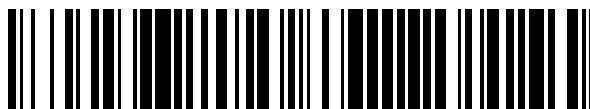


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 337**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2014** **PCT/EP2014/056125**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014** **WO14154787**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2014** **E 14713448 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017** **EP 2978837**

54 Título: **Procedimiento de enriquecimiento en proteínas de la biomasa de microalgas**

30 Prioridad:

29.03.2013 FR 1352857

19.08.2013 FR 1358052

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

26.02.2018

73 Titular/es:

ROQUETTE FRÈRES (100.0%)

1 rue de la Haute Loge

62136 Lestrem, FR

72 Inventor/es:

MACQUART, GABRIEL;

DELAROCHE, SYLVAIN;

LE RUYET, MARIE y

SEGUEILHA, LAURENT

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 656 337 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 enriquecimiento en proteínas de la biomasa de microalgas

La presente invención se refiere a un procedimiento de enriquecimiento en proteínas de la biomasa de microalgas, más particularmente del género *Chlorella*, más particularmente aún de la especie *Chlorella sorokiniana* o *Chlorella protothecoides*.

Las algas, macro y micro, tienen una riqueza específica en gran parte inexplorada. Su explotación con fines alimenticios, químicos o bio-energéticos es todavía muy marginal. Contiene, sin embargo, unos componentes de gran valor, que sólo la fauna marina, que se alimenta de ellas, es verdaderamente capaz de apreciar su riqueza y abundancia.

Las microalgas son, en efecto, fuentes de vitaminas, lípidos, proteínas, azúcares, pigmentos y antioxidantes.

Las algas y microalgas interesan así al sector industrial, que las utiliza para la fabricación de complementos alimenticios, de alimentos funcionales, de cosméticos, de medicamentos o para la acuicultura.

Las microalgas son, ante todo, unos microorganismos fotosintéticos que colonizan todos los biotopos expuestos a la luz.

A escala industrial, su cultivo monoclonal se realiza en unos fotobiorreactores (condiciones autotróficas: a la luz con CO₂) o para algunas de ellas, también en fermentadores (condiciones heterotróficas: en la oscuridad en presencia de una fuente carbonada).

Algunas especies de microalgas son en efecto capaces de crecer en ausencia de luz: *Chlorella*, *Nitzschia*, *Cyclotella*, *Tetraselmis*, *Cryptothecodinium*, *Schizochytrium*.

De hecho, se estima que el cultivo en condiciones heterotróficas cuesta 10 veces más barato que en condiciones fototróficas ya que, para el experto en la materia, estas condiciones heterotróficas permiten:

- la utilización de fermentadores idénticos a los utilizados para las bacterias y las levaduras y permiten el control de todos los parámetros de cultivo,
- la producción de biomasa en cantidad mucho más elevada que la que se obtiene mediante cultivo basado en la luz.

La explotación rentable de las microalgas necesita generalmente el control de las condiciones de fermentación que permite acumular sus componentes de interés, tales como:

- los pigmentos (clorofila a, b y c, β -caroteno, astaxantina, luteína, ficocianina, xantófilos, ficoeritrina, etc.) cuya demanda es creciente, tanto por sus notables propiedades antioxidantes, como para su aportación de colores naturales en la alimentación,

- las proteínas, con el fin de optimizar las calidades nutritivas; o

- los lípidos, con el fin de optimizar su contenido en ácidos grasos (hasta el 60%, incluso el 80% en peso de su materia seca) en particular para:

* las aplicaciones biocarburantes, pero también

* las aplicaciones en alimentación humana o animal, cuando las microalgas seleccionadas producen ácidos grasos poliinsaturados o PUFA denominados "esenciales" (es decir aportados por la alimentación ya que no son naturalmente producidos por el hombre o el animal).

