría el costo y los requisitos de energía de los FBR.

El proceso de cultivo de algas en el agua de proceso industrial puede reducir los niveles de nutrientes a los niveles potencialmente necesarios establecidos en los estrictos objetivos de la legislación en diferentes partes del mundo para la eliminación de agua al medio ambiente y de organismos de gestión de agua particulares.

Los solicitantes han descubierto los niveles óptimos de nutrientes requeridos bajo temperatura y niveles de irradiancia lumínica controlados para el crecimiento rentable de las algas descritas en este documento.

Biomasa de algas y biopolímeros

Los polisacáridos de las algas se utilizan actualmente comercialmente (d). Se sabe que las algas del suelo excretan una variedad de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) especialmente polisacáridos que pueden desempeñar un papel importante para su función vital (e). El exopolisacárido (EPS) que forma la cepa de algas tiene la ventaja de que también es utilizado en el agua para remediar secuestrando elementos potencialmente tóxicos dentro del EPS formado en la etapa discontinua y antes. Hay pruebas claras de que elementos como el cobre pueden unirse a estos compuestos mucilaginosos (i). Esto tiene un valor claro cuando existe el agua limpia para la eliminación posterior o si su uso es el objetivo principal. En el análisis de hidratos de carbono realizado en la composición de EPS se observaron 94-95 % de monosacáridos neutros y aproximadamente 5-6 % de ácido urónico. Este último es particularmente importante para la unión de metales pesados.

Se sabe que las algas del suelo mejoran la formación del suelo y la retención de agua, estabilizan el suelo, aumentan la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento de las plantas cercanas y reducen la erosión del suelo. Se han introducido como acondicionadores de suelos en muchos países y también se han sugerido para su uso como biofertilizantes (j).

La disminución del suministro de agua 'dulce' aumentará la necesidad de utilizar agua reciclada, así en Israel, se ha utilizado agua secundaria tratada para la producción de hortalizas y frutas frescas para el mercado utilizando sistemas de riego. Sin embargo, es necesario que las regulaciones en muchos países sean modificadas para su uso generalizado incluso con SDI donde el agua tratada no llega a las porciones comestibles del cultivo (sobre la superficie del suelo).

El riego tradicional por goteo se realiza sobre el suelo, pero recientemente numerosas empresas que fabrican sistemas de riego por goteo han inventado e implementado sistemas de riego por goteo en subsuelo (SDI). Las líneas están enterradas bajo tierra y tienen una vida más larga. El riego en el subsuelo permite la aplicación precisa de agua, nutrientes y otros agroquímicos directamente a la zona de las raíces de las plantas. Esto permite al agricultor optimizar el ambiente de cultivo y conduce a rendimientos de la cosecha de mayor calidad.

Cuando se gestiona adecuadamente, el SDI es uno de los métodos más eficaces de regar plantas con eficiencias >90 %. El ahorro en el agua aplicada puede ser de hasta un 50 % en comparación con otros métodos. Se prevé que la cantidad de agua disponible para el riego disminuirá en las próximas décadas y que la conservación del agua será más importante. Aquí es donde SDI es crucial prolongando la vida de los acuíferos. Su uso para cultivos de biocombustibles tiene un gran potencial y se ha demostrado en suelos pobres que el uso de SDI puede duplicar los rendimientos de la caña de azúcar y aumentar su contenido de azúcar mientras se conserva el 70 % de la necesidad

de agua.

El exopolisacárido de una cepa adaptada de *Dictyosphaerium chlorelloides* ALG03 también se puede utilizar en fases posteriores para la producción de bioetanol utilizando los hidratos de carbono extraídos. Los restantes hidratos de carbono y proteínas pueden utilizarse para otros subproductos tales como aditivos alimentarios y piensos.

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

Ejemplos

Ejemplo 1

Algas pertenecientes a la familia Pleurochloridaceae o cianobacterias del orden *Chroococcales* de los géneros *Synechocystis* y *Synechococcus* fueron preincubadas en agua modificada con nutrientes y condiciones continuas de iluminación de PAR (dentro de las longitudes de onda de 400-700 nm) durante un período de 6 meses y subcultivadas a intervalos regulares. Los cultivos aislados se subcultivaron adicionalmente para llevarlos a una fase de crecimiento exponencial y se usaron en una serie de biorreactores de 50 l. La densidad celular inicial del inóculo de algas fue de 10^6 células por mililitro extraído de las algas subcultivadas que se transfirió a un biorreactor de 50 l que contenía agua enriquecida con nutrientes y permitió alcanzar una fase de crecimiento exponencial en presencia de condiciones de iluminación de PAR continuas (longitudes de onda entre 400-700 nm). El proceso se controló en cuanto a diversos parámetros incluyendo; pH (mantenido entre 6-9); temperatura (mantenida entre 20-40 °C); aireación (0,02 a 1,0 v/v/m - volumen de aire por volumen de líquido por minuto) y/o CO₂, (0 % en la puesta en marcha terminando en al menos 0,7 % en la primera cosecha aunque con el tiempo se puede llegar al 5 % dentro del sistema); O₂ mantenido entre 500-800 mV; irradiancia lumínica máxima en las primeras células en FBR (600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), aireación, CO₂ (comenzando con un 0 % de CO₂ añadido y aumentando hasta el 0,7 % en la cosecha), densidad celular, temperatura (27 °C promedio) y suministro de luz (24 horas al día). Cuando casi se hubo alcanzado el crecimiento exponencial máximo, se extrajeron de los reactores 500 g de producto de biomasa de algas húmedas. Se añadió una mezcla disolvente que contenía metanol/cloruro de acetilo/hexano produciendo ésteres metílicos de los ácidos lipídicos nativos. Los ésteres metílicos se separaron por cromatografía usando hexano y solución de acetona y posteriormente se evaporaron para obtener 1,6 g de ácido eicosapentaenoico. La cromatografía también proporcionó muestras puras de ácido mirístico, ácido palmítico, ácido behénico, ácido láurico, ácido linoleico, ácido alfa-linolénico y ácido esteárico y similares.

