

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 964**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)

C12N 13/00 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2011** **PCT/FR2011/052114**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2012** **WO12035262**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2011** **E 11773088 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017** **EP 2616536**

54 Título: **Procedimiento de cultivo de algas unicelulares mixótrofas en presencia de un suministro luminoso discontinuo en forma de pulsos**

30 Prioridad:

15.09.2010 FR 1057380

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2018

73 Titular/es:

FERMENTALG (100.0%)
4 rue Rivièrè
33500 Libourne, FR

72 Inventor/es:

CALLEJA, PIERRE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 653 964 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de cultivo de algas unicelulares mixótrofas en presencia de un suministro luminoso discontinuo en forma de pulsos

- 5 La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de cultivo de algas unicelulares (microalgas) en condiciones mixótrofas, que permite, en concreto el enriquecimiento del contenido lipídico de estas algas.

Este procedimiento se basa en un suministro de luz en el medio de cultivo variable o discontinuo en el transcurso del tiempo, cuyo suministro induce un aumento del rendimiento de los cultivos y del contenido lipídico de las algas.

Preámbulo

- 10 Las algas unicelulares actualmente son objeto de numerosos proyectos industriales en vista de su uso directo, como complemento alimentario, o indirecto como materia prima para la química verde.

Se buscan en particular los lípidos procedentes de estas microalgas puesto que presentan excelentes calidades nutricionales. En particular, contienen ácidos grasos poliinsaturados de cadenas largas (PUFA) esenciales, como el EPA y el DHA, los cuales se usan, en concreto, en la formulación de sustitutos de leches maternas. En acuicultura las microalgas sirven de sustitutos a los aceites y harinas de pescado.

- 15 Debido a que en condiciones favorables las microalgas pueden acumular hasta 80% de su peso seco en ácidos grasos, estas ofrecen una alternativa creíble al cultivo de plantas terrestres oleaginosas para la producción de biocarburantes [Li, Y et al., 2008 *Biotechnol. Prog.*, 24: 815- 820].

Las algas unicelulares se presentan como microorganismos fotosintéticos de carácter autótrofo, es decir que tienen la capacidad de crecer de forma autónoma por fotosíntesis.

- 20 La mayoría de las especies de algas unicelulares encontradas en el agua dulce o los océanos son estrictamente autótrofas, es decir, que no pueden crecer de otra forma que por fotosíntesis. Para estas, la presencia en su medio de sustratos carbonados o de materias orgánicas no les resulta favorable y tiende incluso a inhibir su crecimiento.

- 25 Sin embargo, un determinado número de especies de algas unicelulares, de familias y de origen muy diverso han demostrado que no son estrictamente autótrofas. Algunas de ellas, llamadas heterótrofas, son capaces de desarrollarse en ausencia total de luz, por fermentación, es decir, aprovechando la materia orgánica.

Otras especies de algas, para las cuales la fotosíntesis sigue siendo indispensable para su desarrollo, son capaces de usar, a la vez, la fotosíntesis y la materia orgánica presente en su medio. Estas especies intermedias, llamadas mixótrofas, se pueden cultivar a la vez en presencia de luz y de materia orgánica.

- 30 Esta particularidad de las algas llamadas "mixótrofas" parece estar ligada a su metabolismo, que les permite funcionar simultáneamente en fotosíntesis y fermentación. Los dos tipos de metabolismo coexisten con un efecto global positivo en el crecimiento de las algas [Yang C. et al. (2000) *Biochemical Engineering Journal* 6 :87-102].

- 35 En este momento, la clasificación de las algas se basa todavía en gran medida en criterios morfológicos y en la naturaleza de los pigmentos fotosintéticos que contienen. Esta clasificación da poca información sobre el carácter autótrofo, heterótrofo o mixótrofo, aunque estos abarcan una diversidad muy grande de especies y formas [Dubinsky et al. 2010, *Hydrobiologia*, 639:153-171].

Debido a esto, se considera que una cepa es mixótrofa siempre que, de forma experimental, se pueda demostrar que tiene la capacidad para crecer por fotosíntesis en un medio mineral, en el que se añade un sustrato carbonado tal como glucosa, acetato o glicerol. Si este complemento de sustrato carbonado no da lugar a una inhibición del crecimiento durante la fase iluminada, entonces la cepa se puede considerar que es mixótrofa.

- 40 Aunque, para algunas especies de algas el hecho de poder crecer en condiciones mixótrofas teóricamente permitiría alcanzar un mejor rendimiento en cultivo en lo que se refiere a la biomasa celular y la producción de lípidos [Ceron Garcia M.C. et al. 2000, *Journal of Applied Phycology*, 13 :239-248], dicho nivel de rendimiento rara vez se logra.