Para conseguir este resultado, se han trabajado así ampliamente unos primeros procedimientos de fermentación que permiten obtener altas densidades celulares (acrónimo inglés: HCD por High-Cell-Density), con el fin obtener unos rendimientos y productividades máximos en proteínas o en lípidos.

El objetivo de estos cultivos HCD eran la obtención de la concentración lo más elevada posible del producto deseado en el lapso de tiempo más corto.

Este precepto se verifica por ejemplo para la biosíntesis de astaxantina por *Chlorella zofingiensis*, en la que el crecimiento de la microalga se mostró correlacionado directamente con la producción de este compuesto (Wang and Peng, 2008, World J Microbiol, Biotechnol., 24(9), 1915-1922).

Sin embargo, el hecho de mantener el crecimiento a su porcentaje máximo (μ , en h⁻¹) no está siempre correlacionado con la producción elevada del producto deseado.

En efecto, se reveló rápidamente a los especialistas del campo que es necesario, por ejemplo, someter las microalgas a un estrés nutricional que limita su crecimiento cuando se desea hacerlas producir importantes reservas

lipídicas.

Por lo tanto, se procede a partir de ahora al desacoplamiento crecimiento/producción en los procedimientos de fermentación.

5 Por ejemplo, para favorecer la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados (aquí el ácido docosahexaenoico o DHA), la solicitud de patente WO 01/54510 recomienda disociar el crecimiento celular y la producción de ácidos grasos poliinsaturados.

10 En la microalga *Schizochytrium sp* cepa ATCC 20888, se procede así a una primera fase de crecimiento sin limitación en oxígeno, a fin de favorecer la obtención de una alta densidad celular (más de 100 g/l) después, en una segunda fase, ralentizar progresivamente la aportación en oxígeno, a fin de estresar a la microalga, ralentizar su crecimiento e iniciar la producción de los ácidos grasos de interés.

En la microalga *Cryptothecodinium cohnii*, el contenido más elevado en ácido docosahexaenoico (DHA, ácido graso poliinsaturado) se obtiene a baja concentración en glucosa (del orden de 5 g/l), y así a bajo porcentaje de crecimiento (Jiang and Chen, 2000, Process Biochem., 35(10), 1205-1209).

15 Estos resultados ilustran bien el hecho de que las cinéticas de formación de los productos pueden también estar asociados tanto de manera positiva como de manera negativa con el crecimiento de las microalgas, incluso con una combinación de los dos.

Así, en los casos en los que la formación de los productos no está correlacionada con un crecimiento celular elevado, es juicioso controlar el porcentaje de crecimiento celular.

20 En general, el experto en la materia elige controlar el crecimiento de las microalgas mediante el control de las condiciones de fermentación (Tp, pH...) o mediante la alimentación regulada en componentes nutricionales del medio de fermentación (condiciones semi-continuas denominadas "fed-batch").

25 Si elige controlar el crecimiento de las microalgas en heterotrofia mediante la aportación en fuentes carbonadas, el experto en la materia elige generalmente adaptar la fuente carbonada (glucosa pura, acetato, etanol, etc.) a la microalga (*C. cohnii*, *Euglena gracilis*, etc.) en función de metabolito producido (por ejemplo, un ácido graso poliinsaturado de tipo DHA).

La temperatura puede también ser un parámetro clave:

- por ejemplo, se ha detallado que la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados en algunas especies de microalgas, tal como EPA por *Chlorella minutissima*, se ve favorecida por una temperatura más baja que la requerida para el crecimiento óptimo de dicha microalga;

30 - por el contrario, el rendimiento en luteína es más elevado en *Chlorella protothecoides* cultivadas en heterotrofia, cuando se aumenta la temperatura de producción de 24 a 35°C.

Chlorella protothecoides está reconocida justamente como una de las mejores microalgas productoras de aceite.

En condiciones heterotróficas, se transforman rápidamente los hidratos de carbono en triglicéridos (más del 50% de su materia seca).