Ejemplo 2

Se secaron 50,08 g de biomasa durante 6 horas a 105 °C. Después de enfriar en un secador, la muestra se colocó durante 1 hora en un horno a 105 °C y se pesó de nuevo. En un dispositivo de extracción Soxhlet la biomasa seca se extrajo en 260 ml de éter de petróleo durante 8 horas en una cápsula de extracción. Después de la evaporación del disolvente en un evaporador de rotación con vacío, la muestra se secó adicionalmente haciendo pasar una corriente fina de nitrógeno sobre la muestra y se pesó de nuevo después de enfriar. Para obtener los lípidos, la muestra se disolvió en 50 ml de hexano y se dividió por la mitad. Se añadieron diez gramos de carbón activado a la primera muestra y la solución se filtró y volvió a evaporarse y se hizo fluir con nitrógeno y se pesó. Todavía había algo de color presente, por lo que para la segunda muestra se usó 20 g de carbón activado.

Las muestras se analizaron utilizando un Agilent Technologies 6890N y una columna HP 88, cianopropilo - Longitud: 100 m - diam: 0,25 mm, ancho de la capa: 0,20 μm .

Tabla 1 - Los resultados de los análisis de los porcentajes de 3 ácidos grasos unidos por su ruta metabólica de 3 diferentes ciclos de FBR por lotes

Ácido graso	Porcentaje de ácido graso ME en el grupo de lípidos totales de <i>Chlorogibba allorgei</i>		
	Aproximación al final de la fase de crecimiento log	Estrés parcial después del crecimiento log (Día 1 post-cosecha)	Después del estrés total (Día 3 – fase estacionaria)
Ácido γ -linolénico (GLA)	18,0	11,0	0,7
Ácido araquidónico (ARA)	2,4	3,7	0,0
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	20,0	23,5	27,0

Los resultados indican claramente el cambio de GLA a EPA a través de ARA a medida que la cepa de algas crece y luego es inducida a entrar en la fase estacionaria post estímulo como se ha descrito anteriormente. Esto es señal de que el proceso descrito en la presente memoria está controlado directamente por las vías metabólicas percibidas que permiten la interconversión entre el ácido γ -linolénico y el ácido eicosapentaenoico a través del ácido araquidónico en microalgas de agua dulce (I).

Ejemplo 3

Dictyosphaerium chlorelloides (ALG03) se cultivó durante 4 días en Medio Básico Basal. La Figura 5a muestra que el alga necesita niveles relativamente bajos de nutrientes para un crecimiento óptimo a 27 °C bajo irradiancia óptima de la luz. La Figura 5b muestra que el alga crece mejor con luz menos intensa durante 7 días en un medio BB al 25 % a 27 °C.

Durante un proceso de producción continuo, *Dictyosphaerium chlorelloides* (ALG03) se cosechó diariamente. La Figura 7, con la biomasa mostrada como lecturas de densidad óptica (680nm) en FBR, muestra que la recolección diaria a tasas del 50 % permite un nuevo crecimiento de la misma biomasa de *Dictyosphaerium chlorelloides* (ALG03) en el plazo de 24 horas cuando se rellena con nuevo medio de crecimiento.

Se cultivaron células fisiológicamente adecuadas durante 6 meses en aguas residuales de una planta municipal (tratamiento secundario) y se volvieron a cultivar cada 4 semanas en nuevas aguas residuales. Las células no adaptadas se cultivaron en medio de crecimiento ZBB estándar y se volvieron a cultivar cada 4 semanas en medio ZBB nuevo. A continuación, se cultivaron ambas cepas durante 9 días (hasta la fase estacionaria) en nuevas aguas residuales. Los resultados (Figura 8) muestran una clara adaptación al ambiente de las aguas residuales y la iluminación por LED mediante células pre-adaptadas. La Figura 9 muestra la duplicación de la producción de EPS después del proceso de FBR de 2 etapas.

Las etapas subsiguientes del método incluyeron purificación, aislamiento del EPS e hidrólisis de la muestra usando HCl metanólico seguido por ácido trifluoroacético.

Los exopolisacáridos comprenden 94-95 % de monosacáridos neutros con 5-6 % de ácido urónico. Algunos monosacáridos neutros están parcialmente metilados. Los azúcares predominantes fueron:

galactosa (~ 20-21 %)
glucosa (~ 20-21 %)
hexosa no identificada (~ 12-13 %)
ramnosa (~ 12 %)
hexosa metilada no identificada (~ 9-10 %)
hexosa metilada no identificada (~ 7-8 %)
manosa (~ 6-7 %)
xilosa (~ 3-4 %)
arabinosa (~ 1-2 %)
monosacárido desconocido (~ hasta 0,5 %)
monosacárido desconocido (~ 0,5-1,0 %)
ácidos urónicos (~ 5-6 %).

La relación molar entre azúcares en gel seco y muestras liofilizadas de EPS hidrolizado se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

	Relación molar de azúcares (%)	
	F1	F2
Fucosa	2,73	0,81
Ramnosa	10,20	15,54
Arabinosa	5,34	8,28
Galactosa	9,83	15,10
Glucosa	65,31	51,12
Manosa	4,32	6,86
Xilosa	2,27	2,29

Ejemplo 4

Los resultados del uso de riego por goteo para cultivar puerros en un suelo arenoso infértil en un ensayo de invernadero durante un período de 12 semanas se pueden ver en la imagen de la Figura 11. De izquierda a derecha: Control sin algas; simbiote fúngico micorrízico (mezcla de *Glomus* spp.) utilizados en la siembra; algas usadas semanalmente; algas y simbiote fúngico micorrízico. Los resultados muestran claramente un efecto promotor del crecimiento de las células de *Dictyosphaerium chlorelloides* ALG03 añadidas dos veces por semana sobre el crecimiento y la nutrición de un puerro. Se observó un efecto sinérgico del uso de las células de algas con una mezcla de simbiote fúngico micorrízico adaptado.