- 45 En efecto, la gestión de la relación de cantidad de luz/cantidad de sustrato carbonado a introducir en el medio de cultivo para obtener un rendimiento óptimo, sigue siendo delicado de determinar [Lee Y.K. et al. 2001, *Journal of Applied Phycology*, 13 :307-315], en concreto en términos de producción de una cantidad de lípidos que se pueda explotar. La maceración del cultivo descrito en el documento WO 2009/134114 no permite controlar el suministro de luz.

- 50 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de mejorar los procedimientos de cultivo actuales de las microalgas mixótrofas para obtener condiciones de producción que aseguren una biomasa importante y concentraciones elevadas de lípidos.

Los trabajos llevados a cabo en diferentes especies de microalgas han establecido que la intensidad luminosa tenía una influencia directa en el rendimiento cuantitativo y cualitativo de los cultivos efectuados en modo mixótrofo. Katsuda et al. [*J. of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 105 - 3, 216-220] describen el uso de pulsos para estudiar la producción de astaxantina por *H. pluvialis*.

5 Una intensidad luminosa igual a la usada en el modo autótrofo en general es demasiado fuerte para usarla en el cultivo de algas en modo mixótrofo. Debido a este fenómeno de fotoinhibición, a menudo es conveniente reducir la intensidad luminosa para obtener mejores rendimientos [Liang Y. et al., 2009, *Biotechnol. Lett.*, 31 :1043-1049; Chojnacka, K. et al., 2004, *Enzyme and Microbial Technology*, 34 :461-465; Bouarab L. et al., 2004, *Water Research*, 38:2706-2712; Jeon Y.C. et al. 2006, *Enzyme and Microbial Technology*, 39 :490-495].

10 Debido a que los cultivos de algas, a escala industrial, se realizan a menudo a cielo abierto, es decir con una iluminación natural, los experimentos realizados para determinar las condiciones óptimas de los cultivos en modo mixótrofo, en general se llevan a cabo con fases de iluminación continuas. En algunos casos, una fase iluminada alternada con una fase oscura diariamente (fotoperiodo), que reproduce así el día y la noche. Sin embargo, en la técnica anterior no se mencionan alternancias repetidas o variaciones significativas en el transcurso del tiempo de la
15 intensidad luminosa aportada a los cultivos.

Los experimentos anteriores relativos a cultivos que alternan fases de cultivo en modo autótrofo (iluminado) y heterótrofo (oscuro), de varias horas cada uno, han demostrado ser decepcionantes en términos de optimización de los cultivos, debido a la necesidad de las algas a adaptarse a los cambios de las condiciones de cultivo. Se ha observado un periodo de latencia al principio de cada ciclo, ligado al fenómeno llamado de fotoactivación, que
20 participa en una bajada del rendimiento de los cultivos [Ogbonna J.C. et al., 1997, *Journal of Applied Phycology* 9 :359-366].

Es sin duda la razón por la que los autores de diferentes trabajos de optimización del cultivo de algas en modo mixótrofo, no han considerado que una alternancia de las fases iluminadas y oscuras pudiera tener un efecto favorable en el rendimiento de los cultivos.

25 De forma sorprendente, los autores de la invención han constatado, al contrario, que un suministro luminoso discontinuo no era perjudicial para el rendimiento de los cultivos realizados en modo mixótrofo. En concreto han observado que variando la intensidad luminosa, sea por alternancia cercana de fases oscuras y fases iluminadas (pulsos), o sea haciendo fluctuar la intensidad luminosa en el transcurso del tiempo, podían actuar positivamente en el rendimiento de los cultivos en términos de biomasa, y más en particular, en el contenido lipídico de las células.

30 Basándose en estas observaciones, los autores de la invención han desarrollado un procedimiento de cultivo de algas mixótrofas que permite alcanzar, por una parte, una biomasa más elevada, y por otra parte, enriquecer en lípidos el contenido de las algas. Este procedimiento se basa en un suministro luminoso variable o discontinuo en el transcurso del tiempo.

Este procedimiento, objeto de la presente solicitud, parece que se puede generalizar a muchas especies de algas
35 unicelulares mixótrofas.

Los diferentes aspectos y ventajas de la invención se detallan a continuación.

Figura 1: Gráfica que compara la biomasa de cultivos de *Tetraselmis* llevados a cabo respectivamente en mixotrofia con un suministro de luz en forma de pulsos según la invención (Δ) y en modo autótrofo ($\blacklozenge$), es decir con luz continua.