35 Para optimizar esta producción en triglicéridos, el experto en la materia induce a optimizar el flujo carbonado hacia la producción de aceite, actuando sobre el entorno nutricional del medio de fermentación.

Así, se conoce que la acumulación en aceite se produce durante una aportación carbonada suficiente, pero en condiciones de deficiencia de nitrógeno.

40 La relación C/N es por lo tanto aquí determinante, y se admite que los mejores resultados se obtienen actuando directamente sobre el contenido en nitrógeno, no siendo limitante el contenido en glucosa.

De manera no sorprendente, esta deficiencia de nitrógeno afecta el crecimiento celular, dando como resultado una tasa de crecimiento del 30% más débil que el porcentaje de crecimiento normal de la microalga (Xiong *et al.*, Plant Physiology, 2010, 154, pp1001-1011).

45 Para explicar este resultado, Xiong *et al.*, en el artículo citado anteriormente, demuestra en efecto que si se divide la biomasa de *Chlorella* en sus 5 componentes principales, es decir hidratos de carbono, lípidos, proteínas, ADN y ARN (representando el 85% de su materia seca), si la relación C/N no tiene ningún impacto sobre el contenido en ADN, ARN e hidratos de carbono, se vuelve preeminente para el contenido en proteínas y en lípidos.

50 Es así que las células de *Chlorella* cultivadas con una relación C/N débil contienen el 25,8% de proteínas y el 25,23% en lípidos, mientras que una relación C/N elevada permite la síntesis del 53,8% de lípidos y el 10,5% de proteínas.

Para optimizar su producción en aceite, es por lo tanto primordial para el experto en la materia controlar el flujo carbonado desviándolo hacia la producción de aceite, en detrimento de la producción de las proteínas; el flujo carbonado se redistribuye y se acumula en sustancias de reserva lipídicas cuando las microalgas se colocan en un medio con deficiencia de nitrógeno.

- 5 Apoyándose en esta enseñanza, para la producción de biomasa ricas en proteínas, el experto en la materia es inducido, por lo tanto, a realizar lo contrario de este control metabólico, es decir trabajar las condiciones de fermentación favoreciendo, en su lugar, una relación C/N débil, y así:

- realizar una aportación importante en fuente de nitrógeno al medio de fermentación, manteniendo al mismo tiempo constante la carga en fuente carbonada que se convertirá en proteínas, y

- 10 - estimular el crecimiento de la microalga.

Se trata de modificar el flujo carbonado hacia la producción de proteínas (y por lo tanto de biomasa) en detrimento de la producción de los lípidos de reserva.

- 15 SANSAWA *et al.* (2004, Journal of Bioscience and Bioengineering, 98, 437-444) describe un procedimiento de cultivo en heterotrofia de una microalga, *Chlorella regularis*, que comprende una etapa que tiene como objetivo limitar el crecimiento de dicha microalga por una deficiencia total de alimentación en glucosa del medio de fermentación, permitiendo así alcanzar un contenido en proteínas de la biomasa del 63% en peso.

DOUCHA *et al.* (2011, Journal of Applied Phycology, 24, 35-43) describe un procedimiento de cultivo heterotrófico de una microalga, *Chlorella vulgaris*, permitiendo alcanzar un contenido en proteínas de la biomasa del 36,5% en peso. La estrategia utilizada consiste en someter la biomasa producida a una deficiencia total de glucosa durante 12h.

- 20 En el ámbito de la invención, la compañía solicitante ha elegido explorar una vía original proponiendo una solución alternativa a la clásicamente considerada por el experto en la materia.

La invención se refiere así a un procedimiento de enriquecimiento en proteínas de una microalga cultivada en heterotrofia, microalga del género *Chlorella*, más particularmente aún *Chlorella sorokiniana* o *Chlorella protothecoides*, procedimiento de cultivo heterotrófico que comprende una etapa que tiene como objetivo limitar el crecimiento de dicha microalga por una deficiencia de glucosa del medio de fermentación.