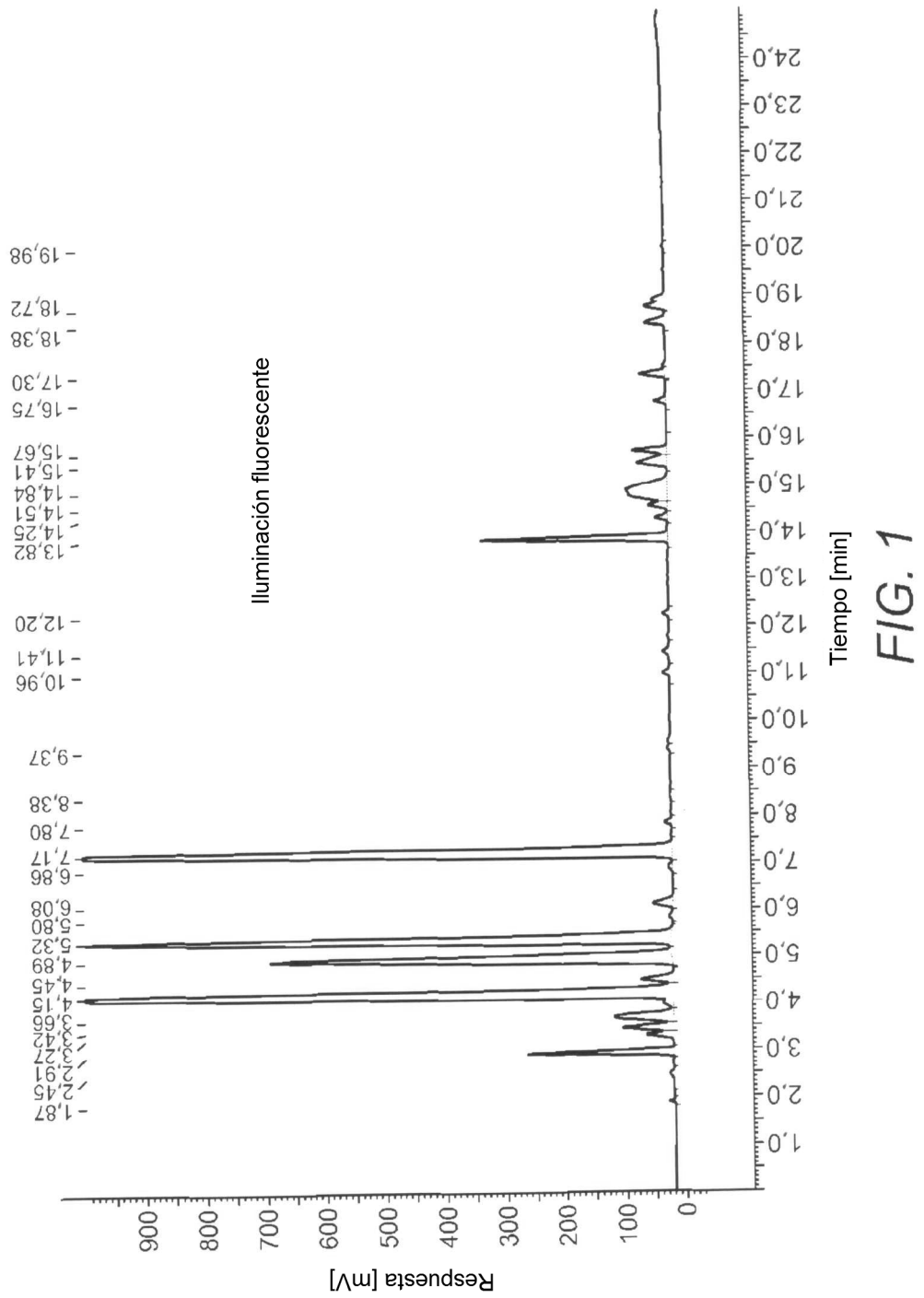
La presente invención no debe estar limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria, sino que está definida en su sentido más amplio por las reivindicaciones adjuntas. De hecho, varias modificaciones de la invención además de las descritas en la presente memoria resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y de las figuras adjuntas. Además, todos los aspectos y realizaciones de la invención descritos en la presente memoria se consideran ampliamente aplicables y combinables con cualquiera y todas las demás realizaciones consistentes, incluyendo las tomadas de otros aspectos de la invención (incluyendo aisladamente) según sea apropiado.