40 Figura 2: Gráfica que compara el contenido lipídico de células de *Tetraselmis* cultivadas respectivamente en mixotrofia con un suministro de luz en forma de pulsos según la invención (X) y en modo autótrofo ($\square$).

Descripción detallada

La presente invención tiene, por lo tanto, por objeto un procedimiento de cultivo de algas unicelulares que permite aumentar su biomasa y enriquecer su contenido lipídico.

45 Este procedimiento permite también seleccionar cepas de microalgas particularmente adaptadas a la producción de lípidos en modo mixótrofo.

Este procedimiento se caracteriza por que el flujo de luz suministrado a las algas en cultivo es discontinuo por pulsos cuya intensidad en micromoles de fotones varía en una amplitud igual o superior a $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a razón de varias veces por hora, siendo los periodos de oscuridad al menos la mitad del tiempo durante el cual son cultivadas las
50 algas, consistiendo dichos pulsos en fases sucesivas de iluminación de una duración comprendida entre 10 segundos y 2 minutos.

Contrariamente a las ideas recibidas, parece que una iluminación discontinua de los cultivos, en concreto en modo mixótrofo, tenía un impacto favorable en el desarrollo de las algas y permitía aumentar la producción de lípidos por

estas últimas.

Sin estar limitado por la teoría, los autores de la invención consideran que un suministro discontinuo o variable de luz tiene como efecto provocar un estrés en las algas que es favorable para la síntesis de lípidos. En efecto, es frecuente en la naturaleza que las algas acumulen reservas lipídicas para resistir las restricciones de su entorno.

- 5 Según un aspecto preferido de la invención, las fases sucesivas de iluminación están comprendidas entre 20 segundos y 1 minuto.

Según la invención, se puede proceder también a un suministro luminoso que tenga fases de iluminación continuas y discontinuas.

- 10 Según un aspecto preferido de la invención, la intensidad luminosa varía entre los valores de 0 y 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, preferiblemente entre 0 y 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

El suministro de luz en los cultivos se puede obtener mediante lámparas repartidas alrededor de la pared externa de los fermentadores. Un reloj pone en marcha las lámparas durante los tiempos de iluminación definidos. Los fermentadores se sitúan preferiblemente en un entorno al abrigo de la luz del día, del cual se puede controlar la temperatura ambiente.

- 15 El procedimiento según la invención se aplica más en particular a las algas unicelulares capaces de crecer en condiciones de mixotrofia.

Como se ha indicado en el preámbulo de la presente solicitud, un cultivo de algas en modo mixótrofo se define como un cultivo llevado a cabo en modo autótrofo en un medio de cultivo enriquecido en sustratos carbonados.

- 20 Preferiblemente, dichos sustratos carbonados comprenden, o consisten en acetato, glucosa, celulosa, almidón, lactosa, sacarosa o glicerol.

En el sentido de la presente invención, una especie de alga se considera mixótrofa, siempre que se pueda cultivar a la luz, en un medio mínimo (por ejemplo MM o f/2) al que se añade un sustrato carbonado a razón de, por ejemplo, una concentración en carbono, glicerol o acetato, equivalente o superior a 5 mM, sin observar inhibición del crecimiento, es decir, sin constatar la pérdida de biomasa en peso seco con respecto a un cultivo realizado en un mismo medio desprovisto de sustrato carbonado (es decir, en modo autótrofo).

- 25 Para los fines de la presente invención, se usarán, preferiblemente, microalgas mixótrofas, en las que al menos 25%, preferiblemente al menos 50% de la energía producida por estas, proviene de la explotación de dicho sustrato carbonado por el alga.

- 30 El medio de cultivo debe contener una cantidad de sustrato carbonado suficiente para la fermentación, pero no demasiado elevado para evitar la inhibición del crecimiento de las algas. Preferiblemente, el medio de cultivo según la invención comprende una concentración en glucosa disponible inferior a 10 g/l, preferiblemente comprendida entre 4 y 6 g/l.

- 35 Según un aspecto preferido de la invención, el sustrato carbonado comprende acetato, preferiblemente acetato sódico, cuya concentración en el medio de cultivo en general está comprendida entre 5 mM y 50 mM, preferiblemente entre 15 y 25 mM.