- 25 Esta etapa es una etapa de cultivo heterotrófico en el que la glucosa se aporta en cantidad insuficiente en el medio para permitir el crecimiento de la microalga. Cabe señalar que por cantidad insuficiente no se entiende una aportación nula en este factor nutritivo. Esta fase de deficiencia nutritiva conduce entonces en ralentizar (limitar) el metabolismo celular, sin inhibirlo totalmente.

- 30 En el sentido de la invención, el “enriquecimiento” se entiende de un aumento del contenido en proteína de la biomasa de al menos el 15%, preferentemente de al menos el 20% en peso, a fin de alcanzar un contenido en proteínas de la biomasa de más del 50% en peso.

La invención se refiere más precisamente a un procedimiento de cultivo heterotrófico de dichas microalgas que comprende una etapa que tiene como objetivo limitar el crecimiento de dicha microalga por una deficiencia del medio de fermentación en glucosa.

- 35 Así, la presente invención se refiere a un procedimiento de enriquecimiento en proteínas de una microalga cultivada en heterotrofia, microalga del género *Chlorella*, más particularmente aún *Chlorella sorokiniana* o *Chlorella protothecoides*, comprendiendo el procedimiento el cultivo heterotrófico que comprende una etapa que tiene como objetivo limitar el crecimiento de dicha microalga por una deficiencia del medio de fermentación en glucosa con una aportación continua en glucosa a fin de obtener una velocidad de crecimiento comprendida entre 0,06 h⁻¹ y 0,09 h⁻¹, permitiendo así alcanzar un contenido en proteínas de la biomasa de más del 50% en peso.

Por “deficiencia del medio de fermentación en glucosa” se entiende un cultivo en el que al menos la glucosa se aporta a la microalga en cantidad insuficiente para permitir su crecimiento.

- 45 En particular, la glucosa es deficiente para obtener una velocidad de crecimiento disminuida del 10 al 60% con respecto a la velocidad de crecimiento sin limitación de dicha fuente nutricional. Se propone, en particular, disminuir la velocidad de crecimiento del 10 al 60% con respecto a la velocidad de crecimiento sin limitación en glucosa, en particular del 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 55% con respecto a la velocidad de crecimiento sin limitación en glucosa. Preferentemente, la velocidad de crecimiento disminuye del 15 al 55%.

- 50 La duración de la fase de cultivo deficiente en glucosa es al menos 1h, preferentemente de al menos 10h, más preferiblemente de al menos 20h, en particular entre 30 y 60h.

Esto se traduce por una ausencia de glucosa residual en el medio de cultivo, consumiendo la microalga esta glucosa a medida que se aporta. Sin embargo, la ausencia de glucosa residual en el medio de cultivo se distingue de una situación en la que la microalga está totalmente privada de glucosa.

En el sentido de la invención, el criterio esencial es, por lo tanto, la limitación del crecimiento celular inducido por un estrés, estrés celular provocado por la deficiencia de la glucosa del medio de fermentación.

Esta estrategia va, por lo tanto, en contra del prejuicio técnico según el cual, para aumentar el contenido de proteínas de la biomasa, se necesita inevitablemente aumentar esta biomasa y, por lo tanto, el crecimiento celular.

- 5 Como se ejemplificará a continuación, se puede seleccionar ventajosamente limitar el crecimiento de *Chlorella sorokiniana* por una deficiencia de glucosa del medio de fermentación.

La glucosa se aporta a fin de obtener una velocidad de crecimiento comprendido entre 0,06 h⁻¹ y 0,09 h⁻¹.

- 10 En un modo muy particular, la cepa de *Chlorella sorokiniana* es la cepa UTEX 1663 - *The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin* - USA. En un modo muy particular, la cepa de *Chlorella protothecoides* es la cepa CCAP211/8D - *The Culture Collection of Algae and Protozoa, Scotland, UK*.

De manera opcional, la limitación del crecimiento de dicha microalga se puede obtener mediante la adición en el medio de cultivo de sustancias inhibidoras del crecimiento celular, como los sulfatos.