Referencias

- a. Chisti Y - 2007 - Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25(3):294-306.
- b. Olaizola M - 2005 Microalgal removal of CO₂ from flue gases: Changes in medium pH and flue gas composition do not appear to affect the photochemical yield of microalgal cultures. *The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering* 8: 60-367.
- c. Braun AR - 1996 Reuse and Fixation of CO₂ in Chemistry, Algal Biomass and Fuel Substitutions in the Traffic Sector. *Energy Convers Manage.*, 37:1229-1234.
- d. Bitton R & Bianco-Peled H - 2008 Novel Biomimetic Adhesives Based on Algae Glue. *Macromolecular Bioscience* 8:393-400.
- e. Otero A & Vincenzini M - 2003 Extracellular polysaccharide synthesis by Nostoc strains as affected by N source and light intensity. *J. Biotechnol.* 102:143-152.
- f. Gonzalez-Chavez C., D'haen J, Vangronsveld J. & Dodd JC - 2002 Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different Glomus spp. of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from the same polluted soil. *Plant and Soil* 240: 287-297.
- g. Ugwu CU, Aoyagi H and Uchiyama H - 2008 Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99, 4021-4028.
- h. Choul-Gyun Lee - 1999 Calculation of Light Penetration Depth in Photobioreactors *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 4, 78-81.
- i. García-Meza, JV, Barrangue C & Admiraal W - 2005 Biofilm formation by algae as a mechanism for surviving on mine tailings. *Environ. Toxic. & Chemistry.* 24:573-581.
- j. Painter TJ - 1993 Carbohydrate polymers in desert reclamation-the potential of microalgal biofertilizers. *Carbohydrate Polymers*, 20, 77-86.
- k. <http://www.netafim.com/article/sugarcane--philippines>.
- (l) Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., 2002. Biosynthesis of eicosapentaenoic acid (EPA) in the freshwater eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *J. Phycol.* 38, 745-756.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para el aumento de la producción de (a) ácido eicosapentaenoico en microalgas seleccionadas de la familia Pleurochloridaceae o (b) exopolisacárido en microalgas de la especie *Dictyosphaerium chlorelloides*, comprendiendo dicho proceso las etapas de:
 - (i) cultivar una cepa de microalgas seleccionada de la familia Pleurochloridaceae o de la especie *Dictyosphaerium chlorelloides* mediante una fase de producción;
 - (ii) exponer el cultivo de microalgas a un estímulo, donde el estímulo comprende (a) una disminución del pH hasta un pH no inferior a aproximadamente pH 6, seguido de un aumento del pH hasta un pH no inferior a aproximadamente pH 7 y (b) un aumento de la irradiancia lumínica hasta al menos 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$.
2. El proceso de la reivindicación 1, donde el estímulo comprende una disminución del pH desde un pH entre aproximadamente pH 7 y pH 9 hasta un pH de entre aproximadamente pH 5 y pH 6.
3. El proceso de la reivindicación 1 o 2, donde el estímulo comprende un aumento de la irradiancia suministrada por LED entre aproximadamente 50-200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ y entre aproximadamente 400-2.000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$.
4. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la fase de producción corresponde a la fase exponencial de crecimiento y/o implica el crecimiento de la cepa de microalgas en condiciones que permiten un crecimiento exponencial.
5. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la fase de producción implica el crecimiento de la cepa de microalgas en un fotobiorreactor y/o implica el crecimiento de microalgas en presencia de LED que emiten 2 picos de luz roja y azul dentro del espectro de PAR de 400-700 nm y/o los cultivos no están expuestos a la luz solar natural.
6. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el cultivo de microalgas se expone al estímulo en el pico de crecimiento de la fase exponencial y/o al inicio de la fase estacionaria de crecimiento.
7. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el estímulo comprende adicionalmente la adición de una fuente de carbono.
8. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la disminución del pH se inicia mediante la adición de CO_2 .
9. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el pH se reduce hasta un pH de entre aproximadamente pH 5 y pH 6 durante un periodo de entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 2 horas y dicho período precede al aumento de la irradiancia lumínica, opcionalmente donde después de la disminución del pH, el pH se incrementa hasta un pH de entre aproximadamente 7 y 9.
10. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde después de la exposición de las microalgas al estímulo, las microalgas se cultivan durante un período adicional de aproximadamente 48 horas antes de la cosecha del metabolito.
11. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 10, donde la cepa de microalgas se selecciona entre las especies: *Trachydiscus* sp. y *Chlorogibba* sp., o la cepa de microalgas es una cepa de *Chlorogibba allorgei* depositada en la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos con el número de acceso CCAP 817/1 o una cepa mutante derivada de la misma o la cepa de microalgas es una cepa de *Dictyosphaerium chlorelloides* depositada en la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos con el número de acceso CCAP 222/98 o una cepa mutante derivada de la misma.
12. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el proceso comprende la etapa adicional de cosechar el ácido eicosapentaenoico o exopolisacárido después de un período adicional de crecimiento después de que el cultivo ha sido expuesto al estímulo.