- 40 Ventajosamente, las especies de algas se seleccionarán entre las siguientes clases: *Euglenophyceae*, *Prasinophyceae*, *Eustigmatophyceae*, *Bacillariophyceae*, *Prymnesiophyceae*, *Pinguiphyceae*, *Dinophyceae*, *Trebouxiphyceae*, *Bicosoecophyceae*, *Katable-phariophyceae*, *Chlorophyceae*, *Haptophyceae*, *Raphido-phyceae*, *Chysophyceae*, *Coscinodiscophyceae*, *Alveolata*, *Bangiophyceae*, *Rhodophyceae*, en particular de cepas productoras de lípidos, y preferiblemente cepas que producen al menos 5% de lípidos en modo autótrofo.

Las microalgas que pertenecen a la clase de *Prasinophyceae*, son preferiblemente del género *Tetraselmis sp.*

Un procedimiento de cultivo según la invención se lleva a cabo, por ejemplo, en mixotrofia en presencia de un suministro de luz en forma de pulsos de luz, referiblemente entre 20 y 30 pulsos por hora, cuya intensidad en general está comprendida entre 10 y 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, preferiblemente entre 10 y 15 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

- 45 Según un ejemplo preferido de la invención, se aplican 30 pulsos de 30 segundos por hora de una intensidad de aproximadamente 10 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a un medio de cultivo que comprende glucosa o acetato sódico y calcio.

El medio de cultivo puede contener otros elementos, tales como potasio, magnesio, microelementos y vitaminas.

Un modo de realización preferido consiste en usar la técnica de cultivo semicontinuo, que permite mantener el sustrato carbonado en concentraciones no inhibitorias, favoreciendo un aumento de la biomasa.

Preferiblemente, la glucosa usada en el medio de cultivo es D-glucosa o dextrosa, en particular dextrosa procedente de la biotransformación del almidón, por ejemplo, a partir de maíz, trigo o patata. Los hidrolizados del almidón están constituidos por moléculas de pequeño tamaño, que son igualmente fácilmente asimilables por las algas, permitiendo obtener un mejor desarrollo de la biomasa.

- 5 Según otro aspecto de la invención, el crecimiento de cepas depende de la presencia en el medio de cultivo de calcio en concentración alta, concretamente, más de 80 mg/l de calcio, y preferiblemente entre 120 y 190 mg/l.

Según un modo de realización particularmente adaptado, el medio de cultivo comprende entre 3 y 10 g/l de glucosa y entre 100 y 200 g/l de calcio.

- 10 Ventajosamente, dicho medio permite obtener un tiempo de latencia de aproximadamente 18 horas, y un tiempo de generación comprendido entre 3 y 4 horas.

El procedimiento de cultivo según la invención se debe realizar a una temperatura media que permita un buen crecimiento de las algas, preferiblemente comprendido entre 4 y 32°C.

En estas condiciones, se observa una reducción del tiempo de cultivo a menos de 40 horas, siendo los tiempos de latencia y generación muy bajos.

- 15 Como tales, las algas obtenidas según el procedimiento de la invención se pueden usar en la alimentación, en concreto en la alimentación animal, ya que son potencialmente ricas en proteínas y ácidos grasos poliinsaturados (p. ej., EPA y DHA).

Según un aspecto preferido de la invención, el procedimiento de cultivo previamente definido permite también la producción de lípidos.

- 20 Este procedimiento de producción de lípidos se caracteriza por que comprende una o varias de las siguientes etapas:

- i) se ponen en cultivo algas unicelulares según el procedimiento previamente descrito, y
- ii) se recuperan las algas unicelulares cultivadas en la etapa i), y
- iii) se extraen los lípidos del contenido intracelular de las algas recuperadas en la etapa ii).

- 25 Los lípidos se pueden extraer mediante la lisis de las células y fraccionar según técnicas conocidas por el experto en la materia.

Los lípidos así obtenidos son útiles en diferentes aplicaciones, en forma de ácidos grasos poliinsaturados, en concreto como complementos alimentarios tales como sustitutos de aceites de pescado, o en forma de triglicéridos, por ejemplo, para la producción de biocarburantes.

- 30 Los siguientes ejemplos tienen por objeto la ilustración de la invención sin limitarla.

Ejemplos

I- Cribado de cepas de *Tetraselmis* sp. mixótrofas

1 - Cepas:

- 35 Las cepas del género *Tetraselmis* (n=78) se pidieron a las bibliotecas de cepas internacionales CCAP (Escocia), SAG (Alemania), CCMP (EE.UU.) y CSIRO (Australia).