Por otro lado, sin estar sujeto a ninguna teoría, la compañía solicitante ha encontrado que el flujo de glucosa se utiliza normalmente en las microalgas del género *Chlorella sorokiniana* según un orden de prioridad bien preciso:

- 15 1. el metabolismo basal,
2. el crecimiento, es decir formación de una biomasa rica en proteínas,
3. las sustancias de reserva (lípidos e hidratos de carbono tal como el almidón).

Este principio permite explicar las variaciones naturales de contenido en proteínas durante el crecimiento de la microalga, a pesar de la aportación constante en nitrógeno.

- 20 La compañía solicitante ha encontrado así que, para enriquecer la biomasa de microalga de proteínas, se necesita limitar el crecimiento de la microalga y controlar su consumo en fuente nutritiva diferente del nitrógeno, por ejemplo, en glucosa, a fin de:

- dedicar el consumo total de glucosa a las vías de producción de proteínas,
- evitar la acumulación de sustancia de reserva como los lípidos.

- 25 En efecto, evitar una deficiencia de nitrógeno permite impedir la desviación de los flujos metabólicos hacia la producción de lípidos.

De manera opcional, puede ser ventajoso ir hasta el bloqueo total de cualquier síntesis de material de reserva, actuando por medio de inhibidores específicos.

- 30 En efecto, se conoce un cierto número de inhibidores de las vías de síntesis de los lípidos, incluso el almidón (hidrato de carbono de reserva por excelencia de las microalgas verdes):

- para los lípidos, la cerulenina se describe como inhibidor de la síntesis de los ácidos grasos, o la lipstatina, sustancia natural producida por *Streptomyces toxytricini*, como inhibidor de las lipasas, etc.

- 35 - para el almidón, los iminoazúcares (obtenido por simple sustitución del átomo de oxígeno endocíclico de los azúcares por un átomo de nitrógeno) son históricamente conocidos como inhibidores potentes de las glicosidasas, de las glicosiltransferasas, de los glicógenos fosforilasas, o de UDP-Galp mutasa.

Así, el procedimiento comprende la fermentación de una biomasa de microalgas en condiciones heterotróficas con una primera etapa de crecimiento de la biomasa y con una segunda etapa de deficiencia del medio de fermentación en glucosa.

- 40 Esta segunda etapa permite enriquecer la biomasa en proteína. En particular, permite alcanzar un contenido en proteínas de la biomasa de más del 50% en peso (en peso de materia seca).

En un primer modo preferido de realización conforme a la invención, el procedimiento de cultivo heterotrófico de dichas microalgas, en particular *Chlorella sorokiniana*, comprende:

* una primera etapa de crecimiento de las microalgas, en el que el caudal de aportación en glucosa se ajusta a su capacidad de consumo, a fin de obtener rápidamente una biomasa importante,

- 45 * una segunda etapa de producción de proteínas por las microalgas, en la que el caudal de aportación en glucosa se fija a un valor claramente por debajo de su capacidad de consumo de la glucosa, a fin de impedir la acumulación suplementaria de sustancias de reserva, incluso favorecer su consumo.

Como se ejemplificará a continuación, la primera etapa de crecimiento de las microalgas se realiza en modo discontinuo o “discontinuo”, en el que la glucosa aportada inicialmente se consume totalmente por la microalga, lo que conduce a la producción de una biomasa de base.

La segunda etapa de producción de proteínas se lleva a cabo en condiciones en las que se realiza:

- 5 * o bien una aportación de medio completo en modo semicontinuo, denominado “fed-batch”, después del consumo de glucosa aportado inicialmente; los otros parámetros de conducción de la fermentación siguen sin alterar.

La glucosa se aporta en continuo y la velocidad de aportación es entonces inferior a la velocidad de consumo que la cepa podría realizar de manera que el contenido residual en glucosa en el medio se mantiene nulo.