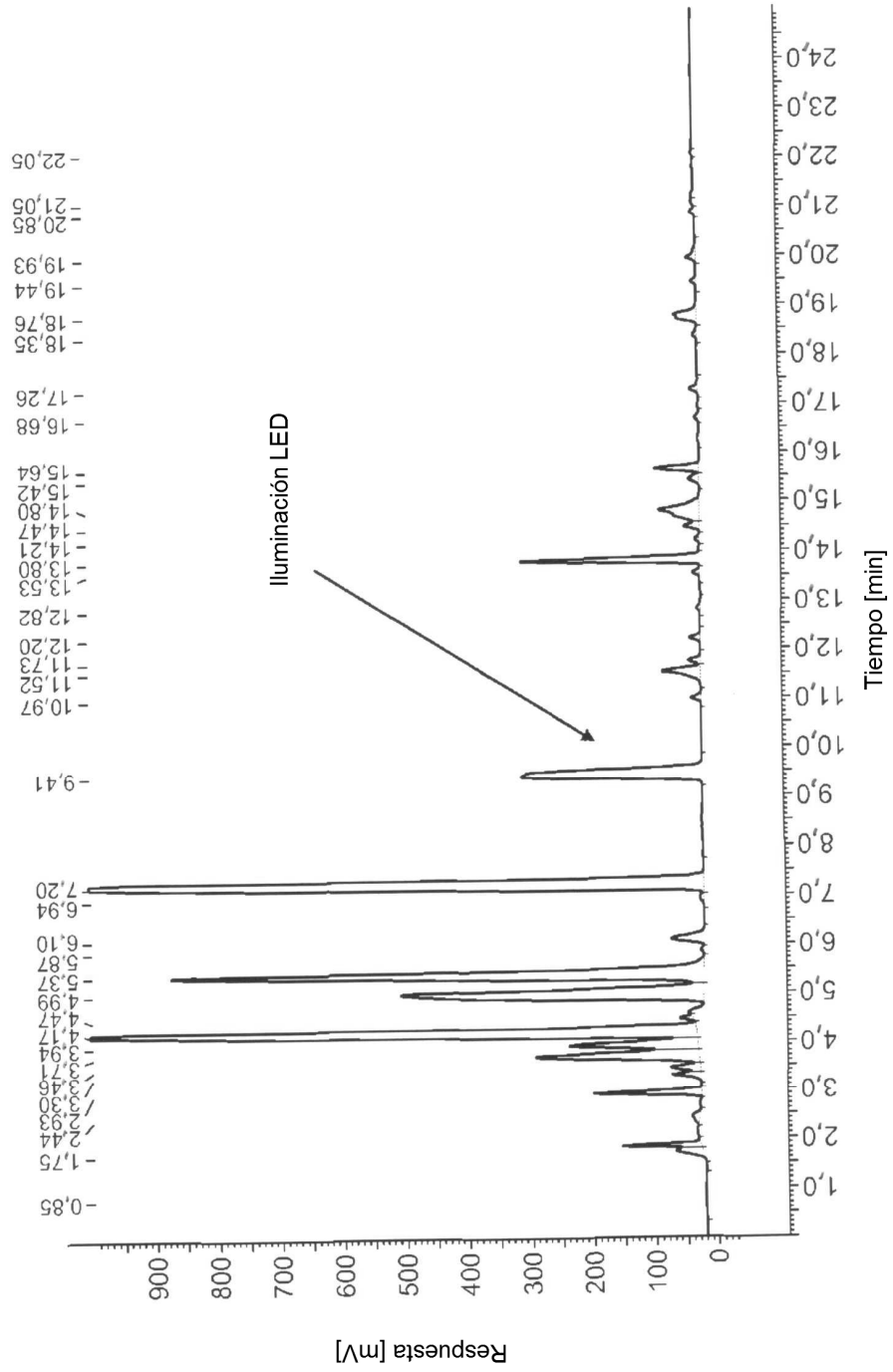


FIG. 1 Cont.