2 - Medio de cultivo:

- 40 Las microalgas de agua dulce se cultiva en autotrofia en medio mínimo MM líquido [solución de Beijerinck 50 ml/l (NH₄Cl 8 g/l, CaCl₂ 1 g/l, MgSO₄ 2 g/l), tampón de fosfato 1 ml/l (K₂HPO₄ 106 g/l, KH₂PO₄ 53 g/l), solución de oligoelementos 1 ml/l (BO₃H₃ 11,4 g/l, ZnSO₄·7H₂O 22 g/l, MnCl₂·4H₂O 5,06 g/l, FeSO₄·7H₂O 4,99 g/l, CoCl₂·6H₂O 1,61 g/l, CuSO₄·5H₂O 1,57 g/l, Mo₇O₂₄(NH₄)₆·4H₂O 1,1 g/l, EDTA 50 g/l), base Trizma 2,42 g/l, pH ajustado entre 7,2 y 7,4 con HCl, vitamina B₁ 1,2 mg/l y vitamina B₁₂ 0,01 mg /l (añadida antes de su uso)] y en medio MM sólido (+1,5% de agar).

- 45 En un primer momento, las microalgas marinas se cultivan en autotrofia en agua de mar reconstituida o medio f/2 líquido [NaNO₃ 0,64 g/l, KCl 0,74 g/l, NaCl o sal marina Tropic 26 g/l, CaCl₂ 1 g/l, MgSO₄·7H₂O 1,92 g/l, NaH₂PO₄·2H₂O 50 mg/l, solución de oligoelementos 1 ml/l (Na₂EDTA·2H₂O 4,36 g/l, FeCl₃·6H₂O 5,82 g/l, MnCl₂·4H₂O 2,46 g/l, ZnSO₄·7H₂O 34,5 mg/l, CoCl₂·6H₂O 12 mg/l, CuSO₄·5H₂O 9,8 mg/l, Na₂MoO₄·2H₂O 2,2 mg/l), pH ajustado entre 7,2 y 7,4 con HCl, vitamina B₁ 0,1 mg/l, vitamina B₈ 0,6 mg/l y vitamina B₁₂ 0,6 mg/l (añadidas antes de usar)] y en un medio f/2 sólido (+ 1,2% de agar).

Los cultivos de microalgas en mixotrofia y en heterotrofia se han llevado a cabo en medio MM o f/2 con la adición respectiva de los siguientes sustratos carbonados: acetato 5 mM, glucosa 5 g/l, lactosa 10 g/l, sacarosa 10 g/l y glicerol 5 g/l.

3 - Cribado de alta productividad del crecimiento de cepas en medio líquido en microplacas de 24 y 96 pocillos:

- 5 El carácter heterótrofo y mixótrofo de las cepas de *Tetraselmis* se evaluó cultivando las cepas de microalgas en cuanto se recibieron en medio MM (cepa de agua dulce) o f/2 (cepa marina) en presencia de un sustrato carbonado en microplacas de 24 pocillos (V= 2 ml) o 96 pocillos (V= 1 ml) selladas mediante una película permeable a los gases. Se llevó a cabo un control de crecimiento en autotrofia (MM o f/2) sistemáticamente para que sirviera de referencia para los cultivos en mixotrofia y heterotrofia.
- 10 Las microplacas se pusieron en cámaras de incubación (SANYO MLR-351H) a 22°C, 60% de humedad y 10 µE de intensidad luminosa para los cultivos en autotrofia y mixotrofia y en cámara de incubación (BINDER KB53) a 22°C, 60% de humedad y en la oscuridad (0 µE) para los cultivos en heterotrofia.

La cámara de incubación se modificó con el fin de suministrar iluminación regulada en forma de pulsos de luz de 10 µE a razón de 30 pulsos de 30 segundos por hora.

- 15 4 - Cribado de alta productividad por espectrofluorimetría del contenido lipídico intracelular de cepas de microalgas cultivadas respectivamente en mixotrofia y heterotrofia:

Después de 3 a 4 semanas de seguimiento del crecimiento en placas de 24 o 96 pocillos, se evaluó el contenido lipídico intracelular de las microalgas mixótrofas y heterótrofas por espectrofluorimetría. Los lípidos intracelulares se marcaron específicamente con un fluorocromo, el rojo Nilo.

- 20 En respuesta a una excitación de fluorescencia a 488 nm, los lípidos neutros marcados con rojo Nilo emiten una fluorescencia a 570 nm y los lípidos polares a 610-620 nm.