El crecimiento de la cepa se limita entonces por la disponibilidad de glucosa (condición glucosa-limitante).

- 10 - un funcionamiento en continuo de tipo quimiostato, en el que la tasa de crecimiento de la cepa (μ) se mantiene a su valor mínimo, limitándose el crecimiento de la cepa por la aportación de glucosa.

Este modo de funcionamiento permite obtener una biomasa con fuerte contenido en proteínas gracias a la limitación en glucosa y a la baja tasa de crecimiento impuesto, asegurando al mismo tiempo una muy buena productividad.

La invención se comprenderá mejor con la ayuda de los ejemplos siguientes.

15 EJEMPLOS

Ejemplo 1: producción de *Chlorella sorokiniana* en fermentación de tipo “lote secuencial” sin limitación de la aportación en medio nutritivo

La cepa utilizada es una *Chlorella sorokiniana* (cepa UTEX 1663 - *The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin* - USA).

- 20 Precultivo:

- 600 ml de medio en un Erlenmeyer de 2l;
- composición del medio (tabla 1 siguiente)

Tabla 1.

Macro elementos (g/l)	Glucosa	20
	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,7
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,34
	Ácido cítrico	1,0
	Urea	1,08
	Na ₂ SO ₄	0,2
	Na ₂ CO ₃	0,1
	clerol FBA 3107 (antiespuma)	0,5
elementos (g/l)	Na ₂ EDTA	10
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	80
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	40
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,41
	CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,24
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,24
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
	H ₃ BO ₃	0,11
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₇ ·4H ₂ O	0,04

El pH se ajusta a 7 antes de la esterilización por adición de NaOH 8N.

5 La incubación se desarrolla en las condiciones siguientes:

-duración: 72h;

- temperatura: 28°C;

- agitación: 110 rpm (incubador Infors Multitron).

El precultivo se transfiere después en un fermentador de 30l de tipo Sartorius.

10 Cultivo para producción de biomasa:

El medio es idéntico al del precultivo, pero la urea se sustituye por NH₄Cl.

Tabla 2

Macro elementos (g/l)	Glucosa	20
	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,7
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,34
	Ácido cítrico	1,0
	NH ₄ Cl	1,88
	Na ₂ SO ₄	0,2
	clerol FBA3107 (antiespuma)	0,5
Micro elementos (mg/l)	Na ₂ EDTA	10
	CaCl ₂	80
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	40
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,41
	CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,24
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,24
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
	H ₃ BO ₃	0,11
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₇ ·4H ₂ O	0,04

El volumen inicial (Vi) del fermentador se ajusta a 13,5l después de la inoculación.

- 5 Se lleva a 16-20l en final.

Los parámetros de conducta de la fermentación son los siguientes:

Tabla 3

Temperatura	28°C
pH	5,0 - 5,2 por NH ₃ 28% p/p
pO ₂	> 20% (mantenido por agitación)
Agitación	300 RPM mini.
Caudal de aire	15 l/min.

- 10 Cuando la glucosa aportada inicialmente se consume, se realiza una aportación de medio idéntico al medio inicial, sin el antiespumante, en forma de una solución concentrada que contiene 500 g/l de glucosa y los otros elementos en las mismas proporciones con respecto a la glucosa que en el medio inicial, a fin de obtener un contenido en glucosa de 20 g/l en el fermentador.

Se realizan otras dos adiciones idénticas de la misma manera cada vez que la concentración residual en glucosa se vuelve nula.

- 15 Se añade el antiespumante Clerol FBA 3107 bajo demanda para evitar un espumado excesivo.

Resultados:

Después de 46h de cultivo, se obtienen 38 g/l de biomasa a un contenido en proteínas (evaluado por N 6,25) del

36,2%.

Ejemplo 2: Producción de *C. sorokiniana* en fermentación de tipo “fed batch” con aportación en glucosa limitante

En este ejemplo, se inicia una aportación de medio completo (modo “fed-batch”) después del consumo de la glucosa aportada inicialmente. Los otros parámetros de conducta de la fermentación permanecen sin cambios.