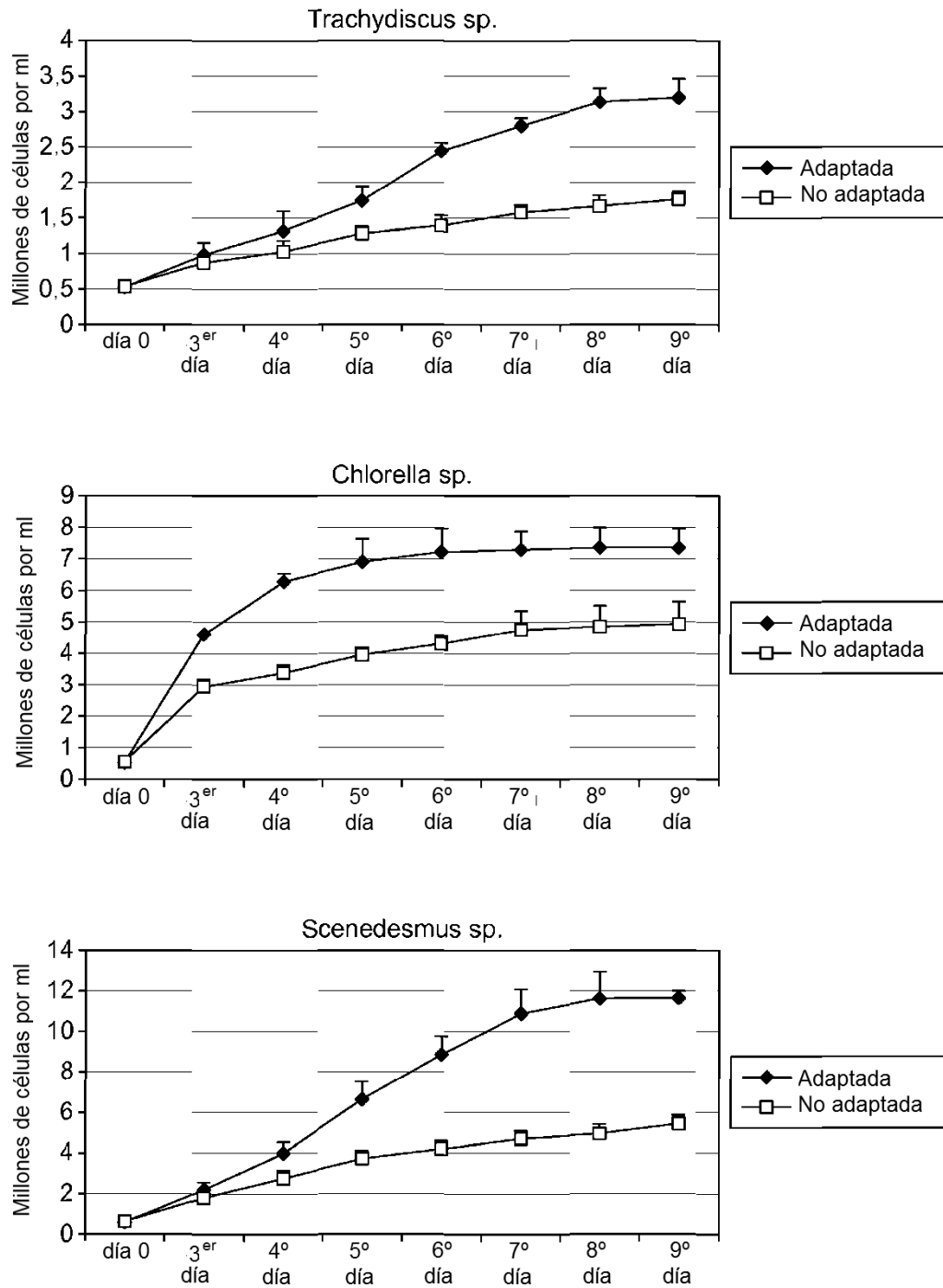


FIG. 2

Microalgas / cianobacterias	Hidratos de carbono	Lípidos	Proteínas	Calor de combustión
Chlorella sp. ALG04	29 $\pm$ 3%	7 $\pm$ 2%	53 $\pm$ 6%	22,14MJ/kg
Synechococcus sp. ALG06	13 $\pm$ 2%	10 $\pm$ 1%	66 $\pm$ 6%	20,19MJ/kg
Trachydiscus sp. ALG01	27 $\pm$ 4%	24 $\pm$ 4%	43 $\pm$ 8%	22,56MJ/kg

FIG. 3

Contenido de ácidos grasos		y ácidos grasos totales
Ácido láurico	C12:0	5,5
Ácido mirístico	C14:0	23,4
Ácido palmítico	C16:0	10,1
Ácido esteárico	C18:0	2,0
Ácido linoleico	C18:2n6	4,3
Ácido alfa linolénico	C18:3n3	2,6
Ácido eicosapentaenoico	C20:5n3	27,0
Ácido behénico	C22:0	7,1