Para este fin, los cultivos líquidos de cepas de microalgas realizados en condiciones mixótrofas y heterótrofas se transfieren a microplacas de PCR de 96 pocillos (V = 100 a 200 µl de cultivo) y se marcan con 1-2 µl de rojo Nilo (0,1 mg/ml). Después de 20 min de incubación en la oscuridad, la microplaca de PCR se pone en un espectrofluorímetro (Varian) y se lleva a cabo un barrido de emisión de fluorescencia de 500 a 700 nm.

- 25 El efecto de los pulsos de luz (colonias en autotrofia y mixotrofia) y de sustratos carbonados (colonias en mixotrofia y heterotrofia) tales como glucosa (Glc 5 g/l), acetato (Ac 1 g/l), sacarosa (Sac 10 g/l), lactosa (Lac 10 g/l) y glicerol (Gly 5 g/l) en el crecimiento de 78 cepas del género *Tetraselmis* se evaluó por cribado en microplacas de 96 pocillos en medio líquido MM o f/2. El seguimiento del crecimiento se realiza durante 3 a 4 semanas, 2 veces por semana, por observación macroscópica de los cultivos y microscópica con microscopio (objetivos 10X y 32X).
- 30

5 - Resultados

De las 78 cepas ensayadas del género *Tetraselmis*, 22 han presentado un carácter heterótrofo y solamente 7 cepas han resultado estrictamente autótrofas. Se observa en efecto que las 22 cepas heterótrofas presentan un crecimiento significativo con 0 µE en uno de los sustratos ensayados, comparable, incluso superior, a las de autotrofia. El sustrato carbonado preferido de las cepas del género *Tetraselmis* parece que es la glucosa, con 17 cepas mixótrofas de 21. Las cepas se llaman estrictamente autótrofas cuando la adición de un sustrato carbonado en presencia o en ausencia de luz no mejora el crecimiento celular con respecto al cultivo en autotrofia. El suministro de luz (10 µE) y sustrato carbonado, han permitido en el presente caso que 71 cepas del género *Tetraselmis* alcanzaran una concentración celular comparable o superior a la del control en autotrofia. El cultivo en mixotrofia constituye, por lo tanto, las mejores condiciones para cultivar el mayor número de cepas del género *Tetraselmis*.

- 45 El efecto de la luz en la acumulación de lípidos intracelulares se ha evaluado en las 21 cepas mixótrofas del género *Tetraselmis* capaces de crecer en condiciones de mixotrofia con iluminación continua y discontinua, en microplacas de 96 pocillos, en condiciones de cultivo en fase estacionaria. En la práctica, se transfiere una parte alícuota de cultivo (200 µl) de cada una de las 21 cepas de *Tetraselmis* heterótrofas a una microplaca de 96 pocillos, y después se marcan con rojo Nilo (1 µg/ml). Se recoge la señal de emisión de fluorescencia, que refleja la acumulación de lípidos intracelulares (lípidos neutros a 570 nm y lípidos polares a 620 nm), mediante un espectrofluorímetro.

Para las 21 cepas ensayadas, aparece un marcaje más intenso de rojo Nilo en cepas cultivadas en presencia de pulsos, con respecto a las cultivadas en modo de iluminación continua.

II - Crecimiento de cepas de *Tetraselmis* sp. mixótrofas en modo de pulsos

- 50 1 - Cultivo de las cepas de *Tetraselmis* sp. en biorreactor

Dos cepas de *Tetraselmis*, tomadas aleatoriamente entre las 21 cepas mixótrofas seleccionadas durante el cribado descrito en la parte I anterior, se cultivaron en modo de pulsos según la invención en fermentadores (semicontinuos). En paralelo, las mismas cepas se cultivaron en autotrofia con una iluminación continua.

Los cultivos se realizaron en fermentadores (BioController ADI 1030) de 2 litros usados con autómatas específicos y supervisión por estación informática. Se reguló en el sistema el pH mediante la adición de base (solución de hidróxido sódico 1 N) y/o de ácido (solución de ácido sulfúrico 1 N). La temperatura del cultivo se fija a 23°C. La agitación se llevó a cabo mediante 3 agitadores situados en el eje según la configuración de Rushton (hélices de tres palas de bombeo descendente). La velocidad de la agitación y el caudal de aireación se regularon al mínimo de 100 rpm y al máximo de 250 rpm con $Q_{\min} = 0,5 \text{ wm}$ / $Q_{\max} = 2 \text{ wm}$ respectivamente. El biorreactor está equipado con un sistema luminoso externo que rodea la cuba transparente. La intensidad de la luz emitida, así como los ciclos de luz, se programaron a partir de una estación informática. Los reactores se inocularon con un precultivo realizado en mesa agitadora (140 rpm) en recinto regulado termostáticamente (22°C), iluminado de forma continua a 100 μE . Los precultivos y cultivos en biorreactores se realizaron en medio f/2 complementado con NaHCO_3 10 mM. El sustrato carbonado, que se usó para el cultivo en mixotrofia en el biorreactor es acetato sódico en una concentración 20 mM. A partir de 92 horas de cultivo, se llevaron a cabo adiciones de medio f/2 concentrado cada 24 h para conseguir una concentración final de 0,5X. Para los cultivos en mixotrofia con "pulsos", se añadió acetato sódico 5 mM además del medio concentrado f/2.