- 5 La glucosa se aporta en continuo con la ayuda de una solución concentrada a 500 g/l. La velocidad de aportación es inferior a la velocidad de consumo que la cepa podría realizar de manera que el contenido residual en glucosa en el medio se mantiene nulo, es decir que el crecimiento de la cepa está limitado por la disponibilidad en glucosa (condición glucosa-limitante).

- 10 Esta velocidad se aumenta a lo largo del tiempo de manera exponencial. La fórmula que sirve para calcular el caudal de adición se caracteriza por un factor μ que corresponde a la tasa de crecimiento que la cepa puede adoptar si consume toda la glucosa proporcionada:

$$S = S_0 \times \exp(\mu \cdot t)$$

S = caudal de aportación en glucosa (en g/h)

- 15 S_0 = caudal de aportación inicial en glucosa, determinada en función de la biomasa presente al final del “lote”. Es de 12 g/h en nuestras condiciones.

μ = factor de aceleración del caudal. Debe ser inferior a $0,11 \text{ h}^{-1}$ que es el porcentaje de crecimiento de la cepa en ausencia de limitación nutricional.

t = duración del fed-batch (en h)

- 20 Las sales se aportan, si es posible, en continuo, separadamente o en mezcla con la glucosa. Pero se pueden aportar también secuencialmente en varias veces.

La tabla 4 siguiente da las necesidades en sales para 100 g de glucosa.

Tabla 4

Macro elementos (g)	Glucosa	100
	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	6,75
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,7
	Ácido cítrico	5,0
	Na ₂ SO ₄	1,0
Micro elementos (mg)	Na ₂ EDTA	50
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	400
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	200
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	2,1
	CoSO ₄ ·7H ₂ O	1,2
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,2
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,5
	H ₃ BO ₃	0,6
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₇ ·4H ₂ O	0,2

- 25 Las concentraciones de los otros elementos que la glucosa se determinaron a fin de estar en exceso con respecto a las necesidades nutricionales de la cepa.

Se añade el antiespumante Clerol FBA 3107 bajo demanda para evitar un espumado excesivo.

Resultados: efecto de la velocidad de aportación en glucosa durante el fer-batch

Se han efectuado unos ensayos a diferentes velocidades de aportación de la glucosa en "fed-batch". Se caracterizan por el μ aplicado. El contenido en proteína de la biomasa obtenida se evalúa mediante la medición del nitrógeno total expresado en N 6,25.

Tabla 5

ensayo	μ fed (h ⁻¹)	duración (h)	Biomasa (g/l)	Productividad (g/l/h)	% N 6,25
1	0,06	78	43,6	0,56	49,2
2	0,07	54	35,1	0,65	43,1
3	0,09	48	64,9	1,35	39,3

Estos resultados muestran que el hecho de trabajar con glucosa limitante permite aumentar el contenido en proteínas.

- 10 Se observa en efecto que, incluso con un μ elevado de 0,09, se obtiene un contenido en proteínas más elevado que aquel obtenido sin limitación como en el ejemplo 1 (un 39,3% en lugar de un 36,2%).

Acentuar la limitación del metabolismo por la glucosa conlleva una mejora suplementaria del contenido en proteínas.

En las condiciones de estos ensayos, es necesario imponer a la cepa un μ inferior a 0,6 h⁻¹ para obtener un contenido en proteínas superior al 50%.

- 15 Cabe señalar que esta condición va a la par con una reducción de la productividad: 0,56 g/Uh en lugar de 1,35 g/l/h con el ensayo 3.

Ejemplo 3: producción de *C. sorokiniana* en fermentación continua de tipo quimiostato con aportación de glucosa limitante

En este ejemplo, el fermentador utilizado es un 2l de tipo Sartorius Biostat B.

- 20 Se realiza como en el ejemplo 2, pero con unos volúmenes 10 veces más débiles: el inóculo es de 60 ml y el volumen inicial de 1,35l.