FIG. 4

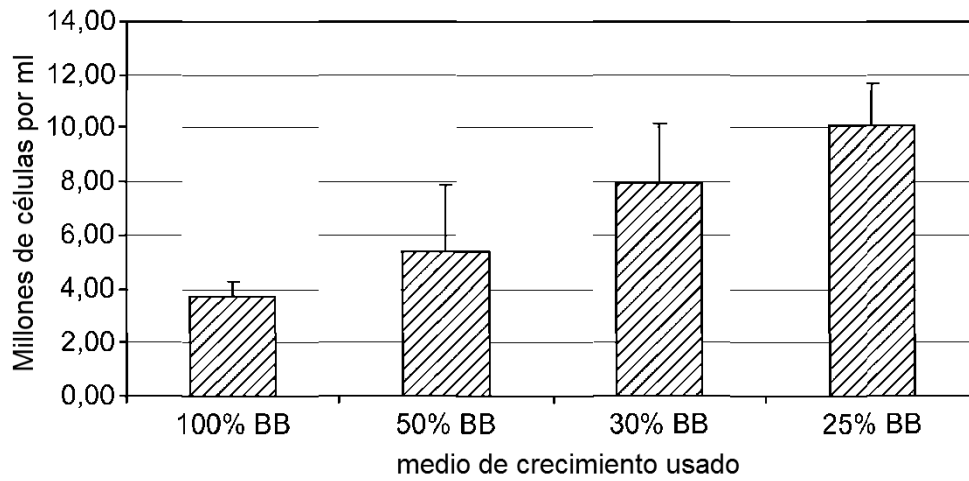


FIG. 5A

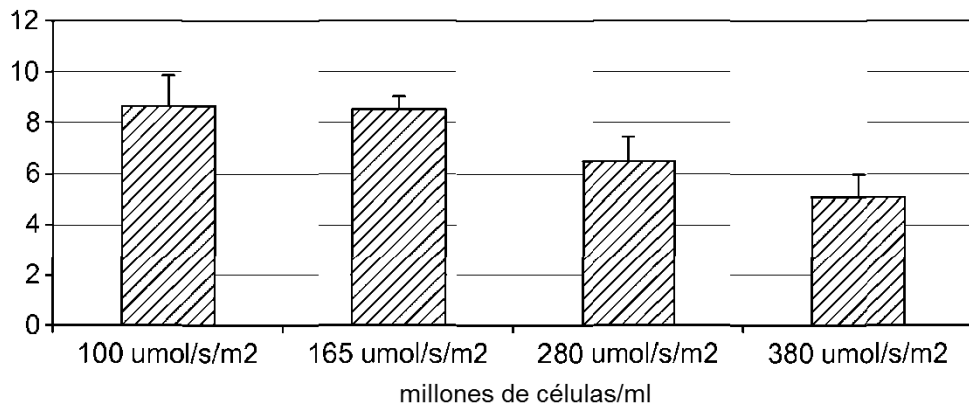


FIG. 5B

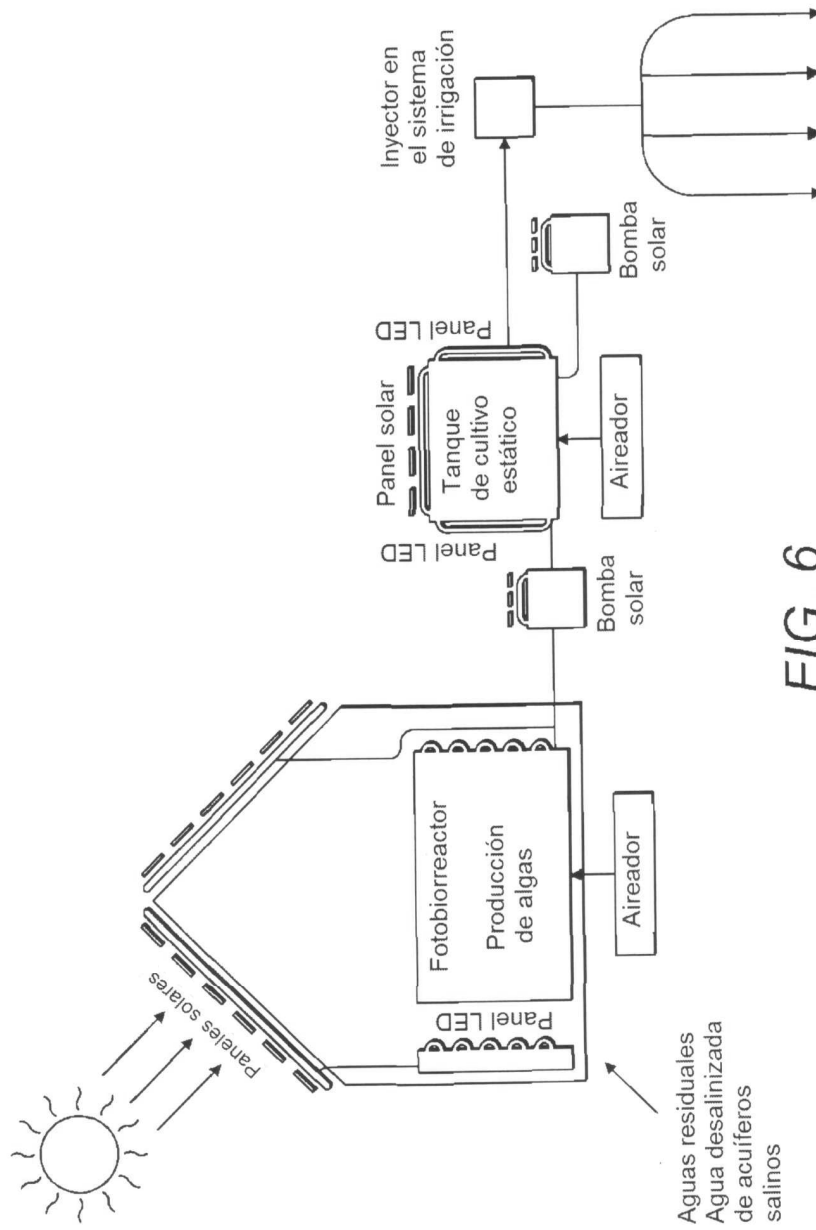


FIG. 6

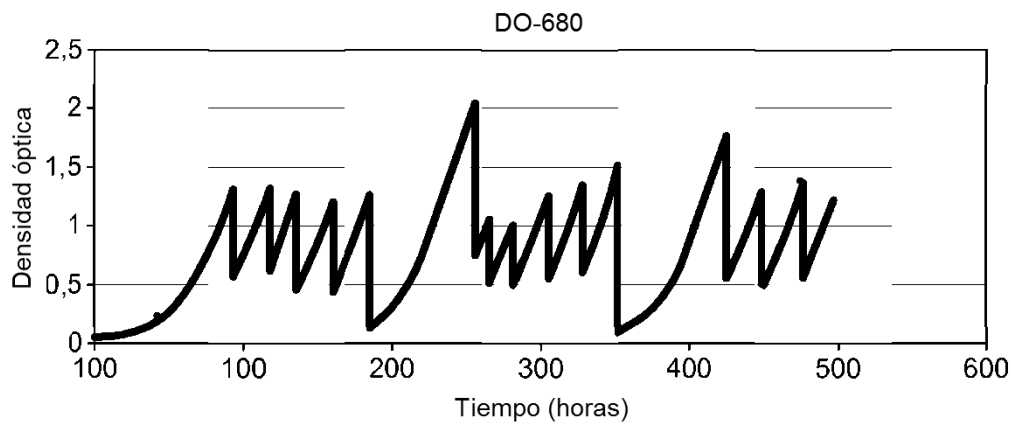


FIG. 7

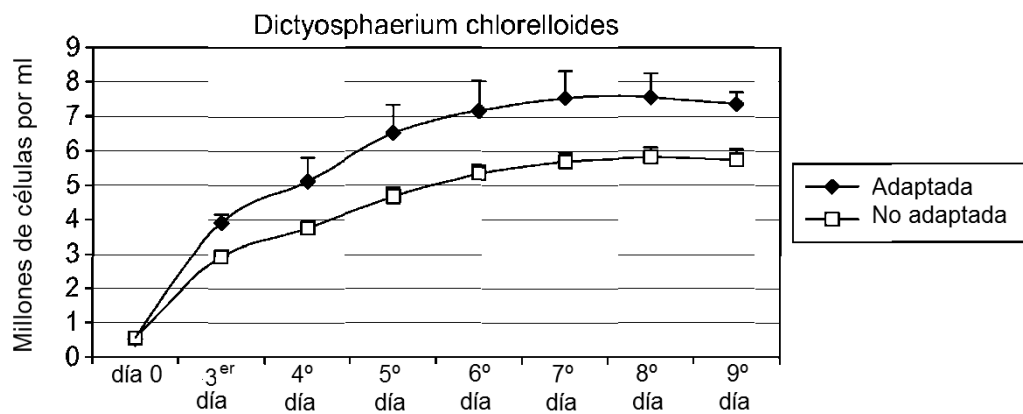


FIG. 8

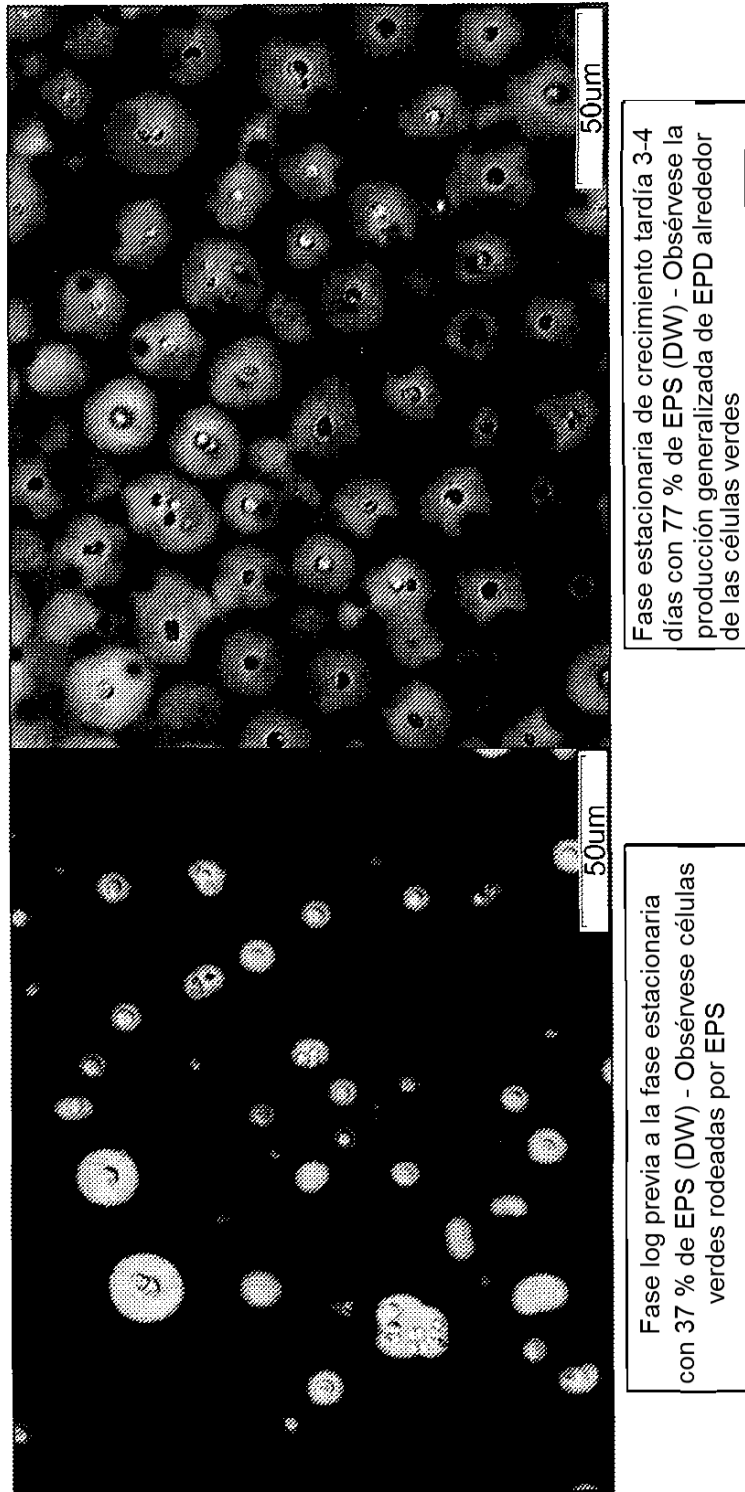


FIG. 9