2 - Suministro de luz en forma de pulsos:

El suministro de luz en forma de pulsos en los biorreactores se llevó a cabo con ayuda de lámparas LED repartidas alrededor de la pared externa de dichos fermentadores. Un reloj pone en marcha estas lámparas LED durante los tiempos de iluminación o de pulsos entre 8 y 50 μE . La intensidad luminosa del sistema de pulsos se iguala a la usada en modo continuo en cultivos testigo en autotrofia.

3 - Seguimiento de la biomasa:

La concentración en biomasa total se siguió por la medición de la masa seca (filtración en filtro GFC, Whatman, después secado en estufa con vacío, 65°C y -0,8 bar, durante un mínimo de 24 h antes de pesar).

4 - Cuantificación de los lípidos intracelulares:

La cuantificación de los lípidos totales se llevó a cabo tomando muestras de 10^7 células/ml. Los métodos de extracción de lípidos son los descritos por Bligh, E.G. et Dyer, W.J. [A rapid method of total lipid extraction and purification (1959) *Can. J.Biochem. Physiol* 37:911-917].

5 - Resultados:

Los resultados obtenidos por los diferentes cultivos se dan en las gráficas de las figuras 1 y 2.

La primera gráfica indica un fuerte aumento de la biomasa cuando el cultivo se realiza en modo de pulsos (media de las diferentes cepas mixótrofas seleccionadas) con respecto al cultivo de las mismas cepas realizado en modo autótrofo.

La segunda gráfica indica una acumulación de lípidos en las células cultivadas en modo de pulsos de hasta 30% superior al de las células cultivadas en modo autótrofo.

6 - Conclusión:

El estudio anterior muestra que un suministro de luz en forma de pulsos (30 pulsos de 30 segundos por hora de aproximadamente 10 μE) a cultivos de diferentes microalgas del género *Tetraselmis*, además de sustratos carbonados, induce, en todas aquellas que tienen carácter mixótrofo, una acumulación significativamente más importante de lípidos intracelulares.

En términos de biomasa, los rendimientos eran netamente más importantes en el modo mixótrofo con un suministro de luz en forma de pulsos que en autotrofia. La concentración de microalgas obtenida está comprendida entre 100 y 150 g/l (fig. 1), lo cual es mucho mayor que las concentraciones obtenidas con los cultivos con luz continua.

Además, el procedimiento de cultivo de algas unicelulares según la invención, permite reducir el tiempo de cultivo de las mismas algas a menos de 40 horas, siendo los tiempos de latencia y generación muy bajos.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de cultivo de algas unicelulares cultivadas en modo mixótrofo que permite aumentar su biomasa y enriquecer su contenido lipídico, caracterizado por que dichas algas son cultivadas en fermentadores en la oscuridad con un suministro de luz discontinuo mediante pulsos cuya intensidad en micromoles de fotones varía en una amplitud igual o superior a $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a razón de varias veces por hora, siendo los periodos de oscuridad al menos la mitad del tiempo durante el cual las algas son cultivadas, consistiendo dichos pulsos en dos fases sucesivas de iluminación de una duración comprendida entre 10 segundos y 2 minutos.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la intensidad luminosa varía entre los valores de 0 y $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que la intensidad luminosa varía entre 0 y $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicho suministro de pulsos consiste en dos fases sucesivas de iluminación de una duración comprendida entre 20 segundos y 1 minuto.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que dicho suministro de pulsos consiste en entre 20 y 30 pulsos por hora.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la intensidad luminosa de los pulsos está comprendida entre 10 y $15 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que el medio de cultivo es un medio mínimo complementado con sustrato carbonado que comprende acetato, glucosa, celulosa, almidón, lactosa, sacarosa o glicerol.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que el sustrato carbonado comprende mayoritariamente acetato sódico.
9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que las algas unicelulares se seleccionan entre las clases: *Euglenophyceae*, *Prasinophyceae*, *Eustigmatophyceae*, *Bacillariophyceae*, *Prymnesiophyceae*, *Pinguiphyceae*, *Dinophyceae*, *Trebouxiophyceae*, *Bicosoecophyceae*, *Katablephariophyceae*, *Chlorophyceae*, *Haptophyceae*, *Raphidophyceae*, *Chrysophyceae*, *Coccolodiscophyceae*, *Alveolata*, *Bangiophyceae*, *Rhodophyceae*.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que las algas unicelulares pertenecen a la clase de *Prymnesiophyceae*, preferiblemente al género *Tetraselmis* sp.
11. Procedimiento de producción de lípidos, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
 - i) se ponen en cultivo algas unicelulares según el procedimiento de cultivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y
 - ii) se recuperan las algas unicelulares cultivadas en la etapa i), y
 - iii) se extraen los lípidos del contenido intracelular de las algas recuperadas en la etapa ii).