La aportación en continuo del medio se inicia según el mismo principio que en el ejemplo 2, mezclándose las sales en este caso con la glucosa en la distribuidora de alimentación. La velocidad de aportación se acelera según la misma fórmula exponencial que en el ejemplo 2 aplicando un μ de 0,06 h⁻¹.

- 25 Quimiostato

Cuando se alcanza un volumen de 1,6l, es decir una concentración en biomasa de aproximadamente 50 g/l, se inicia el funcionamiento en continuo de tipo quimiostato:

1. el fermentador se alimenta en continuo a un caudal de 96 ml/h por una solución de medio nutritivo a 100 g/l de glucosa de composición siguiente:

- 30

Tabla 6

Macro elementos (g/l)	Glucosa	100
	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	6,75
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,7
	Ácido cítrico	5,0
	Na ₂ SO ₄	1,0
Micro elementos (mg/l)	Na ₂ EDTA	50
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	400
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	200
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	2,1
	CoSO ₄ ·7H ₂ O	1,2
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,2
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,5
	H ₃ BO ₃	0,6
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₇ ·4H ₂ O	0,2

- 5 Las concentraciones de los otros elementos que la glucosa se determinaron a fin de estar en exceso con respecto a las necesidades nutricionales de la cepa.

2. Se sustrae un medio en continuo del fermentador gracias a un tubo sumergido unido a una bomba a fin de mantener el volumen del cultivo a 1,6l.

Así, el medio se renueva con una fracción 0,06 (6%) por hora. Esta tasa de renovación se denomina tasa de dilución (D).

- 10 Conforme al principio del cultivo en quimiostato, la tasa de crecimiento de la cepa (μ) se establece al mismo valor por que el crecimiento de la cepa está limitado con respecto a la aportación de glucosa:

$$D = \mu = 0,06 \text{ h}^{-1}$$

Resultados

- 15 Después de 97h de funcionamiento en quimiostato, la concentración en biomasa se estabiliza a 48 g/l +/- 2 g/l y el contenido en proteína a 53 +/- 2%.

Este modo de funcionamiento permite obtener una biomasa con fuerte contenido en proteína gracias a la limitación en glucosa y al bajo porcentaje de crecimiento impuesto asegurando al mismo tiempo una muy buena productividad, del orden de 2,9 g/l/h, gracias a la concentración elevada en biomasa.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de enriquecimiento en proteínas de una microalga cultivada en heterotrofia, microalga del género *Chlorella*, caracterizado por que el cultivo heterotrófico comprende una etapa que tiene como objetivo limitar el crecimiento de dicha microalga por una deficiencia de glucosa del medio de fermentación con una aportación continua en glucosa a fin de obtener una velocidad de crecimiento comprendida entre 0,06 h⁻¹ y 0,09 h⁻¹, permitiendo así alcanzar un contenido en proteínas de la biomasa de más del 50% en peso.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la glucosa es deficiente para obtener una velocidad de crecimiento reducida de un 10 a un 60%, con respecto a la velocidad de crecimiento sin limitación de dicha glucosa.
3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que la microalga del género *Chlorella* se selecciona del grupo constituido de *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella protothecoides*.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la duración de la fase de cultivo deficiente es de al menos 1h, preferentemente de al menos 10h, más preferiblemente de al menos 20h, en particular entre 30 y 60h.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el cultivo heterotrófico de las microalgas de la especie *Chlorella sorokiniana* comprende:
 - a. una primera etapa de crecimiento de las microalgas, en la que el caudal de aportación de glucosa se ajusta a su capacidad de consumo, a fin de obtener rápidamente una biomasa importante,
 - b. una segunda etapa de producción de proteínas por las microalgas, en la que el caudal de aportación en glucosa se fija a un valor claramente por debajo de su capacidad de consumo de la glucosa, a fin de impedir la acumulación suplementaria de sustancia de reserva, incluso favorecer su consumo.