Microalgas / cianobacterias	Hidratos de carbono	Lípidos	Proteínas	Calor de combustión
Chlorella sp. ALG04	29±3%	7±2%	53±6%	22,14MJ/kg
Dictyosphaerium chlorelloides. ALG03	38±4%	5±2%	41±7%	20,10MJ/kg
Synechococcus sp. ALG06	13±2%	10±1%	66±6%	20,19MJ/kg

FIG. 10

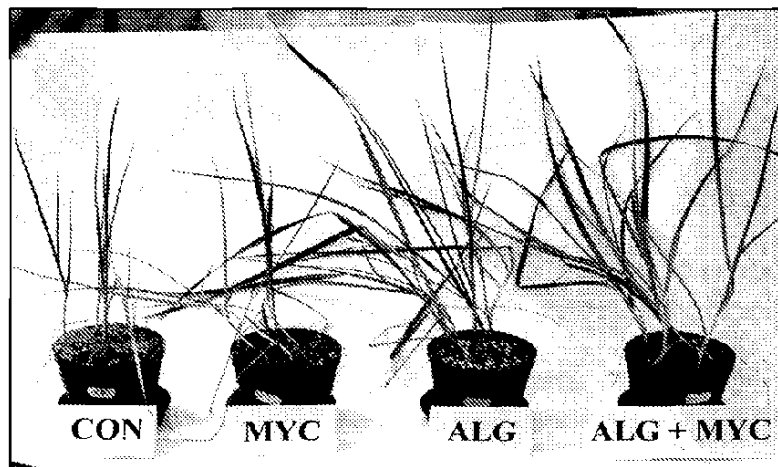


FIG. 11A

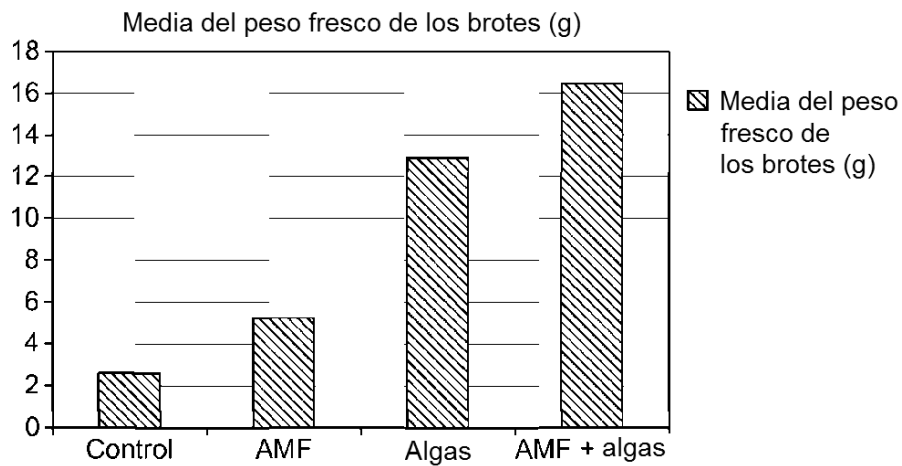


FIG. 11B