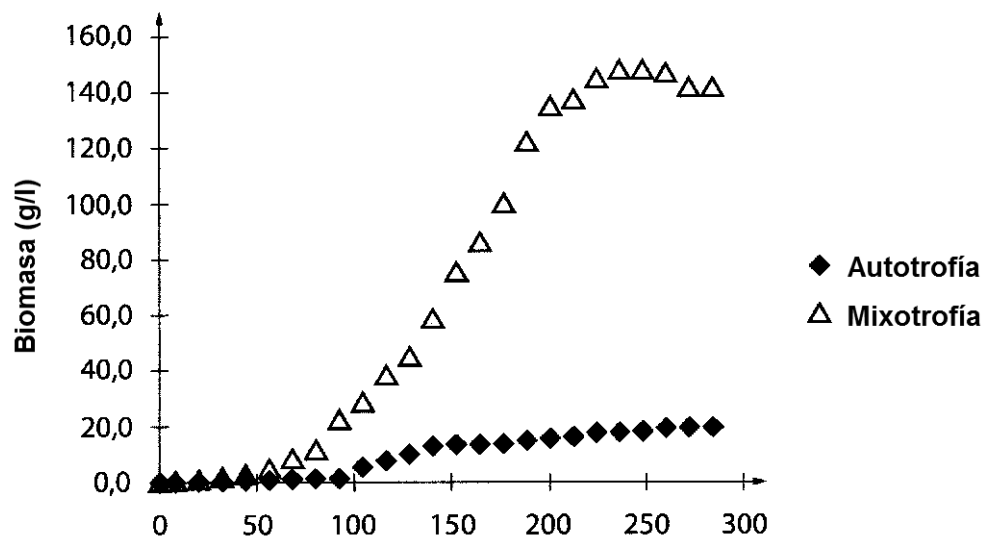


Fig. 1

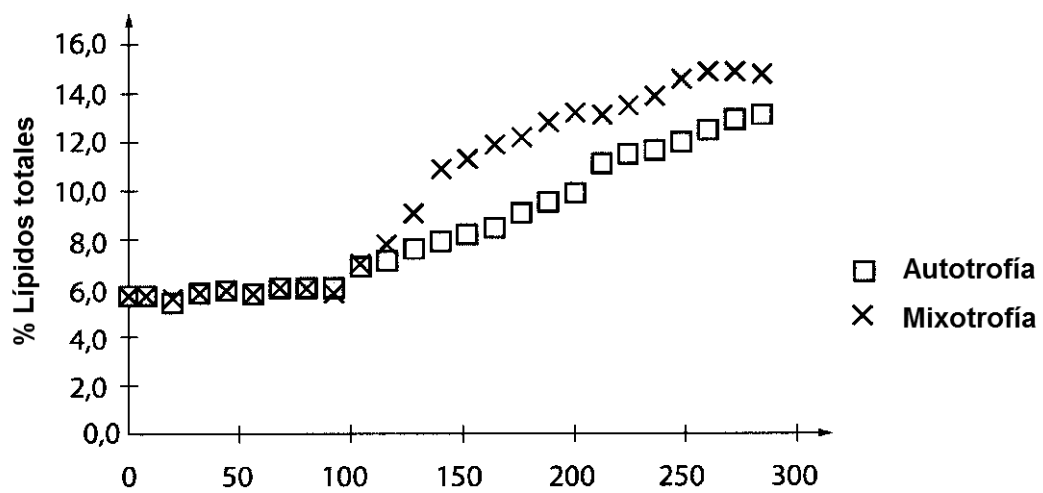


Fig. 2